



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**FLORA BACTERIANA FUNCIONAL EN EL TRACTO
DIGESTIVO DEL CAMARÓN BLANCO *L. vannamei*.
UN ESTUDIO ENFOCADO A SU PARTICIPACIÓN
EN LA DIGESTIÓN**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias
(Biología Marina)**

P r e s e n t a

Biol. MERLY JACQUELINE TUYUB TZUC

Directora de Tesis: Dra. María Leticia Arena Ortíz

Comité Tutorial: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés
M.C. Diana Yamily Escalante Rendiz
Dra. Marcela Zamudio Maya
Dr. Ernesto Pérez Rueda
Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Dr. Rafael Rojas Herrera

Sisal Yucatán, México 2011



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos o de otros materiales que se sujetan a protección de los derechos de autor será excluyente por fines educativos e informativos o deberá citar la fuente donde lo 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.

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM, con sede en Sisal y en instalaciones de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. María Leticia Arena Ortiz, con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN 207409: Estudio de la composición de la flora bacteriana en el hepatopáncreas y tubo digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su aporte en la digestión y la regulación de la expresión génica.

Se agradece su participación en el proyecto a la M. en C. Diana Yamily Escalante Rendiz, Dr. Rafael A. Rojas Herrera y Dr. Ernesto Pérez Rueda así como a los técnicos académicos M. en C. Gemma Leticia Martínez Moreno, M. en C. Karla Susana Escalante Herrera y M. en C. Manuel Valenzuela Jiménez por su apoyo en las diferentes etapas de este trabajo.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis padres Carmen y Oscar a quienes agradezco inmensamente su amor, comprensión y apoyo incondicional para alcanzar mis objetivos.

A mi hermana Ilse por su apoyo, compañía y buenos momentos que siempre compartimos.

A mis mejores amigos Mildred y Marcelo por su confianza, lealtad y apoyo. Por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dra. Leticia Arena Ortiz por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por haber confiado en mi persona, por la paciencia, por la dirección de este trabajo y sobre todo por su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, M.C. Diana Yamily Escalante Rendiz, Dra. Marcela Zamudio Maya, Dr. Ernesto Pérez Rueda, Dr. Píndaro Díaz Jaimes y Dr. Rafael Rojas Herrera, mi más sincero agradecimiento por la revisión de esta tesis, sus comentarios y valiosas aportaciones y por su disposición y ayuda brindadas.

A Karla Escalante Herrera por su gran ayuda, apoyo y disposición en el trabajo de laboratorio y en especial por ser mi amiga.

A Aracely González Burgos por sus consejos y ayuda en la etapa experimental del proyecto y por supuesto por su amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al CONACyT por el apoyo a través de la beca de posgrado.

A la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias con sede en Sisal y a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo con la infraestructura para la etapa experimental del presente trabajo.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. ANTECEDENTES	14
1.1. Hábitos alimenticios, morfología del aparato digestivo y digestión en <i>Litopenaeus vannamei</i>	14
1.2. Contribución de la flora bacteriana en la digestión de organismos acuáticos	17
1.3. Métodos de identificación bacteriana	20
1.3.1. Identificación de microorganismos mediante criterios genotípicos.....	20
1.3.1.1. Amplificación del gen 16S a partir de una muestra.....	21
1.3.1.2. Secuenciación.....	22
1.3.1.3. Análisis bioinformático de la secuencia.....	22
1.3.2. Identificación de microorganismos mediante criterios fenotípicos	22
1.3.2.1. Morfología macroscópica (colonial).....	23
1.3.2.2. Morfología microscópica y características tintoreales.....	23
1.3.2.2.1. Tinción de Gram.....	23
1.3.2.3. Propiedades metabólicas	25
1.3.2.3.1. Prueba de la catalasa.....	25
1.3.2.3.2. Prueba de la oxidasa	26
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. General.....	27
2.2. Específicos	27
CAPITULO I. Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica del tracto digestivo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	28

1.	INTRODUCCIÓN	28
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1.	Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica. Elaboración de un medio de cultivo	30
2.1.1.	Medio con caseína pura	30
2.1.2.	Medio con leche en polvo.....	30
2.1.3.	Medio con leche líquida	31
2.2.	Material biológico	31
2.3.	Elección y aislamiento de cepas con actividad proteolítica	31
2.4.	Conservación de las cepas	32
2.5.	Identificación molecular de las cepas aisladas	33
2.6.	Tinción de Gram	35
2.7.	Pruebas bioquímicas	36
2.7.1.	Catalasa.....	36
2.7.2.	Oxidasa	36
3.	RESULTADOS	37
3.1.	Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica. Elaboración de un medio de cultivo	37
3.2.	Elección y aislamiento de cepas con actividad proteolítica	37
3.3.	Identificación de las cepas aisladas con actividad proteolítica	38
3.3.1.	Estómago	42
3.3.2.	Hepatopáncreas	46
3.3.3.	Intestino	49
4.	DISCUSIÓN	53
5.	BIBLIOGRAFÍA	61

CAPITULO II. Producción de enzimas digestivas de bacterias aisladas del tracto digestivo del camarón blanco <i>L. Vannamei</i>	70
1. INTRODUCCIÓN	70
2. MATERIALES Y MÉTODOS	72
2.1. Recuperación de cepas a partir de gliceroles	72
2.2. Producción de enzimas	72
2.2.1. Amilasas	72
2.2.2. Quitinasas	73
2.2.3. Lipasas/esterasas	73
3. RESULTADOS	74
3.1. Producción de amilasas	74
3.2. Producción de quitinasas	75
3.3. Producción de lipasas/esterasas	75
4. DISCUSIÓN	74
4.1. Producción de amilasas	77
4.2. Producción de quitinasas	79
4.3. Producción de lipasas/esterasas	82
DISCUSIÓN GENERAL	84
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
BIBLIOGRAFÍA	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del tracto digestivo del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
Figura 1. Fotos ejemplo de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína, que habitan en el intestino de <i>L. vannamei</i>	38
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de un segmento del gen del ARN ribosomal 16S mediante PCR. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2-15) Fragmento amplificado de algunas de las cepas de estudio. Se muestran los productos ya purificados.	39
Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias del gen del ARN ribosomal 16S (método Ratchet; Longitud: 317; índice de consistencia: 70%; índice de retención: 95%), se muestra la relación filogenética de las secuencias de las cepas de estudio con otros grupos. <i>Micrococcus luteus</i> AJ536198 se uso como grupo externo.....	29
Figura 4. Árbol filogenético basado en secuencias del gen del ARN ribosomal 16S (método Ratchet; Longitud: 307; índice de consistencia: 60%; índice de retención: 91%), se muestra la relación filogenética de las secuencias de las cepas de estudio con otros grupos. <i>Micrococcus luteus</i> AJ536198 se uso como grupo externo.....	30
Figura 5. Esquema del tracto digestivo del camarón <i>L. vannamei</i> donde se sitúan las diferentes cepas aisladas con actividad proteolítica así como los géneros a los cuales pertenecen.....	42
Figura 6. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del estómago, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.	43
Figura 7. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del hepatopáncreas, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.	46
Figura 8. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del intestino, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.	50
Figura 1. Determinación de actividad amilolítica de algunas de las cepas de estudio. A) Cepas con actividad amilolítica. HD2, HE2: Hepatopáncreas (<i>Vibrio</i>); EG4: Estómago (<i>Vibrio</i>). B) Cepas que no presentaron actividad amilolítica. EE1: Estómago (<i>Pseudoalteromonas</i>); HB1: Hepatopáncreas (<i>Pseudoalteromonas</i>); IC1: Intestino (<i>Pseudoalteromonas</i>)..	74

Figura 2. Actividad lipasa/esterasa de algunas de las cepas de estudio. HC2, HA1: Hepatopáncreas (*Vibrio*); EC2, EF3: Estómago (*Vibrio*); IC1: Intestino (*Pseudoalteromonas*); IA1: Intestino (*Vibrio*). 75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.	43
Tabla 2. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.	44
Tabla 3. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.	45
Tabla 4. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.	47
Tabla 5. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.	48
Tabla 6. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.	48
Tabla 7. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.	50
Tabla 8. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.	51
Tabla 9. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.	51
Tabla 1. Producción de enzimas extracelulares de cepas aisladas del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i>	76

Resumen

Los camarones del género *Penaeus* presentan enorme importancia comercial siendo los principales crustáceos cultivados en el mundo. Estos organismos han recibido mucha atención en cuanto a investigación científica, sin embargo, a menudo se pasa por alto los múltiples efectos que pueden atribuirse al componente microbiológico del sistema, debido a esto, existe poco conocimiento acerca del aporte que podría tener su microbiota en la digestión. Por tal motivo, en el presente trabajo se aisló a partir del estómago, hepatopáncreas e intestino de camarones *L. vannamei*, bacterias con la capacidad de producir diferentes enzimas extracelulares de potencial relevancia en el proceso digestivo de estos organismos. Se aislaron 64 cepas con actividad proteolítica, estas cepas se dividieron en 16 grupos con base en la presencia de características morfológicas semejantes, 4 grupos fueron aislados del intestino, 5 del hepatopáncreas y 7 del estómago. Se efectuó la identificación de las cepas aisladas por métodos moleculares (amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S) y por medio de criterios fenotípicos (tinción de Gram, pruebas catalasa y oxidasa, morfología celular y colonial), de esta forma se determinó que los aislamientos corresponden a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, grupos reportados previamente como parte de la comunidad microbiana del tracto digestivo del camarón. Cepas de ambos géneros fueron aisladas de los tres tejidos del tracto digestivo de *L. vannamei*. Por otra parte, se seleccionó un miembro de cada grupo morfológico para detectar la presencia de amilasas, lipasas/esterasas y quitinasas. En la mayoría de las cepas de estudio se observó la presencia de la totalidad de enzimas ensayadas, lo cual indica que la flora bacteriana de estos animales está compuesta por algunos grupos que tienen actividades multienzimáticas, esto vislumbra el potencial que tienen estos microorganismos para degradar los principales componentes de la dieta de *L. vannamei*.

Abstract

The shrimp of the *Penaeus* genus present a huge commercial importance since they are the main cultured crustaceans in the world. These organisms have received much attention regarding the scientific investigation; however, the multiple effects that can be ascribed to the microbiological component of the system are often overlooked, because of this, there is little knowledge about the contribution they could have its microflora in the digestion. For this reason, in this paper, bacteria with the ability to produce different extracellular enzymes of potential relevance in the digestive process of these organisms were isolated from the *L. vannamei* shrimp stomach, hepatopancreas, and intestine. 64 strains with proteolytic activity were isolated. These strains were divided into 16 groups based on the presence of similar morphological characteristics, 4 groups were isolated from the intestine, 5 from the hepatopancreas, and 7 from the stomach. The identification of the isolated strains was made by molecular methods (amplification and sequencing of the ribosomal gene 16S) and by phenotypical criteria (Gram staining, catalase and oxidase tests, cellular and colonial morphology), thus determined that the isolations correspond to the *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* genera, groups reported previously as part of the microbial community of the digestive tract of shrimp. Strains from both genera were isolated from the three tissues of the digestive tract from *L. vannamei*. On the other hand, one member of each morphological group was selected to detect the presence of amylases, lipases/esterases and chitinases. In most of the study strains, the presence of all tested enzymes was observed, which indicates that the bacterial flora of these animals is composed by some groups that have multienzymatic activities. This makes out the potential these microorganisms have to degrade the main components of the diet from *L. vannamei*.

Introducción

Uno de los principales recursos para la acuicultura a nivel mundial es el camarón (FAO 2008), es por ello, que estos organismos han sido objeto de diversas investigaciones, sin embargo, aun falta un mejor entendimiento acerca de su fisiología y metabolismo tomando en cuenta las características de su ambiente y los organismos con los que se interrelacionan.

En algunos estudios se ha reportado que las bacterias que habitan en el tracto digestivo de organismos acuáticos, pueden proveer al hospedero de materiales fisiológicamente activos, al participar en la descomposición de nutrientes mediante la producción de enzimas extracelulares. En el caso particular del camarón, existe poco conocimiento acerca del aporte que pudiera tener su microbiota en el proceso de digestión.

Los camarones peneidos son omnívoros y algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras, por tanto, estos animales poseen una amplia gama de posibilidades bioquímicas para utilizar diversos sustratos energéticos contenidos en su dieta (Rosas y Carrillo, 2006). En el caso de la especie *L. vannamei* se trata de organismos con elevados requerimientos proteicos debido al uso preferencial de la proteína dietética sobre los carbohidratos como fuente energética. Sin embargo, los carbohidratos también son utilizados, principalmente como fuente de energía metabólica directa, como fuente para la síntesis de quitina y para la síntesis de ácidos nucleicos (Gaxiola *et al.*, 2006). Por otra parte, los lípidos además de ser una fuente energética, son elementos esenciales en la estructura y función de las células, son precursores de hormonas esteroides y de mediadores intercelulares y son además, necesarios para el crecimiento, la maduración y la producción de nauplios (Rosas y Carrillo, 2006).

Por esta razón, en el presente trabajo, se pretende aislar a partir del estómago, hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei*, bacterias con la capacidad de producir diferentes enzimas extracelulares de potencial relevancia en el proceso digestivo de estos organismos, al ser capaces de degradar los principales componentes de la dieta del camarón.

El conocimiento acerca de las capacidades enzimáticas que poseen las bacterias que habitan en el sistema digestivo de estos animales, puede servir como base para estudios posteriores que permitan aprovechar su potencial como probables probióticos además de la optimización en la formulación de los alimentos suministrados durante el cultivo, con la finalidad de minimizar los costos de producción e incrementar la digestibilidad del alimento.

“FLORA BACTERIANA FUNCIONAL EN EL TRACTO DIGESTIVO DEL CAMARÓN BLANCO *L. vannamei*. UN ESTUDIO ENFOCADO A SU PARTICIPACIÓN EN LA DIGESTIÓN “

1. Antecedentes

1.1. Hábitos alimenticios, morfología del aparato digestivo y digestión en *Litopennaeus vannamei*

Los camarones peneidos son omnívoros y algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras. En estudios del contenido estomacal realizados en diferentes especies, se han encontrado poliquetos, crustáceos, algas y detritos (Rosas y Carrillo, 2006). Los detritos proporcionan un aporte alimenticio relevante para la dieta de estos animales (Nunes *et al.* 1997) y están asociados con microorganismos, los cuales constituyen del 5 al 10% de la masa detrital en peso (Moriarty, 1997).

El aparato digestivo del camarón y de los crustáceos en general se divide en tres partes, intestino anterior (estomodeo), intestino medio (mesenterón) e intestino posterior (proctodeo). El estomodeo y el proctodeo están cubiertos de quitina y ésta se pierde en cada muda. El intestino medio no está cubierto de quitina y se conforma de parte intestinal y hepatopáncreas. Posterior a la boca se encuentra el esófago y luego el estómago, el cual se divide en dos cámaras, la cardíaca (anterior) y la pilórica (posterior), éstas se encuentran separadas por una válvula cardio-pilórica. La cámara cardíaca sirve de receptáculo de los alimentos ingeridos, en su parte posterior se encuentran piezas calcáreas, sedas, espinas, filtros y repliegues por los cuales pasan los alimentos en el transcurso de sucesivas moliendas. Los alimentos se desplazan por el intestino, las partículas de gran tamaño se quedan en la cámara cardíaca y son dirigidas por movimientos musculares hacia la parte dorsal de ésta, en donde son trituradas por el molino gástrico (piezas masticadoras del estómago). Las partículas suficientemente pequeñas pasan a la cámara pilórica y son finalmente filtradas por sedas muy cerradas entrando al hepatopáncreas. Las partículas más gruesas son retenidas por un filtro a la entrada del hepatopáncreas y son dirigidas

posteriormente hacia el intestino, donde son cubiertas por una membrana de mucopolisacáridos (membrana peritrófica), dando lugar a las heces fecales (Gamboa-Delgado, 2001; Díaz *et al.*, 2006; Herrera, 2008).

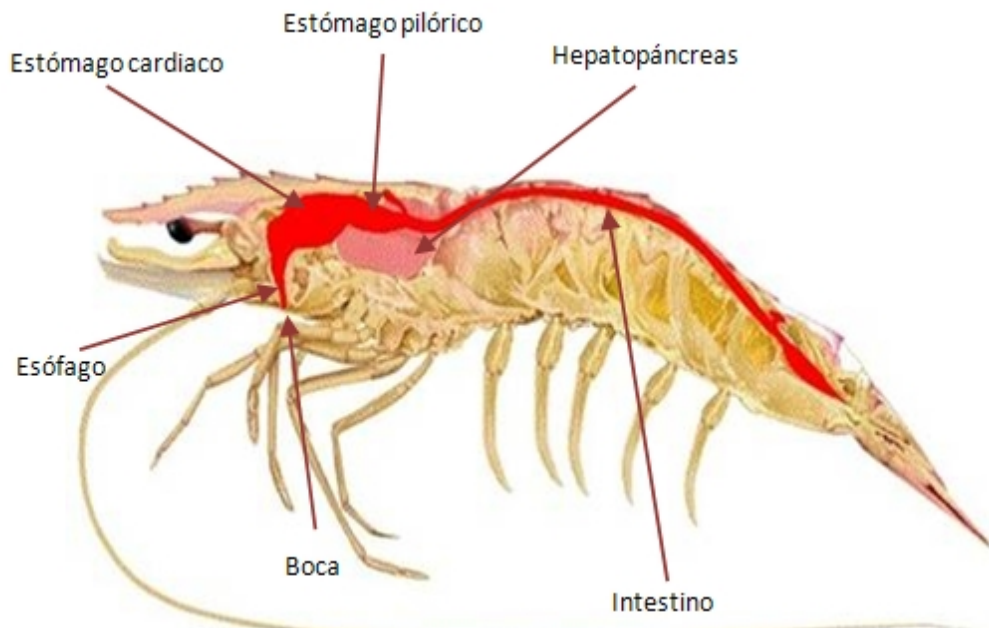


Figura 1. Esquema del tracto digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei*

En el estómago es donde los alimentos ingeridos se convierten en un fluido y se produce la mayor parte de la digestión química. La degradación química de los alimentos se realiza por medio de la acción de enzimas digestivas provenientes del hepatopáncreas. El hepatopáncreas tiene tres funciones principales: secreción y síntesis de enzimas digestivas, retención temporal y cíclica de reservas y absorción de nutrientes productos de la digestión. El hepatopáncreas tiene dos lóbulos separados, los cuales están compuestos por hileras de túbulos ciegos que vierten, por el extremo abierto, sus productos de secreción al estómago. Cada lóbulo está conectado ventralmente con el tubo digestivo en la unión del estómago pilórico y la parte anterior del intestino. Las paredes de los túbulos están constituidas por células de varios tipos: células de absorción y de acumulación, células secretoras, células embrionarias y células fibrilares (Cruz, 1996).

El sistema digestivo de los crustáceos presenta un pH que varía entre 5.0 y 7.0. La expresión de los genes codificantes de las enzimas digestivas es afectada por una serie de factores limitantes como son: Parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno, salinidad y temperatura), edad y tamaño del organismo, ayuno, ingredientes de la dieta, nivel y fuente proteica, nivel y tipo de aglutinantes, aditivos promotores de crecimiento, cantidad y frecuencia de alimentación, ritmos circadianos, ciclo de muda e incluso ha sido reportado que el agua de cultivo ejerce un efecto estimulante sobre la actividad enzimática digestiva (Molina *et al.*, 2002).

La habilidad de estos animales para utilizar diferentes sustratos energéticos está estrechamente relacionada con las necesidades de materia y energía, la capacidad de almacenamiento y la capacidad adaptativa de las enzimas digestivas (Rosas *et al.*, 2000)

En su dieta estos organismos tienen altos requerimientos proteicos pues son capaces de obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de los aminoácidos que de los carbohidratos (Tacon, 1989; García Galano, 2006). En los camarones peneidos se han encontrado actividades análogas a la tripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas. La tripsina representa por sí sola el 60% de la actividad proteolítica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. Por otra parte, hay evidencias de una actividad de tipo quimiotripsina en varias especies de crustáceos, pero ésta es generalmente débil (Cruz, 1996).

Estos animales no requieren glucosa en su dieta ya que esta puede provenir de la neogluconeogénesis a partir de los aminoácidos, sin embargo, estos organismos poseen las enzimas necesarias para la digestión de los polisacáridos de su dieta tales como el almidón y la quitina (Gaxiola *et al.*, 2006). Entre las carbohidrasas presentes en crustáceos se encuentran: las α y β amilasas, β -galactosidasas y quitinasas. De manera general se sabe que los crustáceos tienen una baja capacidad para utilizar los glúcidos (Cruz, 1996; Guevara, 2003).

En estos organismos los lípidos además de ser una fuente energética, son elementos esenciales en la estructura y función de las células, son precursores de hormonas esteroides

y de mediadores intercelulares y son además, necesarios para el crecimiento, la maduración y la producción de nauplios. Los crustáceos tienen la capacidad de almacenar lípidos y de sintetizarlos a partir de carbohidratos (Rosas y Carrillo, 2006). La presencia de una verdadera lipasa en crustáceos sólo ha sido demostrada en pocas especies, sin embargo, otras enzimas (esterasas inespecíficas) pueden ser las responsables de la actividad lipolítica registrada (Carrillo y González, 2000).

1.2. Contribución de la flora bacteriana en la digestión de organismos acuáticos

La distribución de las bacterias en el medio marino es muy amplia, siendo extraordinariamente abundantes, en correspondencia a la gran cantidad de vida animal y vegetal que ahí existe, se les encuentra desde la superficie del mar hasta las grandes profundidades, localizándose más abundancia a los 5000 metros, donde están preferentemente en el fondo, mezcladas con los detritos. Estos microorganismos constituyen un componente esencial de las redes tróficas de los ecosistemas marinos ya que tienen la función de desintegrar la materia orgánica proveniente de las excreciones o de los restos de animales y plantas para formar nutrientes, por otra parte, son productores de materia orgánica a través de procesos de quimiosíntesis, constituyendo el alimento de diversos organismos (López y Zaballos, 2005). Este tipo de bacterias son generalmente psicrotróficas y halotolerantes, poseen procesos metabólicos adaptados a bajas temperaturas y realizan sus actividades en altas concentraciones de sales, pHs alcalinos e incluso condiciones anóxicas.

Una característica particularmente interesante de este tipo de microorganismos es que son productores de diversas enzimas extracelulares (Sánchez *et al.*, 2004). Entre las exoenzimas producidas por bacterias marinas se incluyen amilasas, glucamilasas, glucoisomerasas, pectinasas, agarasas, quitinasas, alginasas, lipasas, esterazas y proteasas (Stanley y Stanley, 1986; León *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2004).

El aislamiento de bacterias productoras de sustancias bioactivas en ambientes marinos se ha realizado en estudios que generalmente se enfocan al uso biotecnológico de las enzimas

bacterianas principalmente en la industria alimentaria (Stanley y Stanley, 1986, Simon y McQuaid, 1999; León *et al.*, 2000; Mohapatra *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2004; Ochoa y Olmos, 2006; Shivanand y Jayaraman, 2009).

Otros estudios efectuados en relación con las bacterias marinas son aquellos que pretenden aportar información sobre las funciones de la flora bacteriana del tracto digestivo de organismos acuáticos, dado su potencial para la aplicación en la acuicultura.

Existen trabajos que reportan que la microbiota que vive en asociación con animales acuáticos quizá incrementa el crecimiento y supervivencia del hospedero por la producción de algunas enzimas digestivas, la exclusión competitiva de bacterias patógenas y proveyendo de compuestos esenciales importantes para el metabolismo del hospedero (Pangastuti *et al.*, 2010). Estos estudios se han efectuado principalmente en peces.

Sugita *et al.* (1997) evaluaron la capacidad de producir amilasas por parte de la microbiota del tracto digestivo de cinco especies de peces cultivados. Bacterias del género *Aeromonas* y la familia Bacteroidaceae fueron predominantes en 4 de las 5 especies de peces analizadas. De las 206 cepas examinadas, 65 (31.6%) produjeron amilasas. Una alta producción de amilasas se encontró en 12 cepas, 11 del género *Aeromonas* y 1 del género *Pseudomonas*. Estos autores sugieren que en particular en las especies de peces estudiados, la amilasa producida por la microbiota intestinal juega un papel importante en la digestión del almidón, que es el principal ingrediente en el alimento de peces.

Erasmus *et al.* (1997) evaluaron las enzimas polisacarolíticas del abulon *Huliotis midue* y su microbiota. Se hizo una comparación entre los niveles de actividad polisacarolítica en el tracto digestivo de organismos tratados con antibióticos y organismos no tratados, se encontró que los abulones por si mismos sintetizan sus propias agarasas, carragenasas, alginato liasas y laminarinasas, por otra parte, se determinó que las bacterias aisladas del intestino de *H. midue* son capaces de degradar los polisacáridos laminarina, carboximetilcelulosa, alginato y agarosa. Estos autores proponen que las bacterias de *H. midue* pueden participar en la digestión de los polisacáridos antes mencionados.

Simon y McQuaid (1999) analizaron la actividad de las bacterias del intestino de los mejillones *Perna perna* y *Choromytilus meridionalis* sobre diez carbohidratos estructurales y de almacenaje. *C. meridionalis* albergo grandes poblaciones de bacterias las cuales hidrolizaron carbohidratos más eficientemente que las de *P. perna*. La actividad fue constante pero baja sobre los carbohidratos manano y carboximetilcelulosa y esporádica sobre los otros compuestos estructurales. La presencia esporádica de bacterias las cuales digieren la mayoría de carbohidratos estructurales y su asociación con el contenido del intestino indica que esas bacterias son transitorias.

Ramirez y Dixon (2003), aislaron e identificaron bacterias anaerobias obligadas de la flora intestinal de los peces *Pterophyllum scalare*, *Astronatus ocellatus* y *Paralichthys lethostigma*. Los aislamientos mostraron actividad de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina, esterasas, lipasas y glucosidasas. Principalmente los géneros de bacterias Gram negativas produjeron enzimas para el rompimiento de carbohidratos, mientras que el género *Clostridium* secreta enzimas para la hidrólisis de proteínas. Los datos de este estudio demuestran que las bacterias anaeróbicas intestinales producen una variedad de enzimas, las cuales pueden facilitar el proceso digestivo en peces.

Izvekova (2006) estudió la capacidad de las bacterias que colonizan las superficies de transporte digestivo en el intestino del pez *Abramis brama* y el platelminto parásito *Caryophyllaeus laticeps* para producir enzimas que hidrolicen las proteínas y carbohidratos del alimento, así como el posible papel de estas bacterias en la digestión del hospedero y el parásito. Aparentemente la función de los microorganismos encontrados puede variar dependiendo de la llegada de nutrientes al intestino, la hidrólisis de los polímeros se incrementa durante la alimentación activa de los peces, mientras que las bacterias pueden competir con el hospedero y el parásito por los monómeros disponibles en tasas de alimentación bajas. Se encontraron bacterias que secretan enzimas que hidrolizan carbohidratos complejos y disacáridos lo cual puede reducir el gasto metabólico de los organismos de estudio para la síntesis de sus propias hidrolasas, mientras que la glucosa resultante puede ser usada por todos los miembros de la comunidad establecida.

Kar y Ghosh (2008), aislaron bacterias heterotróficas del tracto gastrointestinal de los peces *Labeo rohita* y *Channa punctatus* con la finalidad de determinar su importancia en la nutrición del hospedero. Se encontraron bacterias con actividad amilolítica, proteolítica y celulolítica. Actividad de proteasa y celulasa fueron exhibidas por todas las bacterias aisladas, mientras que la producción de amilasa fue pobremente detectada para las cepas aisladas de *Channa punctatus*. Los resultados de este estudio indican una probable contribución enzimática por parte de las bacterias del estómago de peces.

1.3. Métodos de identificación bacteriana

1.3.1. Identificación de microorganismos mediante criterios genotípicos

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. Estas técnicas son dependientes del cultivo bacteriano y no son aplicables para identificación de bacterias directamente de las muestras. En ningún caso, los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta. Únicamente indicarán cuál es el género y/o la especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer. La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos, existen limitaciones en las bases de datos, se requiere de mucho tiempo, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos (Cercenado y Cantón, 2010). En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión (Rodicio y Mendoza, 2004).

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más utilizada para estudios de filogenia y taxonomía bacterianas, su aplicación fue propuesta por Carl Woese en la década de 1970. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500nt también denominado ADNr 16S, se encuentra altamente conservado, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contiene además variaciones que se concentran en zonas específicas (Rodicio y Mendoza, 2004). Entre las copias de los ARNr 16S codificadas por un mismo genoma se ha determinado un cierto grado de variabilidad (microheterogeneidad), la cual tiene implicaciones importantes para la identificación, aunque en la mayor parte de los casos, todas las copias del ADNr 16S de un organismo son idénticas o casi idénticas (Klappenbach, 2001).

Otras características importantes de esta molécula son:

1. Es una molécula muy antigua, se encuentra presente en todas las bacterias actuales.
2. Su estructura y función ha sido constante durante un tiempo prolongado.
3. Contiene suficiente variabilidad para diferenciar los organismos más próximos. En el caso de bacterias, identificación a nivel de género e incluso de especie.
4. Resulta relativamente fácil de secuenciar.
5. Existen amplias bases de datos en continuo crecimiento que contienen secuencias de ARNr 16S.

El método para la identificación bacteriana con secuencias de ARNr 16S está constituido por tres pasos:

1.3.1.1. Amplificación del gen 16S a partir de una muestra

Se realiza mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El ADN se puede extraer a partir de un cultivo puro, una muestra ambiental o un tejido, la amplificación también se puede conseguir directamente a partir de una colonia aislada o un cultivo líquido de la cepa. Cuando se desea amplificar el gen del ARNr 16S completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, obteniéndose amplicones de aproximadamente 1500pb. También se pueden usar iniciadores

que amplifiquen fragmentos de menor tamaño, de preferencia las 500pb del extremo 5' del gen ya que aquí se concentra la mayor variabilidad (Rodicio y Mendoza, 2004).

1.3.1.2. Secuenciación

La secuenciación del producto de la amplificación se puede efectuar por:

- El método enzimático de di-deoxi (terminación de la cadena) desarrollado por Sanger en 1977.
- El método por ciclos térmicos.
- El método químico.
- Por secuenciación automática.

1.3.1.3. Análisis bioinformático de la secuencia

Esta etapa consiste en la comparación de la secuencia del ADNr 16S de la muestra de interés con las secuencias depositadas en las bases de datos. Existen diversas bases de datos como la del Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology), RDP (Ribosomal Database Project), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) entre otras (Schmidt y Relman, 1994). Finalmente, con las homologías encontradas para la secuencia analizada se puede construir un árbol filogenético, que permita validar los resultados obtenidos mediante el análisis bioinformático para poder asignar con mayor certeza la muestra de estudio dentro de un género bacteriano.

1.3.2. Identificación de microorganismos mediante criterios fenotípicos

La mayor parte de las descripciones fenotípicas utilizadas se basan en pruebas que establecen la morfología y las propiedades metabólicas de la bacteria aislada (Forbes *et al.*, 2009). Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, como

la morfología en la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo, pruebas de oxidasa y catalasa. Utilizando estas pocas pruebas generalmente es posible situar a las bacterias, de manera provisional, en uno de los principales grupos bacterianos (Cercenado y Cantón, 2010).

1.3.2.1. Morfología macroscópica (colonial)

Las diferencias en la morfología colonial son muy útiles para separar las bacterias en un cultivo mixto y sirven además como claves de su identidad.

Los criterios utilizados para caracterizar la morfología de la colonia son:

1. Tamaño de la colonia (calculado en milímetros o descrito en términos relativos como cabeza de alfiler, pequeño, medio, grande).
2. Pigmentación de la colonia
3. Forma colonial (forma, elevación y borde)
4. Superficie de la colonia (brillante, opaca, mate, transparente)

Las colonias de una especie bacteriana pueden presentar características indistinguibles de las de otras especies, o en algunos casos las bacterias de la misma especie pueden ser morfológicamente diversas (Forbes *et al.*, 2009).

1.3.2.2. Morfología microscópica y características de tinción

1.3.2.2.1. Tinción de Gram

Esta es una técnica de tinción diferencial que permite agrupar las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas de acuerdo con la estructura y grosor de la pared bacteriana. Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglucano (disacáridos y aminoácidos), mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de

peptidoglucano y poseen una membrana de lipopolisacáridos como parte de su pared celular (Murray *et al.*, 2006).

Existen variaciones de esta técnica que implican cambios en los reactivos y en los tiempos, sin embargo, de forma general involucra los siguientes pasos:

1. Fijar las células bacterianas a la superficie de un portaobjetos por calor o con metanol.
2. Las células se tiñen con cristal violeta (metil rosanilina o violeta de genciana) que funciona como colorante primario. Las células se tiñen de morado.
3. Se adiciona lugol (yoduro) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. Las células continúan de color morado.
4. Se adiciona un solvente no polar, para el lavado del complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. Las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras.
5. Se vuelve a teñir con safranina o fucsina, las bacterias Gram negativas que habían sido decoloradas, se tiñen de rosa, rojo o fucsia según el colorante empleado, mientras que las bacterias Gram positivas no se afectan con la tinción de contraste.

Los diferentes tipos de bacterias reaccionan de modo distinto frente a la tinción de Gram porque las diferencias estructurales en sus paredes determinan la retención o el escape de la combinación de cristal violeta y yoduro. Cuando a las células bacterianas se les aplica el cristal violeta y luego el lugol estas sustancias ingresan con facilidad en las células, en cuyo interior se combinan formando un complejo cristal violeta-yoduro, este complejo es más grande que la molécula de cristal violeta que ingresó en las células y por tal motivo no puede ser eliminado por el agregado del solvente no polar a la capa de peptidoglucano intacta de las células Gram positivas, es decir, las células Gram positivas retienen el color del colorante cristal violeta. En las células Gram negativas el solvente no polar altera la capa externa de lipopolisacáridos y el complejo cristal violeta-yoduro se elimina de la capa delgada de peptidoglucano (Tortora *et al.*, 2007). Algunas bacterias son Gram variables, pues de manera simultánea presentan tinción de Gram positiva y negativa, aun en

condiciones de cultivo óptimas, en estos casos las bacterias tienen una pared de Gram positivas aunque la capa de peptidoglucano es más delgada que en la mayoría de las bacterias Gram positivas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Un factor que puede influir en que las bacterias Gram positivas se observen parcial o completamente rosadas, es la edad del cultivo, ya que las células viejas tienden a perder su capacidad de retener el complejo cristal violeta-yoduro y por lo tanto las bacterias se ven rosadas, otro factor que puede tener este efecto es que el cultivo se encuentre bajo condiciones de estrés, esto puede generar formas Gram negativas dentro de un cultivo de bacterias Gram positivas. Los resultados de la tinción de Gram son más uniformes cuando se utiliza en bacterias jóvenes, en etapa de crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2005).

Con esta técnica además se puede determinar la morfología bacteriana (cocos, bacilos, cocobacilos etc.) y la disposición de las células (cadenas, pares, racimos etc.). Algunas veces, estas características se relacionan con el género y en ocasiones con una especie determinada (Montoya, 2008).

1.3.2.3. Propiedades metabólicas

1.3.2.3.1. Prueba de la catalasa

Esta prueba se realiza con la finalidad de comprobar la presencia de la enzima catalasa, esta enzima se encuentra en la mayor parte de las bacterias aerobias o anaerobias facultativas que contienen citocromo. Generalmente si un microorganismo no posee el sistema citocromo carecerá también de la enzima catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias poseen peroxidasa en lugar de catalasa. El peróxido de hidrógeno se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares, si se deja acumular es tóxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa tiene como función descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular u oxidar los sustratos secundarios. Aparte del peróxido de hidrógeno otros compuestos pueden ser usados como

sustratos por la catalasa: alcoholes (etanol), formaldehído hidratado, ácido nitroso, ácido fórmico, aminas aromáticas, fenoles y ácidos aromáticos. Como reactivo para la reacción se utiliza una solución de H₂O₂ al 3%, la reacción es positiva al desprenderse burbujas al contacto de las células bacterianas con la solución de peróxido de hidrógeno (Mac Faddin, 2003; Forbes *et al.*, 2009).

1.3.2.3.2. Prueba de la oxidasa

Esta prueba se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa el cual activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de varios sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones, el oxígeno es el aceptor de hidrógeno final, produciendo a partir del hidrógeno agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana y su sistema enzimático. Las oxidasas catalizan la eliminación del hidrógeno de un sustrato pero sólo utilizan oxígeno como aceptor de hidrógeno. Los organismos anaerobios obligados carecen de actividad oxidasa porque no pueden vivir en presencia de oxígeno atmosférico y por tanto no poseen el sistema citocromo-oxidasa. Algunos microorganismos poseen solamente una oxidasa, otros pueden producir 2 o 3. Los diversos colorantes reactivos de la prueba de oxidasa son aceptores artificiales de electrones, la reacción de oxidasa final brinda un producto coloreado. Existen varias opciones de reactivos para esta prueba: Reactivo de Kovacs (Diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%); reactivo de Gordon y McLeod (Diclorhidrato de dimetil-*p*-fenilendiamina); reactivo de Nadi (una mezcla de partes iguales de α -naftol al 1% en alcohol etílico de 95° y aminodimetilanilina al 1%); Reactivo de Carpenter, Suhrland y Morrison (Oxalato de *p*-aminodimetilanilina al 1%); Discos impregnados con oxidasa (Mac Faddin, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005).

Considerando lo anteriormente descrito, el presente trabajo ha sido dividido en dos capítulos y tiene los siguientes objetivos:

2. Objetivos

2.1. General

Conocer si las bacterias cultivables que habitan el tracto digestivo del camarón blanco *L. vannamei* presentan actividades enzimáticas relacionadas con su proceso digestivo.

2.2. Específicos

- Aislar e identificar cepas bacterianas con actividad proteolítica a partir del estómago, hepatopáncreas e intestino del camarón *L. vannamei*.
- Determinar si las cepas aisladas producen otras enzimas de potencial relevancia en la digestión del camarón (amilasas, lipasas/esterasas, quitinasas).

CAPITULO I

Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica del tracto digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

1. Introducción

En México una de las actividades que ha adquirido mayor importancia en los últimos años es la acuicultura, de manera particular, el cultivo de camarón constituye por su derrama económica y capacidad de generar divisas y empleos directos e indirectos, el cultivo más importante (Alvarez *et al.*, 1998; Escutia Zúñiga, 1998).

Sin embargo, el costo del alimento es por lo general alto, llegando a representar hasta el 50% del gasto de producción, dependiendo del sistema de cultivo utilizado, manejo, calidad del agua y tipo de alimento, por este motivo es relevante encontrar estrategias que permitan disminuir los gastos generados por este rubro, además es trascendental desarrollar la acuicultura bajo prácticas sustentables, para alcanzar estos objetivos es necesario estudiar los procesos metabólicos, relacionados con la digestión y asimilación del alimento, dicha información permite dirigir la elaboración de alimentos poco contaminantes y de bajo costo (Escutia Zúñiga, 1998; Molina *et al.*, 2000).

Los camarones son organismos con elevados requerimientos proteicos debido a sus hábitos alimenticios (omnívoros o detritívoros) así como al uso preferencial de la proteína dietética sobre los carbohidratos como fuente energética, ya que son capaces de obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de proteínas que de los carbohidratos (Tacon, 1989; García Galano, 2006). En cuanto a los requerimientos proteicos de *L. vannamei* se han observado amplias variaciones en los valores obtenidos por diferentes investigadores para el mismo estadio de desarrollo, Pedrazzoli *et al.* (1993) le asignan un requerimiento de 40%, Cousin *et al.*, (1991) de 30% y Ararykananda y Lawrence (1993) de 15% (García Galano, 2006). En los crustáceos la presencia de enzimas proteasas en el tracto digestivo es determinante en la digestibilidad y la eficiencia de la asimilación de las proteínas ingeridas,

dentro de estas enzimas la tripsina es la más importante debido a que interviene en un 50 a 60% de la hidrólisis proteica (Gamboa Delgado, 2001).

Existen diversos estudios en los cuales se ha comprobado que las bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de organismos acuáticos pueden participar en la descomposición de nutrientes por la producción de enzimas digestivas, además de proveer al hospedero de compuestos esenciales para su metabolismo (Sugita *et al.*, 1997; Ramírez y Dixon, 2003; Izvekova, 2006; Kar y Ghosh, 2008).

En ambientes marinos, la búsqueda y aislamiento de cepas de bacterias nativas productoras de sustancias bioactivas se ha realizado a partir de diversas muestras (Simon y McQuaid, 1999; León *et al.*, 2000; Mohapatra *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2004), en el caso particular de este trabajo se pretende aislar a partir del tracto digestivo de camarones *L. vannamei*, bacterias que presenten actividad proteolítica, ya que la proteína es el principal nutriente limitante para el crecimiento en camarones peneidos, de esta forma se pretende inferir el posible aporte que pudieran tener estos microorganismos en la digestión del camarón.

2. Materiales y Métodos

Con la finalidad de encontrar cepas bacterianas que presenten actividad proteolítica a partir de los tejidos del tracto digestivo del camarón se efectuará lo siguiente:

2.1. Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica. Elaboración de un medio de cultivo

Como medio de cultivo se utilizará el agar marino (Difco) suplementado con caseína. Se realizarán pruebas con diferentes fuentes de caseína.

2.1.1. Medio con caseína pura

Se disolverá el agar marino (55.1g/L) en agua destilada por calentamiento hasta ebullición, por separado se diluirá la caseína (10g/L) en agua destilada ajustando el pH a 8 para facilitar la dilución, luego se mezclará con el agar marino y se esterilizará a 121°C durante 15 min. El medio se dejará enfriar a 50-55°C y luego se vaciará en cajas petri estériles. Una vez gelificado el medio, las cajas serán sometidas a prueba de esterilidad colocándolas en una incubadora a 37°C durante 24 horas, con la finalidad de descartar aquellas cajas que se encuentren contaminadas con algún microorganismo.

2.1.2. Medio con leche en polvo

Se mezclará el agar marino (55.1g/L) con la leche en polvo (10g/L) y se diluirá en agua destilada por calentamiento hasta ebullición, luego se esterilizará a 121°C durante 15 min. El medio se dejará enfriar a 50-55°C y luego se vaciará en cajas petri estériles. Una vez que el medio gelifique las cajas serán sometidas a prueba de esterilidad colocándolas en una incubadora a 37°C durante 24 horas, con la finalidad de descartar aquellas cajas que se encuentren contaminadas.

2.1.3. Medio con leche líquida

Se disolverá el agar marino (55.1g/L) en agua destilada por calentamiento hasta ebullición, luego se esterilizará a 121°C durante 15 min, por otra parte, la leche (60ml/L) se vaciará en condiciones estériles en un vaso de precipitado y se someterá a calentamiento hasta alcanzar los 55°C, una vez que la leche y el medio se encuentren a la misma temperatura se mezclarán homogéneamente con cuidado de no formar burbujas y la solución resultante se vaciará en cajas petri estériles. Una vez gelificado el medio, las cajas serán sometidas a prueba de esterilidad colocándolas en una incubadora a 37°C durante 24 horas, con la finalidad de descartar aquellas cajas que se encuentren contaminadas con algún microorganismo.

2.2. Material biológico

En condiciones estériles se realizará la disección de 10 camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* procedentes de los estanques de crianza de la UMDI-Sisal UNAM, los cuales son alimentados con pellet comercial y se encuentran en cultivo tipo biofloc. De estos camarones se obtendrá el hepatopáncreas, estómago e intestino. Por cada tipo de tejido se elaborará una mezcla de la cual se determinará el peso y en base a esto se realizará la primera dilución manteniendo una relación 1:10 (1g de tejido/9ml de solución estéril de NaCl al 2%), los tejidos se fragmentarán con ayuda de tijeras estériles y se disolverán por agitación vigorosa, a partir de esta dilución se efectuarán diluciones seriadas hasta 10^{-5} .

2.3. Elección y aislamiento de cepas con actividad proteolítica

Se utilizarán las diluciones previamente elaboradas para sembrar en agar marino (Difco) suplementado con caseína. El método de siembra que se utilizará es el de extensión en placa que consiste en agregar 100 µl de dilución en una caja petri con medio y extender el líquido sobre la superficie de la caja con ayuda de un asa de Digrafsky hasta que el líquido sea absorbido por el medio, este procedimiento se efectuará por duplicado para cada una de las diluciones. Las cajas se incubarán a 27°C±1 durante 24 horas.

Finalizadas las 24 horas de incubación, se checaran las cajas para observar si existe crecimiento de diferentes colonias bacterianas con actividad proteolítica, las cepas de interés serán seleccionadas en base a la formación de un halo transparente alrededor de las colonias lo cual indica que la caseína ha sido hidrolizada, por cada colonia elegida se seleccionaran otras tres que presenten características morfológicas semejantes, ya que aun teniendo el mismo fenotipo podría tratarse de cepas distintas, cada una de estas colonias será resembrada en cajas petri con agar marino e incubadas a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas.

Las cepas seleccionadas se nombraran de la siguiente forma: la primera letra corresponderá al tejido en donde se haya encontrado la cepa (H:Hepatopáncreas; E:Estómago; I:Intestino), la segunda letra indicará el grupo morfológico al que se le asignó (cepas que poseen las mismas características morfológicas) y finalmente el dígito hará referencia al número de cepa que ocupa dentro de cada grupo morfológico. Las características morfológicas que se analizarán son: forma, borde, elevación, superficie, consistencia y pigmentación.

A partir de las colonias elegidas, se efectuarán las resiembras necesarias hasta obtener cepas puras. El método que se utilizará es el de siembra por estriado, que consiste en tomar una colonia utilizando un asa de siembra estéril y pasarla a otra caja de petri haciendo estrías sobre el agar, esto con la finalidad de observar colonias separadas las cuales pueden ser tomadas y sembradas individualmente en nuevas cajas obteniendo de esta forma cepas puras. Para cada resiembra las condiciones de incubación serán de 24 horas a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$.

2.4. Conservación de las cepas

Una vez obtenida la totalidad de cepas puras, se procederá a sembrar una colonia de cada una de estas en tubos con 5ml de caldo marino estéril, este procedimiento se efectuará por duplicado. Los tubos se incubarán a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas.

Finalizado el tiempo de incubación, se procederá a la elaboración de gliceroles, repartiendo el contenido de los tubos de ensayo en tubos criogénicos (1ml por tubo) y centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C , después de centrifugar se decantará el sobrenadante y se

adicionará 1ml de caldo marino con glicerol en una proporción 8:2, sometiendo luego a agitación para resuspender la pastilla. Los tubos serán almacenados a -80°C para los análisis posteriores.

2.5. Identificación molecular de las cepas aisladas

Para identificar los géneros a los que pertenecen las cepas aisladas, se recuperaran dichas cepas a partir de sus respectivos gliceroles de la siguiente manera: 1) Se inoculará 100 μl de cada glicerol en tubos con 5ml de caldo marino estéril, los tubos se incubaran a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas; 2) De los tubos inoculados se tomaran 50 μl y se inocularan nuevamente en tubos con 5ml de caldo marino estéril, los tubos se incubaran a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas; 3) Un asa estéril se sumergirá en cada tubo para tomar parte del inóculo y se sembrará por estriado en cajas con agar marino, las cajas se incubaran a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se observarán las cajas con la finalidad de constatar que no exista crecimiento de colonias bacterianas distintas a las de las cepas de estudio. En caso de existir contaminación, se tomará un nuevo glicerol y se repetirá el procedimiento antes descrito hasta obtener un cultivo puro.

Una vez que se tengan las colonias bacterianas se procederá a obtener ADN a partir de cada cepa de la siguiente manera: con ayuda de un palillo estéril se tomará una fracción de una colonia la cual se colocará en 7 μl de agua ultrapura y se calentará a baño maría a 90°C durante 20 min, enfriando luego en hielo. Este procedimiento será estandarizado de ser necesario.

Para la identificación molecular se amplificará parte de la secuencia del ARNr 16S de las cepas bacterianas utilizando los primers: 16SS (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Edwards *et al.*, 1989) y 16SR (5'-CGGGAACGTATTCACCG-3') (Strom *et al.*, 2002).

La reacción de amplificación se efectuará bajo el siguiente programa: 1 ciclo de 95°C -1 min; 30 ciclos de 95°C -1 min, 45°C -45 s, 72°C -1 min; 1 ciclo de 72°C -5 min; 1 ciclo de 4°C - ∞ , el volumen final de la reacción de PCR será de 25 μl conteniendo: 5 μl de 5X

colorless Gotaq Flexi buffer, 1.5 μ l de $MgCl_2$, 0.5 μ l de dNTPs, 1 μ l de cada primer, 0.2 μ l de Gotaq Hot Start Polimerasa, 13.8 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l de ADN.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se verificará la calidad del producto obtenido mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, del gel se cortarán las bandas con el amplicon de interés para purificar posteriormente.

Las purificaciones se realizarán con un kit comercial (Wizard sv gel and pcr clean-up system, Promega) bajo el siguiente protocolo: 1) Por cada 10 mg de gel se agregarán 10 μ l de solución de atrapado, los tubos se calentarán a 60°C por 10 min para derretir el gel; 2) La solución con el ADN se pasará a minicolumnas con tubos colectores y se centrifugará a 12000 rpm por 2 min, se decantará los residuos que queden en los tubos colectores; 3) Se lavarán las columnas con 700 μ l de la solución de lavado, se centrifugará a 12000 rpm por 2 min, se decantarán las columnas; 4) Se realizará otro lavado con 500 μ l de solución de lavado, se centrifugará a 12000 rpm por 6 min; 5) Se colocarán las columnas en tubos eppendorf de 1.5 ml, y se dejarán secar a temperatura ambiente por 25 min para evaporar los residuos de la solución de lavado; 6) En cada minicolumna se depositará 45 μ l de agua libre de nucleasas, se centrifugará a 12000 rpm por 2 min para recuperar el ADN. Los productos de la purificación serán analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y posteriormente se mandarán a secuenciar al IBT (Instituto de Biotecnología de la UNAM).

Las secuencias obtenidas serán analizadas en búsqueda de homologías en el Genbank mediante Nucleotide Blast y en el RDP (Ribosomal Database Project) con la finalidad de hacer una comparación entre los resultados. En el caso de la búsqueda con Nucleotide Blast, los parámetros que serán tomados en cuenta son el porcentaje de identidad máxima y el valor de E. De tal forma, que se elegirán aquellas secuencias que presenten un porcentaje de máxima identidad de 90% o superior, y que por otro lado tengan un valor de E bajo, ya que cuanto menor sea el valor de este último parámetro más significativo es un alineamiento en términos estadísticos. Por otra parte, para la búsqueda de homologías en el

RDP, los parámetros a considerar serán, la puntuación de similitud y la puntuación S-ab, se elegirán aquellas secuencias cuyos valores para dichos parámetros sean más cercanos a 1.

Para validar los resultados obtenidos se hará un análisis filogenético con el programa Winclada, utilizando el método Ratchet (Island Hopper), el cual se basa en el principio de parsimonia. Como grupo externo se utilizará una cepa tipo de *Micrococcus luteus*. La longitud de las secuencias alineadas se ajustará de acuerdo con la secuencia de estudio de mayor tamaño dado que los caracteres restantes no son de utilidad para el análisis, por otra parte, se elegirán y desactivarán aquellos caracteres que no sean informativos, posterior a esto se procederá a la creación de los árboles filogenéticos, se dejarán los parámetros que por defecto asigna Winclada para el análisis por medio de Ratchet. Se elegirá el árbol de consenso por mayoría, es decir, aquel árbol que se construye tomando en cuenta aquellos grupos monofiléticos que están presentes en más del 50% de los árboles iniciales. Los parámetros que se consideraran para evaluar el árbol filogenético resultante serán la longitud del árbol, el índice de consistencia (este índice es una estima de la cantidad de sinapomorfias y por tanto del grado de homoplasia) y el índice de retención. Será elegido aquel árbol que tenga un valor para estos índices cercano a 1 ya que esto indica alta consistencia y retención así como baja homoplasia.

2.6. Tinción de Gram

Por cada cepa se tomará parte de una colonia y se hará un frotis en un portaobjetos fijando mediante calor, los frotis se teñirán mediante la técnica de Gram de la siguiente forma: 1) Se agregará cristal violeta y se esperará un minuto, se lavará inmediatamente con agua destilada; 2) Se agregará lugol y se esperará un minuto, se lavará inmediatamente con agua destilada; 3) Se agregará alcohol-cetona, se esperará 30 segundos y se lavará con agua destilada; 4) Por último se agregará safranina, se esperará un minuto y se lavará con agua destilada. Los frotis se pondrán a secar a temperatura ambiente y posteriormente se

analizaran en el microscopio para determinar si se trata de bacterias Gram negativas o Gram positivas así como su respectiva morfología.

2.7. Pruebas bioquímicas

2.7.1. Catalasa

Para la prueba de catalasa se colocará una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en tubos de ensaye. En cada tubo se introducirá un palillo estéril con el que previamente se haya tomado una colonia bacteriana y se observará la reacción, siendo positiva si se forman burbujas.

2.7.2. Oxidasa

La prueba de oxidasa se realizará impregnando un fragmento de papel fieltro con reactivo de Kovacs y luego impregnando este con una colonia bacteriana, la reacción será positiva al observar coloración púrpura en el papel.

3. Resultados

3.1. Aislamiento de bacterias con actividad proteolítica. Elaboración de un medio de cultivo

De los tres medios de cultivo elaborados, en este trabajo se eligió agar marino suplementado con 6% de leche descremada líquida, debido a que tanto la caseína pura como la contenida en la leche en polvo se precipitan al ser sometidas a altas temperaturas y por otro lado no es posible esterilizarlas por filtración para agregarlas posteriormente al agar marino estéril. Con este medio se observó buen crecimiento de diferentes colonias bacterianas con y sin actividad proteolítica a las 24 horas de incubación. Las cepas sin actividad proteolítica se descartaron.

3.2. Elección y aislamiento de cepas con actividad proteolítica

Se aislaron un total de 64 cepas con actividad proteolítica contra la caseína a partir del tracto digestivo de *L. vannamei*, estas cepas se dividieron en 16 grupos con base en la presencia de características morfológicas semejantes, 4 grupos fueron aislados del intestino, 5 del hepatopáncreas y 7 del estómago, las bacterias fueron seleccionadas en base a la formación de halos de actividad (hidrólisis de la caseína) alrededor de las colonias como se observa en la figura 1.

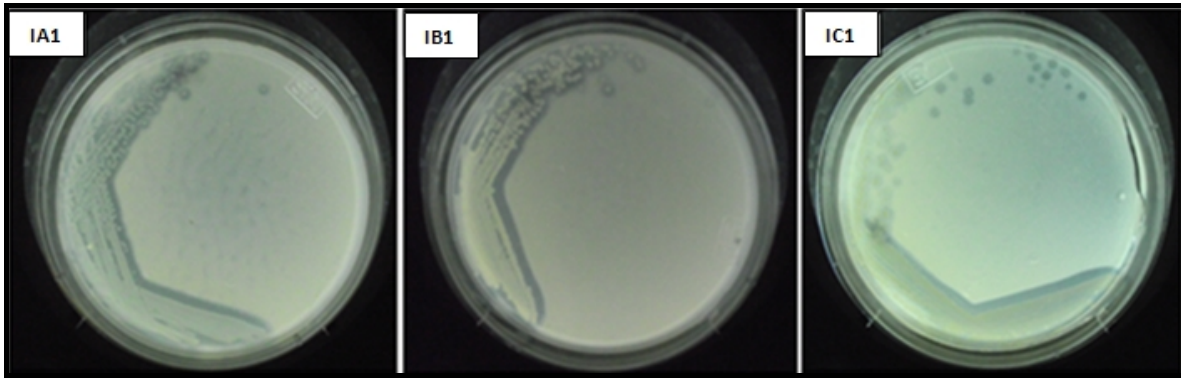


Figura 1. Fotos ejemplo de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína, que habitan en el intestino de *L. vannamei*.

3.3. Identificación de las cepas aisladas con actividad proteolítica

Para llevar a cabo la identificación molecular fue posible la recuperación de la totalidad de las cepas a partir de sus respectivos gliceroles, lo cual indica que el medio de cultivo utilizado para su conservación posee las condiciones necesarias para estos microorganismos, además se pudo constatar que los gliceroles no se encontraban contaminados con otros microorganismos.

La técnica de choque térmico para obtener ADN a partir de cepas puras de bacterias Gram negativas resulto ser efectiva para los fines del presente estudio. Sin embargo, para cada cepa fue necesario determinar la cantidad aproximada de colonia que se requería tomar para la extracción del ADN.

Utilizando los primers 16SS y 16SR se obtuvo un amplicon de aproximadamente 1300pb del gen del ARNr 16S de las cepas aisladas (figura 2). Posterior a la secuenciación y a partir del análisis bioinformático, para las homologías encontradas, se observaron valores iguales o mayores al 90% en el porcentaje de máxima identidad y valores de E cercanos a 0, en el caso del análisis realizado con Nucleotide Blast y valores cercanos 1 para la puntuación de similitud y puntuación S-ab con el análisis efectuado por medio del RDP,

dichas homologías corresponden a cepas de especies de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. Los resultados obtenidos son consistentes entre las 2 bases de datos utilizadas.

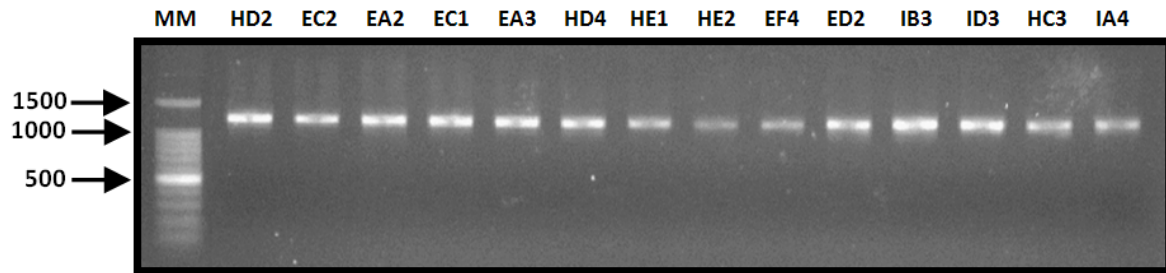


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de un segmento del gen del ARN ribosomal 16S mediante PCR. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2-15) Fragmento amplificado de algunas de las cepas de estudio. Se muestran los productos ya purificados.

Con las homologías encontradas para las cepas de estudio se procedió a realizar un análisis filogenético, las figuras 3 y 4 corresponden a los árboles obtenidos. El árbol de la figura 3 tiene una longitud de 317, el valor del índice de consistencia es de 70% y el del índice de retención de 95%, en el caso del árbol de la figura 4, este tiene una longitud de 307, un índice de consistencia de 60% y un índice de retención de 91%. Los resultados del análisis filogenético validaron lo obtenido con el análisis bioinformático.

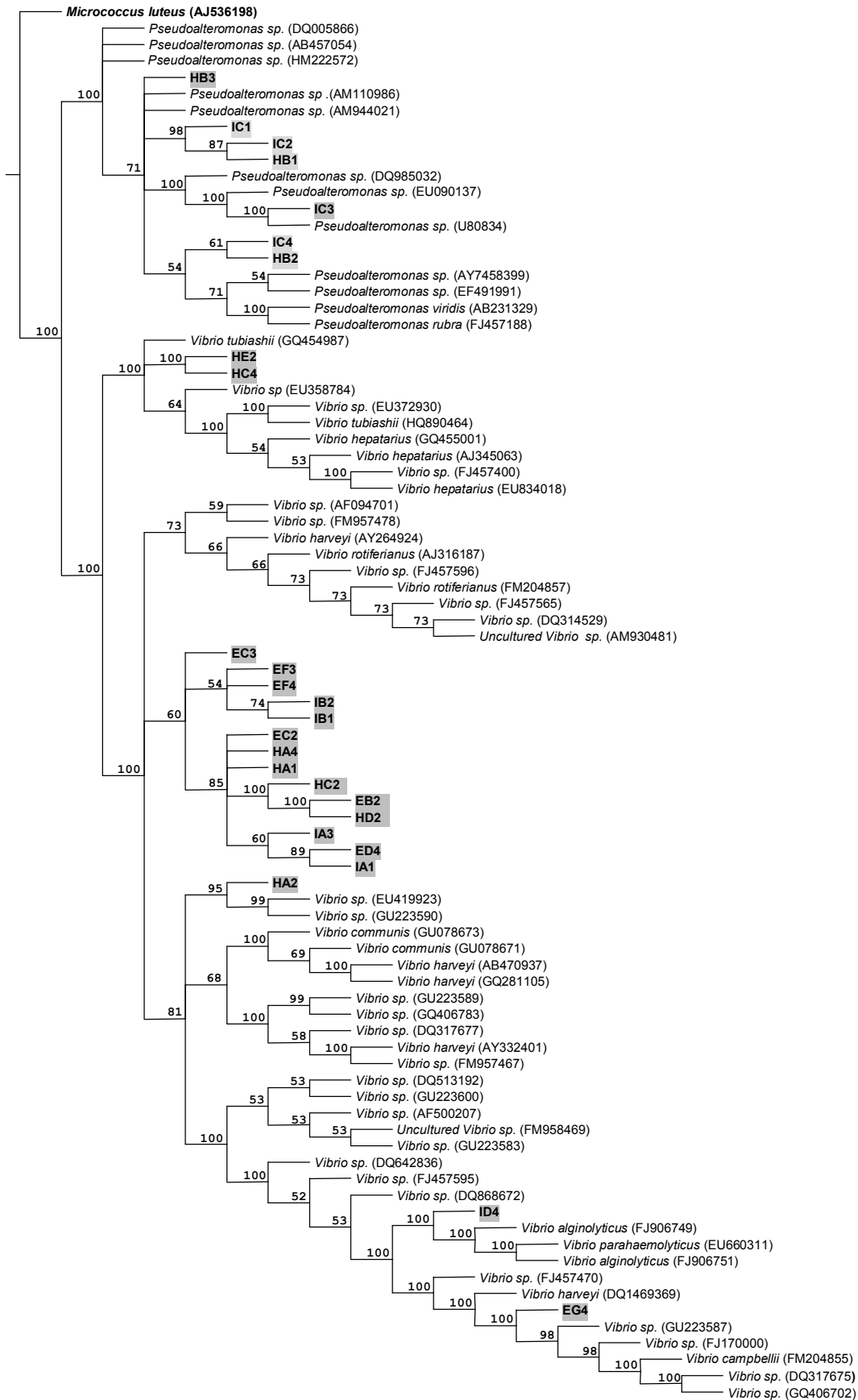


Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias del gen del ARN ribosomal 16S (método Ratchet; Longitud: 317; índice de consistencia: 70%; índice de retención: 95%), se muestra la relación filogenética de las secuencias de las cepas de estudio con otros grupos. *Micrococcus luteus* AJ536198 se uso como grupo externo.

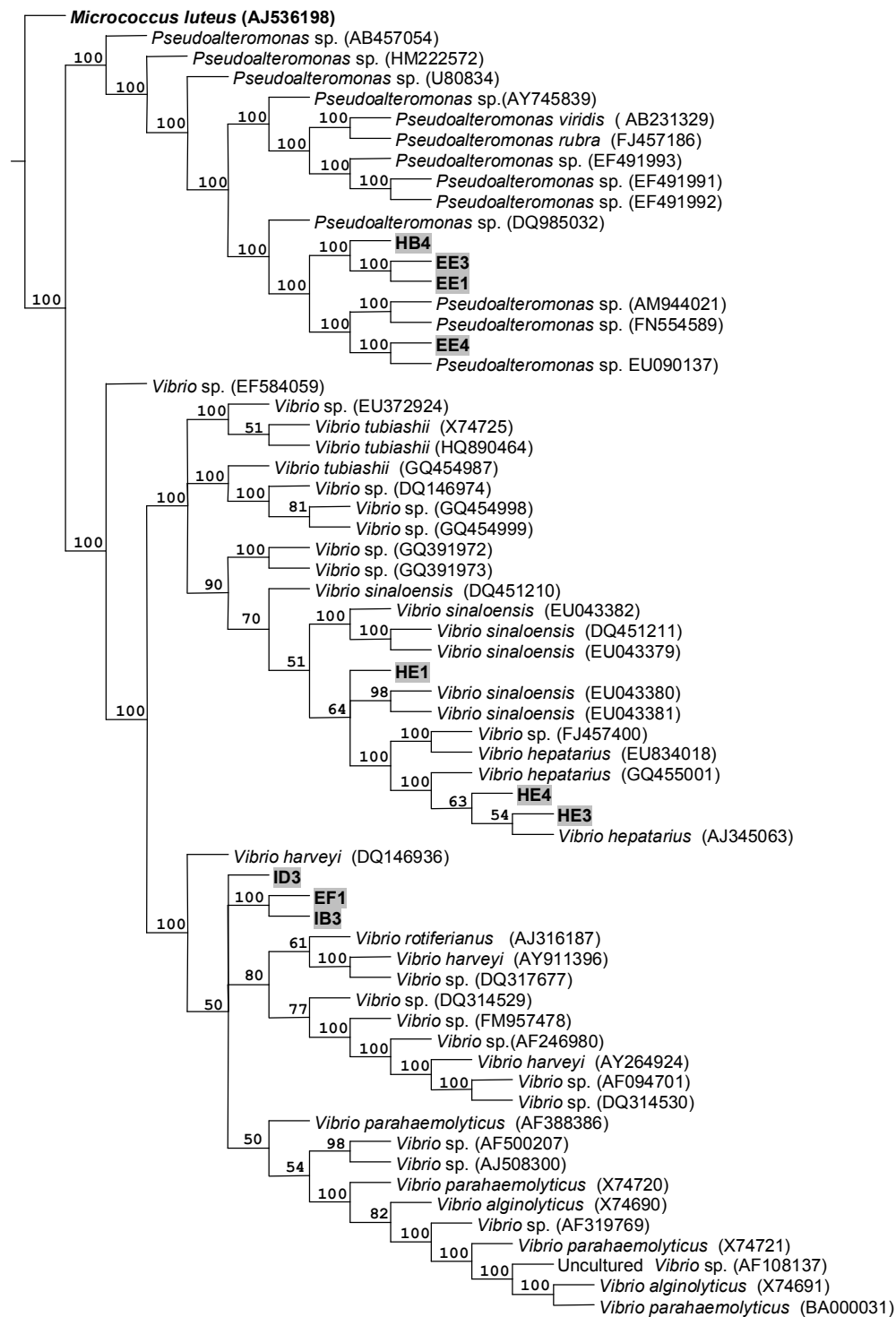


Figura 4. Árbol filogenético basado en secuencias del gen del ARN ribosomal 16S (método Ratchet; Longitud: 307; índice de consistencia: 60%; índice de retención: 91%), se muestra la relación filogenética de las secuencias de las cepas de estudio con otros grupos. *Micrococcus luteus* AJ536198 se usó como grupo externo. 41

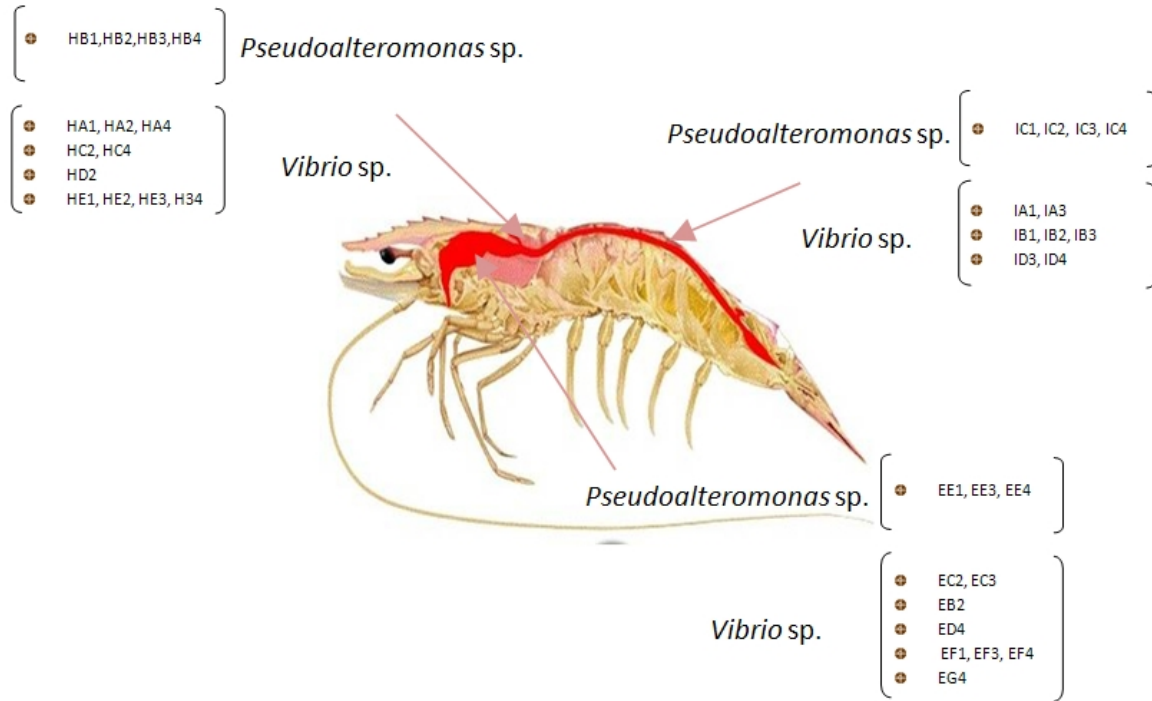


Figura 5. Esquema del tracto digestivo del camarón *L. vannamei* donde se sitúan las diferentes cepas aisladas con actividad proteolítica así como los géneros a los cuales pertenecen.

3.3.1. Estómago

Con los resultados del análisis bioinformático (Tabla1) y filogenético (Figuras 3 y 4) las cepas aisladas de este tejido fueron asignadas a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. Como se observa en la figura 2, las cepas EE1, EE3 y EE4 corresponden al género *Pseudoalteromonas*, mientras que EB2, EC2, EC3, ED4, EF1, EF3, EF4, EG4 son del género *Vibrio*.

Por otra parte, en la tabla 2 se presentan las características morfológicas anotadas para las colonias aisladas de este tejido. Cabe mencionar que la morfología de las colonias EB2, EC2, EC3, ED4 y EG4 no corresponde con la morfología reportada para especies de *Vibrio* al crecer en medio agar marino. En el caso de las bacterias identificadas como *Pseudoalteromonas* (EE1, EE3 y EE4), la morfología registrada es igual a la reportada previamente para este tipo de microorganismos cuando son cultivados en agar marino.

En cuanto a la tinción de Gram, la totalidad de cepas analizadas fueron bacilos Gram negativos (Figura 5), de igual manera todas presentaron una reacción positiva para las pruebas de catalasa y oxidasa (tabla 3). Estas características son consistentes con la descripción general que se da para los géneros antes mencionados.

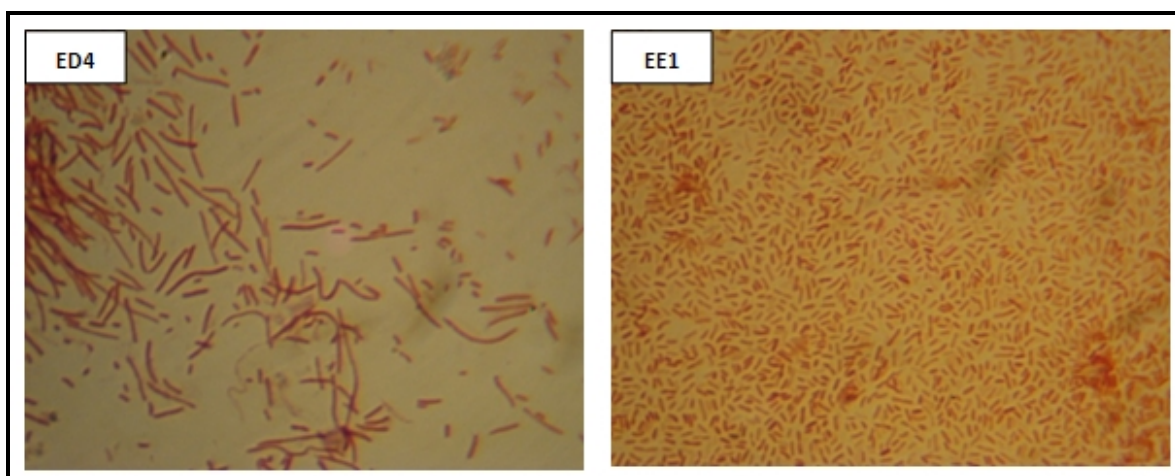


Figura 6. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del estómago, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.

Tabla 1. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.

CEPA	HOMOLOGÍAS NO. ACCESO	DESCRIPCIÓN	SIMILITUD	PUNTUACIÓN S-AB
EB2	AY332401	<i>Vibrio harveyi</i>	0.997	0.988
	GU078671	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.992
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.992
EC2	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.995	0.992
	GU223590	<i>Vibrio</i> sp.	0.995	0.992
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.995	0.987
EC3	AJ316187	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.991	0.957
	AY264924	<i>Vibrio harveyi</i>	0.991	0.957
	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.991	0.963
ED4	GU223600	<i>Vibrio</i> sp.	0.993	0.961
	GU223583	<i>Vibrio</i> sp.	0.993	0.961
	DQ513192	<i>Vibrio</i> sp.	0.993	0.963
EE1	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.979	0.937
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.983	0.937
	AY745839	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.979	0.940

EE3	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.994	0.987
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.994	0.987
EE4	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.994	0.987
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1.000	0.977
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1.000	0.977
EF1	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1.000	0.977
	AF246980	<i>Vibrio</i> sp.	0.994	0.974
	AY264924	<i>Vibrio harveyi</i>	0.994	0.974
EF3	FM957478	<i>Vibrio</i> sp.	0.994	0.983
	AJ316187	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.997	0.991
	FJ457565	<i>Vibrio</i> sp.	0.998	0.991
EF4	FM204857	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.998	0.991
	AJ316187	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.993	0.977
	AY264924	<i>Vibrio harveyi</i>	0.993	0.977
EG4	FJ457565	<i>Vibrio</i> sp.	0.995	0.977
	GU223587	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.992
	GQ406702	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.992
	FM204855	<i>Vibrio campbellii</i>	0.999	0.992

Tabla 2. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	PIGMENTACIÓN
EA	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema opaco
EB	Redonda	Liso	Plana con bordes elevados	Rugosa/brillante	Cremosa	Crema opaco
EC	Redonda	Liso	Plana con bordes elevados	Rugosa/mate	Cremosa	Crema opaco
ED	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa/brillante	Cremosa	Crema opaco
EE	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Amarillo translúcido
EF	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema translúcido
EG	Irregular	Lobulado	Plana con centro elevado	Rugosa/mate	Cremosa	Crema opaco

Tabla 3. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.

CEPA	FORMA DE LA CÉLULA	GRAM	CATALASA	OXIDASA
EA1	Bacilo	-	+	+
EA2	Bacilo	-	+	+
EA3	Bacilo	-	+	+
EA4	Bacilo	-	+	+
EB1	Bacilo	-	+	+
EB2	Bacilo	-	+	+
EB3	Bacilo	-	+	+
EB4	Bacilo	-	+	+
EC1	Bacilo	-	+	+
EC2	Bacilo	-	+	+
EC3	Bacilo	-	+	+
EC4	Bacilo	-	+	+
ED1	Bacilo	-	+	+
ED2	Bacilo	-	+	+
ED3	Bacilo	-	+	+
ED4	Bacilo	-	+	+
EE1	Bacilo	-	+	+
EE2	Bacilo	-	+	+
EE3	Bacilo	-	+	+
EE4	Bacilo	-	+	+
EF1	Bacilo	-	+	+
EF2	Bacilo	-	+	+
EF3	Bacilo	-	+	+
EF4	Bacilo	-	+	+
EG1	Bacilo	-	+	+
EG2	Bacilo	-	+	+

EG3	Bacilo	-	+	+
EG4	Bacilo	-	+	+

3.3.2. Hepatopáncreas

Con base en el análisis bioinformático (Tabla 4) y filogenético (Figuras 3 y 4) las bacterias tomadas de este tejido fueron asignadas a los géneros *Pseudoalteromonas* (HB1, HB2, HB3, HB4), y *Vibrio* (HA1, HA2, HA4, HC2, HC4, HD2, HE1, HE2, HE3, HE4).

En cuanto a las características morfológicas de las colonias, estas se presentan en la tabla 5. En este caso, la morfología de las colonias de la cepa HD2 difiere de la descripción general reportada para las colonias de *Vibrio* al ser cultivadas en agar marino. Por otro lado, Las cepas HB1, HB2, HB3, HB4 presentan la morfología propia de las colonias de especies de *Pseudoalteromonas*.

Por otra parte, con la tinción de Gram se determinó que todas las cepas analizadas son bacilos Gram negativos (figura 6), además, estas bacterias dieron positivo para las pruebas de catalasa y oxidasa (tabla 6).

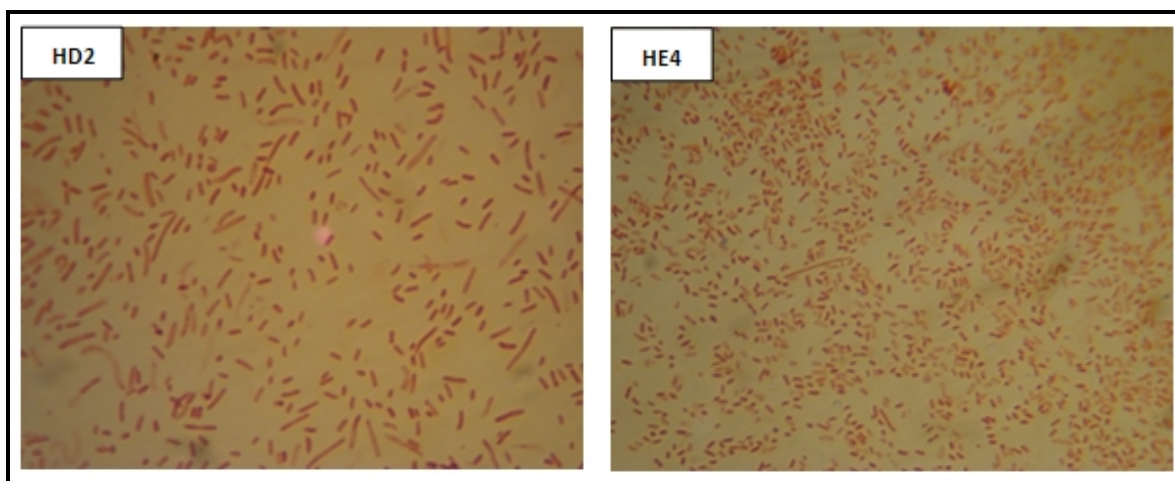


Figura 7. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del hepatopáncreas, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.

Tabla 4. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.

CEPA	HOMOLOGÍAS NO. ACCESO	DESCRIPCIÓN	SIMILITUD	PUNTUACIÓN S-AB
HA1	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.987
	GU223590	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.987
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.992	0.973
HA2	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.994	0.963
	GU223590	<i>Vibrio</i> sp.	0.994	0.963
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.987	0.952
HA4	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.992
	GU223590	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.992
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.988
HB1	AM944021	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.992	0.963
	080834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.992	0.980
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.997	0.992
HB2	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.984	0.947
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.984	0.947
	AY745839	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.986	0.962
HB3	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.998	0.995
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.998	0.995
	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.998	0.995
HB4	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.988	0.962
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.988	0.962
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.991	0.962
HC2	AY332401	<i>Vibrio harveyi</i>	0.995	0.988
	GU078671	<i>Vibrio communis</i>	0.995	0.992
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.995	0.992
HC4	GQ454987	<i>Vibrio tubiashii</i>	0.997	0.948
	GQ455001	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.997	0.954
	AJ345063	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.997	0.957
HD2	AY332401	<i>Vibrio harveyi</i>	0.997	0.987
	GU078671	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.991
	GU078673	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.991
HE1	DQ451210	<i>Vibrio sinaloensis</i>	0.997	0.989
	DQ451211	<i>Vibrio sinaloensis</i>	0.997	0.989
	EU043379	<i>Vibrio sinaloensis</i>	0.997	0.989
HE2	GQ454987	<i>Vibrio tubiashii</i>	0.996	0.944
	GQ455001	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.996	0.950
	AJ345063	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.996	0.954
HE3	FJ457400	<i>Vibrio</i> sp.	0.991	0.956

HE4	AJ345063	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.991	0.987
	GQ455001	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.991	0.987
	GQ454987	<i>Vibrio tubiashii</i>	0.996	0.942
	AJ345063	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.996	0.966
	GQ455001	<i>Vibrio hepatarius</i>	0.996	0.966

Tabla 5. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	PIGMENTACIÓN
HA	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema opaco
HB	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Amarillo translúcido
HC	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema translúcido
HD	Redonda	Liso	Plana con centro elevado	Rugosa/brillante	Cremosa	Crema opaco
HE	Redonda	Liso	Plana	Lisa/brillante	Cremosa	Amarillo translúcido

Tabla 6. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.

CEPA	FORMA DE LA CÉLULA	GRAM	CATALASA	OXIDASA
HA1	Bacilo	-	+	+
HA2	Bacilo	-	+	+
HA3	Bacilo	-	+	+
HA4	Bacilo	-	+	+
HB1	Bacilo	-	+	+
HB2	Bacilo	-	+	+
HB3	Bacilo	-	+	+
HB4	Bacilo	-	+	+
HC1	Bacilo	-	+	+

HC2	Bacilo	-	+	+
HC3	Bacilo	-	+	+
HC4	Bacilo	-	+	+
HD1	Bacilo	-	+	+
HD2	Bacilo	-	+	+
HD3	Bacilo	-	+	+
HD4	Bacilo	-	+	+
HE1	Bacilo	-	+	+
HE2	Bacilo	-	+	+
HE3	Bacilo	-	+	+
HE4	Bacilo	-	+	+

3.3.3. Intestino

Con las homologías encontradas mediante el análisis bioinformático (tabla 7) y posterior al análisis filogenético (figuras 3 y 4), se determinó que las cepas IC1, IC2, IC3 e IC4 corresponden al género *Pseudoalteromonas* y las cepas IA1, IA3, IB1, IB2, IB3, ID3, e ID4 al género *Vibrio*.

Las características morfológicas de las colonias aisladas de este tejido se enlistan en la tabla 8. La morfología de las colonias de las cepas ID3 e ID4 es distinta a la forma general de las colonias de *Vibrio*. Por otra parte, las cepas IC1, IC2, IC3 e IC4 presentan morfología colonial idéntica a la de especies de *Pseudoalteromonas*.

Como resultado de la tinción de Gram, se obtuvo que todas las cepas corresponden a bacilos Gram negativos (figura 7), y por otro lado, se determinó que la reacción es positiva para las pruebas de catalasa y oxidasa (tabla 9).

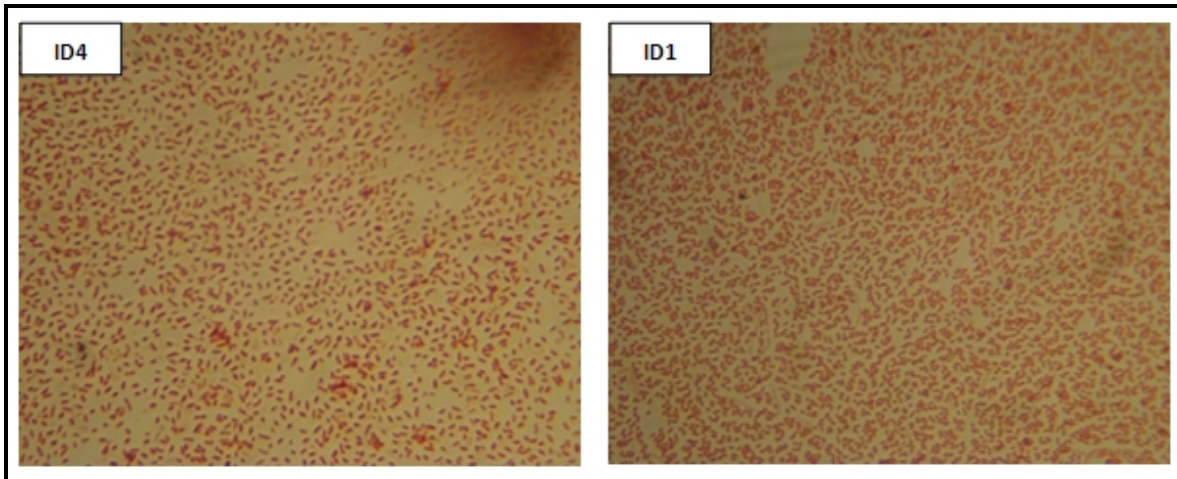


Figura 8. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas del intestino, se observan distintos tipos de bacilos Gram negativos.

Tabla 7. Se presentan algunas de las homologías encontradas en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project) para las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas aisladas del estómago.

CEPA	HOMOLOGÍAS NO. ACCESO	DESCRIPCIÓN	SIMILITUD	PUNTUACIÓN S-AB
IA1	EU419923	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.984
	GU223590	<i>Vibrio</i> sp.	0.997	0.984
	GU078671	<i>Vibrio communis</i>	0.997	0.984
IA3	DQ317677	<i>Vibrio</i> sp.	0.996	0.975
	AB470937	<i>Vibrio harveyi</i>	0.996	0.980
	GU078673	<i>V. communis</i>	0.996	0.980
IB1	AM930481	<i>Vibrio</i> no cultivado	0.996	0.990
	FJ457565	<i>Vibrio</i> sp.	0.998	0.990
	FM204857	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.998	0.990
IB2	AJ316187	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.996	0.983
	AY264924	<i>Vibrio harveyi</i>	0.996	0.983
	FM957478	<i>Vibrio</i> sp.	0.996	0.989
IB3	AJ316187	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0.989	0.984
	AY264924	<i>Vibrio harveyi</i>	0.989	0.984
	DQ314529	<i>Vibrio</i> sp.	0.989	0.984
IC1	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.995	0.981
	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.996	0.982
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.997	0.983
IC2	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.996	0.933
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.997	0.942
	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.994	0.944
IC3	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.995	0.981

IC4	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.997	0.982
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.998	0.993
	U80834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.993	0.978
ID3	DQ985032	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.993	0.978
	EU090137	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0.993	0.978
	X74690	<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.994	0.983
ID4	X74720	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.994	0.983
	AF388386	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.994	0.983
	EU660311	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.993	0.975
	FJ906751	<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.993	0.976
	FJ906749	<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.995	0.986

Tabla 8. Características morfológicas coloniales de las cepas aisladas con actividad proteolítica contra la caseína a las 24 horas de incubación.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	PIGMENTACIÓN
IA	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema opaco
IB	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Crema translúcido
IC	Redonda	Liso	Convexa	Lisa/brillante	Cremosa	Amarillo translúcido
ID	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa/brillante	Cremosa	Crema opaco

Tabla 9. Resultados de la tinción de Gram y pruebas catalasa y oxidasa de las cepas de estudio.

CEPA	FORMA DE LA CÉLULA	GRAM	CATALASA	OXIDASA
IA1	Bacilo	-	+	+
IA2	Bacilo	-	+	+
IA3	Bacilo	-	+	+
IA4	Bacilo	-	+	+
IB1	Bacilo	-	+	+
IB2	Bacilo	-	+	+
IB3	Bacilo	-	+	+
IB4	Bacilo	-	+	+
IC1	Bacilo	-	+	+

IC2	Bacilo	-	+	+
IC3	Bacilo	-	+	+
IC4	Bacilo	-	+	+
ID1	Bacilo	-	+	+
ID2	Bacilo	-	+	+
ID3	Bacilo	-	+	+
ID4	Bacilo	-	+	+

4. Discusión

Con los resultados de la identificación molecular se determinó que las cepas aisladas del sistema digestivo de *L. vanamei* corresponden a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, esto concuerda con la información obtenida en trabajos previos donde ambos géneros han sido reportados como parte de la comunidad microbiana del tracto digestivo del camarón, siendo *Vibrio* el más abundante (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Oxley *et al.*, 2002). Moss *et al.* (2000) reportan que el tracto digestivo de camarones juveniles de *L. vannamei* cultivados en aguas oligotróficas y eutróficas tiene a *Vibrio* como género dominante, por su parte, Esiobu y Yamazaqui (2003) obtuvieron el mismo resultado en organismos de la especie *Penaeus duorarum*, siendo *Vibrio harveyi* y *Vibrio logei* las especies más abundantes, de igual manera Liu *et al.* (2011) llegaron a esta conclusión mediante DGGE en *Fenneropenaeus chinensis*. Estos datos podrían explicar el hecho de que la mayor parte de las cepas aisladas en este trabajo correspondan al género *Vibrio* ya que de la totalidad de secuencias analizadas, 25 alinearon con secuencias de ARNr 16S de *Vibrio*, mientras que 11 alinearon con secuencias del género *Pseudoalteromonas*. Cabe mencionar, que estos trabajos se efectuaron utilizando organismos sanos al igual que en el presente estudio, lo cual sustenta la idea de que la abundancia de bacterias del género *Vibrio* no está relacionada necesariamente con un proceso de infección, de hecho, se considera a los vibrios como patógenos oportunistas que desencadenan enfermedades únicamente cuando el organismo presenta estrés (Morales, 2000).

De forma general la morfología de las colonias de las diferentes especies de *Vibrio* al crecer en el medio agar marino corresponde a colonias de forma circular, de borde liso, color blanco o crema (pueden ser translúcidas), de superficie lisa y convexas (Hada *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 2003; Gómez-Gil *et al.*, 2003). Sin embargo, en el caso de la morfología anotada para las colonias del presente estudio, en varios casos ésta no corresponde con la morfología general de las colonias de *Vibrio* previamente descrita. En el caso de las colonias de *Pseudoalteromonas*, la descripción morfológica de estas especies al crecer en medio agar marino, corresponde a colonias amarillas y circulares, lisas, convexas y de

margen liso (Venkateswaran y Dohmoto, 2000), esta descripción concuerda con la registrada para las colonias aisladas en este trabajo.

Por otro lado, los resultados de la tinción de Gram coinciden con las características generales reportadas tanto para *Pseudoalteromonas* como *Vibrio*, ya que ambos géneros están formados por bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados de un tamaño de 0.2 a 1.5 por 1.8 a 3.0 μm en el caso de *Pseudoalteromonas* y de 0.5 a 0.8 por 1.4 a 2.6 μm para *Vibrio* (Gauthier *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2009). Este resultado concuerda con el hecho de que en el ambiente marino las bacterias Gram negativas aerobias o anaerobias facultativas predominan y en menor proporción las Gram positivas, de tal forma que las bacterias Gram negativas usualmente constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan en la microbiota asociada a los camarones silvestres y de cultivo (Gatesoupe, 1999; Morales, 2000).

Por su parte, las pruebas bioquímicas catalasa y oxidasa resultaron positivas para la totalidad de cepas ensayadas, indicando que las cepas analizadas son bacterias aerobias o anaerobias facultativas al poseer el sistema citocromo, característica necesaria para la expresión de la enzima oxidasa y generalmente presente cuando hay actividad de catalasa (Mac Faddin, 2003; Forbes *et al.*, 2009), esto nuevamente concuerda con la descripción general de los grupos identificados molecularmente, ya que *Pseudoalteromonas* es un género compuesto por bacterias aerobias estrictas, mientras que el género *Vibrio* lo conforman especies anaerobias facultativas.

Cepas de ambos géneros fueron aisladas de los tres tejidos del tracto digestivo de *L. vannamei* lo cual concuerda con lo reportado por Oxley *et al.*, (2002) que a partir de los distintos componentes del tracto digestivo de la especie *Penaeus merguensis* aislaron e identificaron miembros de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, además en ese estudio se encontraron diferencias en la composición de especies de *Vibrio* en los diferentes tejidos del tracto digestivo, al igual que en el presente trabajo ya que en el caso del género *Vibrio* las especies probables correspondientes a cada cepa no fueron las mismas para cada tejido.

Cepas relacionadas con las especies *V. tubiashii*, *V. hepatarius* y *V. sinaloensis*, únicamente se encontraron en el hepatopáncreas. La variabilidad en la composición de especies bacterianas en los diferentes tejidos del tracto digestivo puede tener relación con factores tales como, las características específicas de cada especie bacteriana que le permiten sobrevivir en determinados ambientes. Para que una bacteria sea un colonizador potencial del ambiente transitorio que constituye el tracto digestivo del camarón, debe adherirse a las paredes intestinales y reproducirse para así poder tener una ventaja selectiva, por otra parte, hay que tener en cuenta que el intestino anterior y posterior son desprendidos en cada ecdisis, de esto se puede concluir que las bacterias adheridas a estos tejidos serán evacuadas, sin embargo, el hepatopáncreas no se encuentra quitinizado por lo que cualquier residente bacteriano permanente se encontrará adherido preferentemente a esta superficie (Simões *et al.*, 2002).

En los organismos acuáticos, la colonización del tracto digestivo por parte de los microorganismos es influida por una variedad de factores relacionados y no relacionados con el hospedero (Harris, 1993), estos factores incluyen la ingestión de bacterias de vida libre del ambiente circundante, aspectos fisicoquímicos del tracto digestivo, condiciones ambientales y estacionalidad, dieta, condiciones fisiológicas del hospedero y probablemente el tipo de hábitat y las prácticas de cultivo (Yasuda y Kitao, 1980; Campbell y Buswell, 1983; Prieur *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1991). En el ambiente natural, las condiciones generalmente permiten el desarrollo de una flora bacteriana estable, que quizá represente la microbiota normal del hospedero, sin embargo, en un sistema de cultivo donde los parámetros tales como la fuente y calidad del agua, la dieta, densidad del cultivo y estructura del hábitat son distintos a los del ambiente natural, esto podría condicionar el establecimiento de una flora bacteriana distinta (Prieur *et al.*, 1990; Oxley *et al.*, 2002). Sin embargo, en el caso de la especie *Penaeus merguensis*, Oxley *et al.* (2002) reportan que la flora bacteriana de organismos silvestres es muy similar a la encontrada en organismos cultivados lo cual sugiere que estos organismos quizá influyen y/o seleccionan su flora bacteriana. En el caso del presente trabajo no se sabe si el medio de cultivo en el que se encontraban los camarones (biofloc) influyó de alguna forma en la composición de la flora bacteriana del tracto digestivo, sin embargo, el hecho de que en diferentes trabajos se

reporten los mismos géneros como parte de la microbiota normal de estos animales podría indicar que de alguna manera estos organismos tienen una flora bacteriana hasta cierto punto estable independientemente del tipo de cultivo utilizado.

Pseudoalteromonas es un género común en ambientes marinos, encontrándose en el agua de mar, algas e invertebrados marinos y contiene alrededor de 30 especies (Ivanova *et al.*, 2002; Holmström *et al.*, 2002), las cuales pertenecían originalmente al género *Alteromonas*, sin embargo, fueron reclasificadas por Gauthier *et al.* (1995) en este nuevo género. Estas especies pertenecen al grupo de las γ -proteobacterias y están descritas como bacterias marinas o halófilas moderadas. La existencia de especies del género *Pseudoalteromonas* en una variedad de hábitats y su amplia difusión alrededor del mundo, sugieren que las estrategias adaptativas y de supervivencia expresadas por las especies de este grupo son diversas y eficientes (Holmström y Kjelleberg, 1999). Son productoras de numerosos compuestos, se han descrito especies que sintetizan amilasas (Gavrilovic *et al.*, 1982; Aghajari *et al.*, 1998), β -galactosidasas (Hoyoux *et al.*, 2001), fosfolipasas (Cadman y Eichberg, 1983), compuestos antimicrobianos (Holmström *et al.*, 2002) y proteasas (Holmström y Kjelleberg, 1999; Venkateswaran y Dohmoto, 2000). Es importante mencionar que dentro de las especies de este género algunas han sido descritas como patógenas (Ridgway *et al.*, 2008; Wang, 2011), mientras que otras han sido empleadas como probióticos en organismos marinos incluido el camarón (Le Moullac *et al.*, 2003; Schulze *et al.*, 2006; Doeschate y Coyne, 2008), principalmente por el hecho de que varias especies son productoras de compuestos antimicrobianos (Holmström y Kjelleberg, 1999; Holmström *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2009).

Las especies del género *Vibrio* se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente marino asociadas con una gran variedad de organismos, pertenecen a las γ -proteobacterias, este género contiene varias especies reportadas como patógenas en diversos organismos marinos incluido el camarón (Sung *et al.*, 2001; Hsu y Chen, 2007), por el contrario, existen especies que han sido probadas para su uso como probióticos, se ha reportado el uso de las especies: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. campbellii* (Verschuere *et al.*, 2000;

Schulze *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007)

Como se describió previamente varias especies del género *Pseudoalteromonas* son capaces de producir diversos compuestos extracelulares, por tal motivo, los estudios que se han realizado con especies de este grupo, están enfocados principalmente en su potencial con fines biotecnológicos o en su capacidad para producir compuestos antimicrobianos que beneficien a su hospedero, sin embargo, no se encontraron estudios dirigidos hacia su posible participación en la digestión de organismos acuáticos. En el caso del género *Vibrio*, los estudios se dirigen principalmente a especies patógenas y aunque se han realizado estudios en su uso como probióticos, los mecanismos de acción de estas especies no están claros.

Varios estudios, principalmente en peces, han demostrado el papel activo de las enzimas exógenas en la digestión de alimentos ingeridos dentro del tubo digestivo, aunque existe polémica sobre la magnitud de la aportación de estas enzimas en la actividad enzimática total. El aporte extra de exoenzimas por bacterias establecidas en el tracto digestivo, junto con la exclusión competitiva de las bacterias potencialmente patógenas, ha sido el principal argumento en la búsqueda y desarrollo de bacterias probióticas en las investigaciones relacionadas con este tema (Verschuere *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2002).

En camarón la detección y caracterización de enzimas proteasas se ha abordado de diferentes formas, sin embargo, en pocos casos, estos estudios se han realizado mediante la purificación de las enzimas, en la mayoría, solo se ha detectado la presencia de las enzimas en extractos crudos utilizando sustratos sintéticos e inhibidores específicos para cada una de ellas (Carrillo y González 2000; Forrellat y Gaxiola, 2006). Ziaei-Nejad *et al.* (2006) determinaron un incremento en la actividad enzimática total de diferentes enzimas entre ellas proteasas en el tracto digestivo de organismos de la especie *Fenneropenaeus indicus* de varios estadios ontogénicos al utilizar una cepa comercial de un probiótico de *Bacillus*, sin embargo, debido al tipo de pruebas realizadas no fue posible distinguir entre la actividad debida a las enzimas sintetizadas por los propios organismos y la actividad correspondiente a las enzimas producidas por las bacterias, sin embargo, se piensa que tal incremento podría deberse también a que la presencia del probiótico de alguna forma

lograría estimular la producción de enzimas endógenas de estos animales. Por esta razón, con los trabajos realizados hasta el momento no es posible afirmar con certeza que la totalidad de la actividad enzimática detectada en el tracto digestivo del camarón sea propia o sea en parte contribución de su flora bacteriana, este supuesto se ha hecho principalmente con enzimas tales como la celulasa la cual es muy rara en el reino animal y se piensa que en decápodos los cuales tienen hábitos carnívoros y omnívoros la fuente de esta enzima puede ser exógena por parte de microorganismos simbiotes que viven en el hepatopáncreas (Carrillo y González, 2000). De igual forma, con los resultados obtenidos en el presente estudio no es posible asumir directamente la contribución de la flora bacteriana en el proceso digestivo de camarones *L. vannamei*, sin embargo, existen métodos que en estudios posteriores podrían aplicarse para complementar y validar estos resultados. Entre estos métodos se encuentran los ensayos de actividad enzimática, mediante los cuales es posible cuantificar los niveles de actividad de enzimas extracelulares sobre sustratos específicos (Berg, 2008). Por medio de esta técnica, podría realizarse una comparación entre la actividad evaluada en organismos tratados con antibióticos en los cuales se espera al menos una disminución en la carga bacteriana presente en su sistema digestivo, con respecto a organismos que no han sido tratados previamente, y por otro lado, medir la actividad de las enzimas de bacterias aisladas del tracto de estos animales, con los datos generados sería posible determinar si existe diferencia en la actividad enzimática de organismos con poca población bacteriana y organismos con su flora bacteriana normal, y además comprobar si su microbiota presenta el mismo tipo de actividad enzimática, de existir una diferencia en los niveles de actividad, dicha diferencia podría atribuirse al componente bacteriano. Por otra parte, podría realizarse una comparación entre los niveles de expresión de genes bacterianos relacionados con el metabolismo, a partir del metagenoma de camarones sometidos a distintos tipos de dietas. El despliegue diferencial puede ser usado con este propósito, en esta técnica la población de ARNm es muestreada por la producción de fragmentos de cDNA aleatoriamente amplificados usando transcripción reversa seguida por una amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Stein y Liang, 2002). Este método permite visualizar y comparar patrones de expresión genética entre dos o más muestras y puede detectar genes que se reprimen, se inducen o simplemente modifican sus niveles de expresión como respuesta a los factores de estudio (Bonass *et al.*,

2000; Fleming *et al.*, 2001). La finalidad de usar esta estrategia sería determinar si el patrón de expresión de genes bacterianos regulados transcripcionalmente y relacionados con procesos metabólicos, varía de acuerdo al tipo de alimento utilizado, esto podría corroborar el hecho de que la flora bacteriana participa activamente en la degradación de los componentes de la dieta del camarón.

Ahora bien el probable aporte de los microorganismos aislados en el presente trabajo en las diferentes regiones del tracto digestivo dependerá de la función de dicho tejido, en el caso del estómago, la presencia de bacterias con actividad proteolítica puede contribuir directamente en la digestión de las proteínas de la dieta del camarón ya que es en este lugar en donde los alimentos ingeridos se convierte en un fluido y se produce la mayor parte de la digestión química (extracelular). Por su parte, en el hepatopáncreas que es en donde se da la síntesis y secreción de las enzimas digestivas, este tipo de bacterias pueden secretar sus productos enzimáticos los cuales posteriormente pasaran al estómago junto con la batería enzimática endógena, además en este órgano continúa el proceso de digestión. En el caso de las bacterias presentes en el intestino del camarón, no se podría considerar que contribuyen en la hidrólisis proteica aunque sean capaces de secretar proteasas, ya que en esta región del tracto digestivo no se dan procesos de digestión del alimento sino la excreción de los productos de desecho. Un factor que es importante tomar en cuenta, es que la producción de exoenzimas en las bacterias puede depender del contexto del ambiente, en *Pseudoalteromonas*, se ha demostrado que la producción de tales compuestos es dependiente del medio, pues condiciones específicas de nutrientes pueden ser requeridas por estos microorganismos para expresar sus compuestos extracelulares biológicamente activos, esto sugiere que algunas asociaciones bacteria-hospedero en el ambiente marino son controladas por la disponibilidad de fuentes de alimento (Holmström y Kjelleberg, 1999). Además de la disponibilidad de nutrientes, parámetros tales como temperatura, pH y fluctuaciones en el nivel de oxígeno, frecuentemente son fuente de estrés para las bacterias, y condicionantes para la producción de ciertos compuestos (Hoffman y Decho, 2000). Hoffman y Decho, (2000), reportan que la producción de metaloproteasas por parte de *Pseudoalteromonas atlantica*, es influida por variaciones en el pH, en general las enzimas analizadas fueron más sensibles al decremento que al incremento en el valor de este

parámetro, dadas las condiciones del ambiente natural de estos microorganismos establecieron como óptimo para la actividad de estas enzimas valores de pH entre 7.5 y 8.4.

Los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio* incluyen varias especies que debido a sus características tienen el potencial de sobrevivir y reproducirse en el tracto digestivo del camarón y su vez producir sus respectivas enzimas extracelulares. Las especies de *Pseudoalteromonas* están adaptadas a amplios rangos de temperatura (10-37°C), salinidad (1-10% de NaCl) y pH (6-10 con un óptimo entre 6 y 7) (Venkateswaran y Dohmoto, 2000; Hoffman y Decho, 2000). Por su parte, las especies de *Vibrio*, pueden crecer (dependiendo de la especie) a una temperatura que va de los 4 a los 40°C y una salinidad de 1 a 9% de NaCl (Fujino *et al.*, 1974; Hada *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 2003; Gómez-Gil *et al.*, 2003; Gómez-Gil *et al.*, 2008).

Es importante tomar en cuenta que aunque la actividad bioquímica de cada cepa en los ensayos *in vitro* no tiene necesariamente que manifestarse *in situ*, dicha actividad permite conocer la capacidad potencial de la población microbiana para interactuar con su ambiente. Por tal motivo, ya que los camarones son organismos con elevados requerimientos proteicos pues usan preferencialmente la proteína dietética sobre los carbohidratos como fuente energética, (Tacon, 1989; García Galano, 2006) siendo este el principal nutriente limitante para el crecimiento de estos organismos, las enzimas producidas por las bacterias aisladas en el presente trabajo, podrían complementar la actividad proteolítica de estos animales incrementando la digestibilidad del alimento.

5. Bibliografía

1. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., & Haser, R. (1998). crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Science* , 7, 564-572.
2. Alvarez Torres, P., Soto, F., Aviles Quevedo, S., Díaz Luna, C., & Treviño Carrillo, L. M. (1998). Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción acuícola en México. Avances en Nutrición Acuícola III, Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, Instituto Nacional de la Pesca , 3-20.
3. Ararykananda, P., & Lawrence, A. (1993). Dietary protein and energy requirements of the white-legged shrimp, *Penaeus vannamei* and the optimal protein to energy ratio. En: From discovery to commercialization. European Aquaculture Soc., Oostende, Belgium , 21.
4. Balcázar, J., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. (2007). Effect of the addition of four potential probiotics strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* , 96, 147-150.
5. Bonass, W. A., Marsh, P. D., Percival, R. S., Aduse-Opoku, J., Hanley, S. A., Devine, D. A., y otros. (2000). Identification of ragAB as a temperature-Regulated operon of *Porphyromonas gingivalis* W50 using Differential Display of random primed RNA. *Infection and Immunity* , 68 (7), 4012-4017.
6. Cadman, E., & Eichberg, J. (1983). The presence of phospholipase a and lysophospholipase activities in culture supernatant fluid from *Alteromonas espejiana*. *Int.J.Biochem* , 15 (9), 1155-1159.
7. Campbell, A., & Buswell, J. (1983). The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea* L.) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology* , 55, 215-223.
8. Carrillo, F., & González, R. (2000). Control de la digestión en camarones. En: Civera, R., Pérez, C.J., Ricque, D., Cruz, L.E. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 a 18 Noviembre, 1998. La Paz, B.C.S. México , 138-148.
9. Cercenado, E., & Cantón, R. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *En Procedimientos en Microbiología Clínica*.

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

10. Cook, V., Turenne, C., Wolfe, J., Pauls, R., & Kabani, A. (2003). Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *Journal of Clinical Microbiology* , 41 (3), 1010-1015.
11. Cousin, M., Cuzón, G., Blandrit, E., Ruelle, F., & AQUACOP. (1991). Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Penaeus vannamei* juveniles. En: Luquet K.P. (Eds.). 4 Int Symp. Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France. 24-27 Junio 1991. Colloq. INRA. , 6 , 599-606.
12. Cruz, L. (1996). Digestion en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. Avances en nutrición acuícola III .
13. Díaz, C., Sousa, L., & Petriella, A. (2006). Morfología e histología del aparato digestivo en los diferentes estadios de vida de los camarones peneidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
14. Doeschate, K., & Coyne, V. (2008). Improved growth rate in farmed *haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* , 284, 174-179.
15. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., & Bottger, E. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* (17), 7843-7853.
16. Erasmus, J. H., Cook, P. A., & Coyne, V. E. (1997). The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* (155), 377-386.
17. Escutia-Zúñiga, S. (1998). El alimento balanceado para camarón en México desde el punto de vista del acuicultor. Avances en Nutrición Acuícola III, Cámara Nacional de la Industria Pesquera Sección Especializada de Acuicultura , 21-30.
18. Esiobu, N., & Yamazaki, K. (2003). Analysis of bacteria associated with the gut of healthy wild penaeid shrimps: a step towards effective probiotics in aquaculture. *Journal of Aquaculture in the Tropics* , 18, 275-286.
19. Fleming, J. T., Nagel, A., Rice, J., & S., G. S. (2001). Differential display of procaryotic messenger RNA and application to soil microbial communities. En P. Rochelle, *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and applications* (pág. 264). Wyomndham, UK: Horizon Scientific Press.

20. Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). Bailey y Scott: diagnóstico microbiológico (12 ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
21. Forrellat, A., & Gaxiola, G. (2006). Enzymas digestivas y control de la digestión . En Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 27-60). México.
22. Fujino, T., Sakazaki, R., & Tamura, K. (1974). Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 24 (4), 447-449.
23. Gamboa-Delgado, J. (2001). Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia. Tesis. Escuela Superior Politécnica del Litoral Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.
24. García-Galano, T. (2006). Requerimientos nutricionales: Proteínas. En Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 128-142). México.
25. Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* , 180, 147-165.
26. Gauthier, G., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new sp. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 45 (4), 755-761.
27. Gavrilovic, L., O'Brien, R., & Sanders, R. (1982). Secretion of amylase by the marine bacterium, *Alteromonas rubra*. *Aust.J.Biol.Sci* , 35, 111-124.
28. Gaxiola, G., Rosas, C., Arena, L., & Cuzón, G. (2006). Requerimiento de carbohidratos. En Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 143-153). México.
29. Gómez-Gil, B., Fajer-Avila, E., Pascual, J., Macián, M., Pujalte, M., Garay, E., y otros. (2008). *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 58, 1621-1624.

30. Gómez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C., & Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 53, 239-243.
31. Gomez-Gil, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J., Inglis, V., & Guerra-Flores, A. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopáncreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* , 163, 1-9.
32. Guevara, W. (2003). Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos. *Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann* , 55.
33. Hada, H., West, P., Lee, J., Stemmeler, J., & Colwell, R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 34 (1), 1-4.
34. Harris, J. (1993). The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecology* , 25, 195-231.
35. Harris, J., Seiderer, L., & Lucas, M. (1991). Gut microflora of two saltmarsh detritivore Thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microbial Ecology* , 21, 63-82.
36. Herrera, M. (2008). Digestibilidad in vivo e in vitro de ingredientes utilizados en alimentos para el cultivo del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*. *Tesis* . Instituto Tecnológico de Durango.
37. Hoffman, M., & Decho, A. (2000). Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology* , 23, 29-39.
38. Holmström, C., & Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* , 30, 285-293.
39. Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., & Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* , 41, 47-58.
40. Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J., y otros. (2001). Cold-adapted B-galactosidase from the antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology* , 67 (4), 1529-1535.

41. Hsu, S., & Chen, J. (2007). The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture* , 271, 61-69.
42. Ivanova, E., Matte, G., Matte, M., Coenye, T., Hug, A., & Colwell, R. (2002). Characterization of *Pseudoalteromonas citrea* and *P. nigrifaciens* isolated from different ecological habitats based on REP-PCR genomic fingerprints. *Systematic and applied microbiology* (25), 275-283.
43. Izvekova, G. (2006). Hydrolytic activity of enzymes produced by symbiotic microflora and its role in digestion processes of bream and its intestinal parasite *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea). *Biology Bulletin* , 33 (3), 287-292.
44. Kar, N., & Ghosh, K. (2008). Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* , 8, 115-120.
45. Klappenbach, J., Saxman, P., Cole, J., & Schmidt, T. (2001). rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research* , 29 (1), 181-184.
46. Le Moullac, G., Goyard, E., Saulnier, D., Haffner, P., Thouard, E., Nedelec, G., y otros. (2003). Recent improvements in broodstock management and larviculture in marine species in Polynesia and New Caledonia: genetic and health approaches. *Aquaculture* , 227, 89-106.
47. León, J., Pellón, F., Unda, V., David, J., Anaya, C., & Mendoza, V. (2000). Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Revista Peruana de Biología* , 7 (2).
48. Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., y otros. (2011). The intestinal microbial diversity in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. *Aquaculture* .
49. López, A., & Zaballos, M. (2005). Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos. *Ecosistemas* , 14 (2), 30-40.
50. Ma, Y., Liu, P., Yu, S., Li, D., & Cao, S. (2009). Inhibition of common fouling organisms in mariculture by epiphytic bacteria from the surfaces of seaweeds and invertebrates. *Acta Ecologica Sinica* , 29, 222-226.
51. MacFaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3 ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.

52. Mohapatra, B., Bapuji, M., & Sree, A. (2003). Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. *Acta Biotechnol* , 23, 75-84.
53. Molina, C., Cadena, E., & Orellana, F. (19-22 de Noviembre de 2000). Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. en Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola .
54. Molina, P., Escobar, V., Gamboa, D., Cadena, E., Orellana, F., & Piña, R. (2002). Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil *Litopenaeus vannamei* (Boone). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre. Cancun, Quintana Roo, México .
55. Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines (2 ed.).
56. Morales, M. (2000). Principales enfermedades de los camarones peneidos en el pacífico mexicano. *Panorama Acuícola* , 6 (1), 44-55.
57. Moriarty, D. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* (151), 333-349.
58. Moss, S., LeaMaster, B., & Sweeney, J. (2000). Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *Journal of the World Aquaculture Society* , 31, 255-263.
59. Murray, P., Pfaller, M., & Rosenthal, K. (2006). Microbiología Médica (5 ed.). España: Elsevier.
60. Nunes, A., Gesteira, T., & Goddard, S. (1997). Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* , 149, 121-136.
61. Ochoa-Solano, J. L., & Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* , 23, 519-525.
62. Oxley, A., Shipton, W., Owens, L., & McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured nanana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology* , 93, 214-223.

63. Pangastuti, A., Suwanto, A., Lestari, Y., & Suhartono, M. (2010). Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversitas* , 11 (2), 65-68.
64. Pedrazzoli, A., Leon-Hing, A., Montoya, N., Molina, C., & Camba, E. (1993). Efecto dietético de concentraciones variables de proteína, lípidos y la relación proteína/energía en dietas para juveniles de *Penaeus vannamei*. Fundación Cenaim Espol, Ecuador.
65. Prieur, D., Megel, G., Nicolas, J., Plusquellec, A., & Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* , 28, 277-352.
66. Ramirez, R. F., & Dixon, B. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscar (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* , 227, 417-426.
67. Ridgway, I., Small, H., Atkinson, R., Birkbeck, H., Taylor, A., & Neil, D. (2008). Extracellular proteasas and posible disease related virulence mechanisms of two marine bacteria implicated in an opportunistic bacterial infection of *Nephrops norvegicus*. *Journal of Invertebrate Pathology* , 99, 14-19.
68. Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* , 22 (4), 238-245.
69. Rodriguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & Garcia, J. (2005). Principios y prácticas de laboratorio. Universidad de Costa Rica.
70. Rosas, C., & Carrillo, O. (2006). Principales rutas metabólicas. Utilización de la energía. En Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 61-88).
71. Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, E., y otros. (19-22 Noviembre de 2000). El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. en: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium International de Nutrición Acuicola.
72. Sánchez, T., León, J., Woolcott, J., & Arauco, K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Revista Peruana de Biología* , 11 (2), 179-186.

73. Schmidt, T., & Relman, D. (1994). Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods in Enzymology* , 235, 205-222.
74. Schulze, A., Alabi, A., Tattersall-Sheldrake, A., & Miller, K. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture* , 256, 50-73.
75. Shivanand, P., & Jayaraman, G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* (44), 1088-1094.
76. Simões, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A., & Gómez-Gil, B. (s.f.). Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones Peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. En: Cruz, L.E., Ricque, D., Tapia, M., Gaxiola, M.G., Simões, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
77. Simon, C. A., & McQuaid, C. (1999). Extracellular digestion in two co-occurring intertidal mussels (*Perna perna* (L.) and *Choromytilus meridionalis* (Kr)) and the role of enteric bacteria in their digestive ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (234), 59-81.
78. Stanley, J. T., & Stanley, P. M. (1986). Potential Commercial Applications in Aquatic Microbiology. *Microbial Ecology* (12), 79-100.
79. Stein, J., & Liang, P. (2002). Differential Display technology: a general guide. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 59, 1235-1240.
80. Sugita, H., Kawasaki, J., & Deguchi, Y. (1997). Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* , 24, 105-108.
81. Sung, H., Hsu, S., Chen, C., Ting, Y., & Chao, W. (2001). Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopáncreas during cultivation. *Aquaculture* , 192, 101-110.
82. Tacon, A. G. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Brasilia, Brasil.

83. Thompson, C., Vicente, A., Souza, R., Vasconcelos, A., Vesth, T., Alves, N., y otros. (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evolutionary Biology* , 9 (258).
84. Thompson, F., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 68 (3), 403-431.
85. Thompson, F., Thompson, C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M., & Swings, J. (2003). *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 53, 1495-1501.
86. Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9 ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
87. Venkateswaran, K., & Dohmoto, N. (2000). *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 50, 565-574.
88. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 64 (4), 655-671.
89. Wang, W. (2011). Bacterial diseases of crabs: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* , 106, 18-26.
90. Yasuda, K., & Kitao, T. (1980). Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* , 19, 229-234.
91. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M., Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A., & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* , 252, 516-524.

CAPITULO II

Producción de enzimas digestivas de bacterias aisladas del tracto digestivo del camarón blanco *L. vannamei*

1. Introducción

Los camarones del género *Penaeus* presentan enorme importancia comercial siendo los principales crustáceos cultivados en el mundo. Es por ello, que estos organismos han recibido mucha atención en cuanto a experiencias de cultivo e investigación científica, sin embargo, a menudo se pasa por alto los múltiples efectos que pueden atribuirse al componente microbiológico del sistema, especialmente el papel directo de los microorganismos en el metabolismo del animal en cuestión.

En algunos estudios se reporta que las bacterias del tracto digestivo de organismos acuáticos toman parte en la descomposición de nutrientes proveyendo al hospedero de materiales fisiológicamente activos (Sugita *et al.*, 1997; Ramírez y Dixon, 2003; Izvekova, 2006; Kar y Ghosh, 2008), sin embargo, en el caso del camarón existe poco conocimiento acerca del aporte que podría tener su microbiota en la digestión.

Los camarones peneidos son omnívoros y algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras. En estudios del contenido estomacal realizados en diferentes especies, se han encontrado poliquetos, crustáceos, algas y detritos. Por tanto, estos animales poseen una amplia gama de posibilidades bioquímicas para utilizar diversos sustratos energéticos contenidos en su dieta (Rosas y Carrillo, 2006).

Para estos organismos los lípidos además de ser una fuente energética, son elementos esenciales en la estructura y función de las células, son precursores de hormonas esteroides y de mediadores intercelulares y son además, necesarios para el crecimiento, la maduración y la producción de nauplios (Rosas y Carrillo, 2006).

Por su parte, los carbohidratos son utilizados principalmente como fuente de energía metabólica directa, como fuente para la síntesis de quitina y para la síntesis de ácidos nucleicos (Gaxiola *et al.*, 2006).

Dada la importancia de los lípidos y carbohidratos en la dieta de estos organismos, en el presente trabajo se pretende determinar a partir de las cepas aisladas previamente con actividad proteolítica en los diferentes componentes del tracto digestivo de la especie *L. vannamei*, la presencia de actividad enzimática de tipo lipasa/estera, amilasa y quitinasa, con la finalidad de inferir un posible aporte por parte de estos microorganismos en la digestión del camarón.

2. Materiales y métodos

Con el propósito de determinar si las cepas que se aislen en el presente trabajo (ver capítulo I) son capaces de producir otras enzimas extracelulares de importancia en la digestión del camarón, se seleccionará un grupo representativo de las mismas (un miembro de cada grupo morfológico) y se realizarán ensayos para detectar la presencia de amilasas, lipasas/esterasas y quitinasas. Los pasos a seguir se detallan a continuación.

2.1. Recuperación de cepas a partir de gliceroles

Para la realización de cada prueba las cepas serán recuperadas de sus respectivos gliceroles de la siguiente manera: 1) se agregarán 100µl de cada glicerol en tubos con 5ml de medio BHI estéril (Infusión cerebro-corazón, Difco) adicionado con NaCl al 2% o en tubos con caldo marino según sea necesario, los tubos inoculados se dejarán incubando a 27°C±1 durante 24 horas; 2) a partir de los tubos inoculados, se sembrará en cajas con agar marino y se incubará a 27°C±1 durante 24 horas, este procedimiento se realizará además con la finalidad de descartar la contaminación de alguno de los gliceroles.

2.2. Producción de enzimas

2.2.1. Amilasas

Para detectar esta actividad se probarán dos medios de cultivo, el Agar Peptona y el medio B de Von Hofsten & Malmquist (Atlas, 2005), adicionados con 2% de almidón.

De las cajas con agar marino que contengan las bacterias recuperadas de los gliceroles, se tomará una colonia por cada cepa y se sembrará en el medio correspondiente, posteriormente las cajas se incubarán durante 24 horas a 27°C±1. La determinación de la actividad amilolítica se efectuará agregando lugol sobre la superficie del medio que

contenga las colonias bacterianas, la producción de amilasa será positiva para aquellas colonias que presenten un halo claro a su alrededor.

2.2.2. Quitinasas

El medio que se utilizará para esta prueba es el agar quitina (Atlas, 2005) suplementado con NaCl al 2%.

Para la determinación de la actividad de quitinasa se tomará una colonia por cada cepa para sembrar en cajas con el medio antes mencionado, se dejará incubando a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$, durante el tiempo que sea necesario hasta observar actividad, la cual estará indicada por la capacidad que tengan las bacterias de crecer en el medio.

2.2.3. Lipasas/esterasas

Para el ensayo de actividad lipasa/esterasa se utilizará el medio reportado por (Sánchez-Porro, 2005) modificando la concentración de las diferentes sales a 10% y la de NaCl a 2%. Cada tipo de cepa será sembrada en el medio antes mencionado y se dejará incubando a $27^{\circ}\text{C}\pm 1$, hasta que se observe la formación de un precipitado alrededor de las colonias, como consecuencia de la reacción entre el CaCl_2 y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis del Tween 80.

3. Resultados

3.1. Producción de amilasas

De las cepas analizadas del género *Vibrio*, dos correspondientes al estómago (ED4, EE1), una del hepatopáncreas (HB1) y dos del intestino (IC1 e ID4), no presentaron actividad de amilasa (tabla 1). Una cepa aislada del hepatopáncreas (HD2), dos del estómago (EF3, EG4) y una del intestino (IA1) presentaron alta actividad mientras que en las restantes la actividad fue baja. De las cepas correspondientes al género *Pseudoalteromonas* ninguna mostró actividad de amilasa (EE1, HB1, IC1) (figura 1).

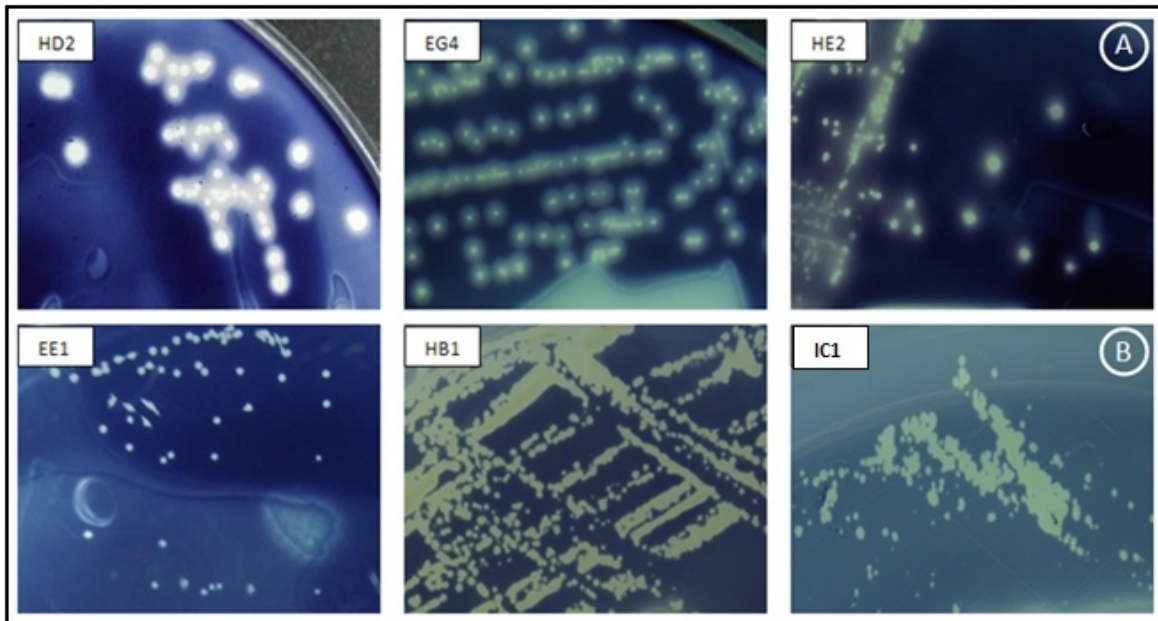


Figura 1. Determinación de actividad amilolítica de algunas de las cepas de estudio. A) Cepas con actividad amilolítica. HD2, HE2: Hepatopáncreas (*Vibrio*); EG4: Estómago (*Vibrio*). B) Cepas que no presentaron actividad amilolítica. EE1: Estómago (*Pseudoalteromonas*); HB1: Hepatopáncreas (*Pseudoalteromonas*); IC1: Intestino (*Pseudoalteromonas*).

3.2. Producción de quitinasas

Esta actividad estuvo ausente únicamente para la cepa IB1 (*Vibrio*) la cual fue aislada del intestino de *L. vannamei*, sin embargo, la actividad fue baja para el resto de las cepas (*Vibrio* y *Pseudoalteromonas*), principalmente en HB1 (Hepatopáncreas), EE1 (Estómago) e IC1 (Intestino) (tabla 1).

3.3. Producción de lipasas/esteresas

La actividad lipasa/esterasa fue detectada en la totalidad de cepas ensayadas (*Vibrio* y *Pseudoalteromonas*) (tabla 1), dicha actividad fue alta excepto en dos cepas pertenecientes al estómago (EE1, EF3), una del hepatopáncreas (HB1) y dos del intestino (IB1, IB4) (figura 2).

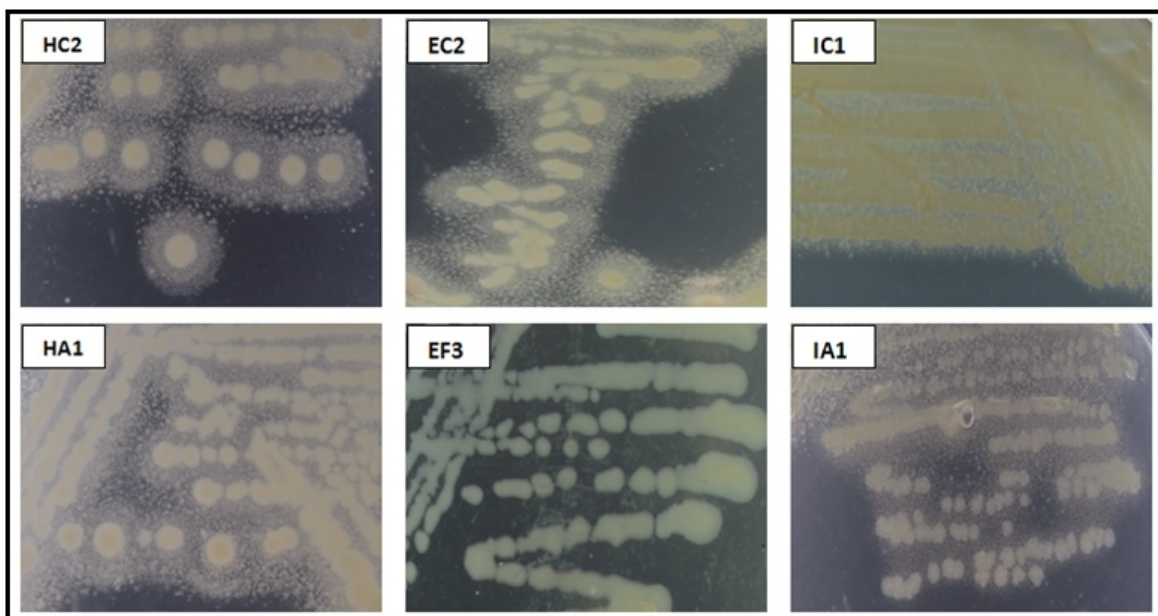


Figura 2. Actividad lipasa/esterasa de algunas de las cepas de estudio. HC2, HA1: Hepatopáncreas (*Vibrio*); EC2, EF3: Estómago (*Vibrio*); IC1: Intestino (*Pseudoalteromonas*); IA1: Intestino (*Vibrio*).

Tabla 1. Producción de enzimas extracelulares de cepas aisladas del tracto digestivo de *L. vannamei*.

CEPA	AMILASA	QUITINASA	LIPASA/ESTERASA
HA1	+	+	+
HB1	-	+	+
HC2	+	+	+
HD2	+	+	+
HE2	+	+	+
EB2	+	+	+
EC2	+	+	+
ED4	-	+	+
EE1	-	+	+
EF3	+	+	+
EG4	+	+	+
IA1	+	+	+
IB1	+	-	+
IC1	-	+	+
ID4	-	+	+

4. Discusión

4.1. Producción de amilasas

Los crustáceos utilizan los carbohidratos principalmente como fuente de energía metabólica directa, ya que no pueden almacenarlos como tejido adiposo, además, son fuente para la síntesis de quitina y para la síntesis de ácidos nucleicos. Los camarones peneidos no presentan un requerimiento dietético de glucosa ya que ésta puede provenir del proceso de neogluconeogénesis a partir de aminoácidos, no obstante, estos organismos poseen una batería enzimática para la digestión de almidón, glucógeno, laminarina y quitina, constituyentes naturales de su dieta (Gaxiola *et al.*, 2006).

Bajo cultivo, los camarones han sido alimentados con dietas diseñadas usando almidón como fuente principal de carbohidratos debido a que se ha observado que los monosacáridos producen daños en la glándula digestiva y alta mortalidad (Rosas y Carrillo, 2006). Los alimentos balanceados para el cultivo de camarón generalmente tienen niveles de carbohidratos entre 10 y 30% (Cuzon *et al.*, 2004).

En el tracto digestivo de *L. vanamei*, la degradación del almidón se inicia con la actividad de las α -amilasas, seguida de la acción complementaria de las α -glucosidasas, sacarasa-isomaltasa y α -dextrinasas (Forrellat y Gaxiola, 2006). Los trabajos que se enfocan en el estudio de las enzimas encargadas de la degradación de carbohidratos en camarón, en muchas ocasiones no involucran la purificación y caracterización de dichas enzimas, incluso, en muy pocos casos se ha abordado si estas enzimas son sintetizadas por el hepatopáncreas o son producidas en parte por bacterias simbiotas (Hood y Meyers, 1973; Dempsey y Kitting; 1987). De hecho, a pesar de que existen varias publicaciones sobre la composición de la flora bacteriana del tracto digestivo de diferentes especies de camarón, son pocas las que exploran la función de las bacterias en el tracto digestivo en términos de su contribución enzimática. Estudios enfocados en la participación de las bacterias del tracto digestivo de organismos acuáticos en el proceso de digestión generalmente han sido

realizados en peces, como los trabajos reportados por Sugita *et al.* (1997) e Izvekova (2006), quienes determinaron la producción de amilasas y la probable contribución enzimática, por parte de bacterias aisladas del tracto digestivo de diferentes especies de peces. De igual manera, en el presente trabajo se aisló a partir del tracto digestivo del camarón *L. vannamei*, bacterias con la capacidad de producir amilasas, las cuales podrían contribuir en la degradación del almidón contenido en la dieta del camarón. De las cepas de estudio, las correspondientes al género *Pseudoalteromonas* (EE1, HB1, IC1) no presentaron actividad de amilasa, esto a pesar de que dicha actividad ya ha sido determinada en diferentes especies de este grupo tales como *P. peptidolytica*, *P. aurantia*, *P. citrea*, *P. luteoviolacea* y *P. rubra* (Gavrilovic, 1982; Venkateswaran y Dohmoto, 2000). En el caso de *Vibrio* la producción de amilasas se observó en la mayoría de las cepas analizadas excepto en ED4 que corresponde al estómago e ID4 que se aisló del intestino, previamente esta actividad ha sido reportada en varias especies de vibrios como *V. tubiashii*, *V. parahaemolyticus* y *V. sinaloensis* (Hada *et al.*, 1984; Fujino *et al.*, 1974; Gomez-Gil *et al.*, 2008) y otras cepas de las cuales no fue determinada la especie (Leon *et al.*, 2000). Debido a que se usaron los mismos valores para los parámetros de temperatura y pH para la determinación de la producción de amilasas para todas las cepas, la diferencia observada en cuanto a la intensidad de la actividad puede estar relacionada con la respuesta de cada tipo de bacteria hacia dichos parámetros, pues se sabe que estos pueden afectar la producción de enzimas, lo cual indica que la actividad de estos microorganismos dentro del tracto digestivo de *L. vannamei* puede presentar un patrón de comportamiento distinto.

El almidón se encuentra constituido por unidades de amilosa y amilopectina. La α -amilasa del camarón no puede hidrolizar la amilosa, por lo que los almidones ricos en este componente son poco digeribles, por el contrario, los almidones ricos en amilopectina se digieren mejor (Gaxiola *et al.*, 2006), por esta razón, se debe tomar en cuenta las características de la fuente de almidón a utilizar en la dieta. Por tal motivo, sería interesante determinar si las enzimas secretadas por las bacterias del presente estudio son capaces de degradar sustratos con un mayor porcentaje de amilosa, ya que esto permitiría en un futuro aprovechar el potencial de estos microorganismos para modificar las fuentes

de almidón que se incluyen normalmente en la dieta del camarón de tal forma que sean más digeribles.

4.2. Producción de quitinasas

La quitina, un polímero ramificado de N-acetil-D-glucosamina se encuentra en el exoesqueleto, revestimiento del intestino y membrana peritrófica de la mayoría de las especies de crustáceos. La quitina puede comprender una porción significativa de la dieta del camarón al ser consumida como parte de organismos presa (Moriarty, 1977, Hunter y Feller, 1987), al ingerir la cutícula desechada durante la muda (Hood y Meyers, 1977; Fox, 1993) y como parte de los detritos. Además esta molécula puede constituir parte considerable de las heces fecales y se sabe que la coprofagia puede ser importante en la nutrición del camarón (Clark *et al.*, 1993).

La utilización de la quitina como nutriente usualmente requiere la degradación de la molécula a monómeros de N-acetilglucosamina por parte de un complejo de endo y exoglucosidasas (quitinasas). La degradación completa de la quitina tanto en procariones como en eucariotes es un proceso de dos pasos, los cuales involucran hidrólisis sucesivas de los enlaces β ,1-4 glucosídicos que unen las subunidades de N-acetilglucosamina. En el primer paso, la endoquitinasa se une y degrada formas poliméricas de N-acetilglucosamina para producir el disacárido quitobiosa. En el segundo paso, la quitobiasa hidroliza la quitobiosa a monómeros de N-acetilglucosamina. Las enzimas para la degradación de quitina en varios organismos son inducidas por quitosan, quitobiosa, N-acetilglucosamina o glucosamina (Connell *et al.*, 1998).

La glucosamina, un producto de degradación de la quitina, ha demostrado ser un factor de crecimiento en algunos crustáceos, mientras que la acetilglucosamina, se ha implicado en la biosíntesis del exoesqueleto de este tipo de organismos (Hood y Meyers, 1973).

La investigación concerniente a la importancia nutricional de la quitina en organismos acuáticos está frecuentemente dirigida a la presencia de las enzimas quitinasas. Actividad de quitinasa a sido identificada en el sistema digestivo de varias especies acuáticas,

incluidos algunos camarones peneidos (Goodrich y Morita, 1977; Kono *et al.*, 1990; Spindler-Barth *et al.*, 1990). Varios autores consideran que los niveles de quitinasa encontrados en camarón permiten una digestión significativa de la quitina contenida en los alimentos (Kono *et al.*, 1990). Por otra parte, además de la secreción endógena de quitinasas, la presencia de estas enzimas en el tracto digestivo del camarón ha sido atribuida a bacterias quitinolíticas, ya que al ser la quitina uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, es usada por varios microorganismos como fuente de carbono (Hood y Meyers, 1973; Dempsey y Kitting, 1987; Connell *et al.*, 1998). Hood y Meyers (1973), encontraron que enzimas quitinasas son producidas por bacterias del tracto digestivo de *Litopenaeus setiferus*, además, observaron un incremento en la actividad de quitinasa en camarones alimentados con una dieta que contenía quitina, simultáneamente con el aumento en el número de bacterias quitinolíticas. Por su parte, Dempsey y Kitting (1987) también reportan la presencia de bacterias que producen quitinasas en el tracto digestivo de la especie *Penaeus aztecus*. Clark *et al.* (1993) investigaron la digestibilidad aparente de quitina en tres especies de camarones peneidos (*P. vannamei*, *P. setiferus* y *P. duorarum*) utilizando dietas que contenían diferentes niveles de quitina (1,2 y 4%), los datos obtenidos indicaron una significativa hidrólisis de quitina en camarones peneidos, sin embargo, estos autores no hicieron un análisis de la flora bacteriana del tracto digestivo de las especies utilizadas, no obstante, mencionan que la actividad quitinolítica podría ser en parte de origen bacteriano. Por el contrario, Fox (1993), no observó mejoras en la tasa de crecimiento de *Penaeus monodon* alimentado con dietas que contenían 0%, 4%, 8%, 12% y 16% de quitina, además este autor encontró restringida la cantidad de microorganismos quitinolíticos en el tracto digestivo, con estos resultados llegó a la conclusión de que la síntesis de quitinasa endógena en la glándula digestiva de camarones juveniles de *P. monodon* se produce a un ritmo lento y por lo tanto únicamente son capaces de digerir pequeñas cantidades de quitina de la dieta en la ausencia de las quitinasas producidas por bacterias.

En el presente trabajo, se aislaron bacterias a partir del tracto digestivo del camarón *L. vannamei* las cuales tuvieron la capacidad de degradar quitina. Las cepas analizadas corresponden a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. En el caso de *Vibrio*, debido a

que contiene especies que principalmente se desarrollan en ambientes marinos donde la quitina es abundante, es de esperarse que estos microorganismos hayan desarrollado sistemas para la utilización de quitina como fuente de nutrientes. Quitinasas han sido identificadas en especies como *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. parahaemoliticus* (Connell *et al.*, 1998). Lo mismo se esperaría para el género *Pseudoalteromonas* que comprende bacterias exclusivamente marinas, sin embargo, entre varias especies analizadas por Venkateswaran y Dohmoto, (2000) estos autores encontraron que únicamente *Pseudoalteromonas citrea* presenta actividad de quitinasa, cabe mencionar que de las bacterias de este estudio fueron precisamente las cepas pertenecientes al género *Pseudoalteromonas* las que presentaron la actividad de quitinasa más baja.

Hood y Meyers (1973), determinaron que las bacterias aisladas de *Litopenaeus setiferus*, presentan actividad quitinolítica a las 24 horas de incubación, tomando en cuenta que en el tracto digestivo de estos organismos el alimento permanece por periodos que van de 6 a 24 horas, estos autores asumen que la actividad enzimática de las bacterias es útil en la degradación de la quitina del alimento consumida por el camarón. En el caso de las bacterias aisladas en el presente trabajo, la actividad de quitinasa fue visible a partir de las 72 horas de incubación, sin embargo, esta actividad era baja, por lo cual se decidió dejar incubando las cajas por un periodo más largo de tiempo (6 días), las cajas eran monitoreadas diariamente, notándose pocas variaciones en el crecimiento de las colonias. Por esta razón, podría suponerse que la actividad de estas cepas en el tracto digestivo de *L. vannamei* no es significativa en términos de actividad quitinolítica, no obstante, hay que tomar en cuenta otros factores, tales como la naturaleza del sustrato utilizado, por ejemplo, Kumar *et al.* (2006) mencionan que la quitina de los artrópodos en su forma natural se encuentra como un complejo proteína-polisacárido y contiene varios lípidos, pigmentos y minerales. Otros factores son las condiciones experimentales del cultivo, tales como la temperatura y pH, las cuales podrían no ser idóneas para la expresión de las enzimas quitinasas, de tal manera, que la actividad de estas bacterias podría ser o no más significativa en las condiciones propias del tracto digestivo de *L. vannamei*.

4.3. Producción de lipasas/esterasas

Los crustáceos usan generalmente bien los lípidos como fuente de energía y como una fuente de ácidos grasos esenciales, necesarios para el crecimiento normal y la sobrevivencia de los animales, estos compuestos sirven además como vehículos de las vitaminas liposolubles y proveen otros compuestos, como esteroides y fosfolípidos, que son esenciales para el buen funcionamiento metabólico del camarón. (García, 2010). Los camarones peneidos no tienen un requerimiento lipídico definido. El requerimiento óptimo de lípidos en la dieta de crustáceos varía con la especie, edad, fuente y otros nutrientes contenidos en la dieta (Galindo, 1999). Los niveles totales de lípidos recomendados para alimentos comerciales varían entre 6 y 7.5 % con un nivel máximo de 10 %, ya que valores por encima influyen en la reducción del crecimiento (Akiyama *et al.*, 1991; Lista y Velásquez, 2003). La biosíntesis y asimilación de los lípidos sucede fundamentalmente en el hepatopáncreas, este órgano también es su principal sitio de almacenamiento (Rosas y Carrillo, 2006).

Pocos estudios se han reportado sobre la presencia de lipasas en decápodos, Moss *et al.*, (2001) encontraron actividad de lipasa en la glándula digestiva de *L. vannamei* usando Beta-naftil nanonato como sustrato. La actividad lipolítica se atribuye también a esteroides inespecíficas (Carrillo y González, 2000). Las lipasas han sido diferenciadas de las esteroides principalmente sobre la base de su relativa especificidad preferencial. Los sustratos naturales para las lipasas son aceites y grasas, como los triacilglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esteroides actúan sobre ésteres simples de ácidos de bajo peso molecular (Nolasco *et al.*, 2006).

Dado que el tracto digestivo del camarón contiene una gran cantidad de bacterias en comparación con el medio que lo circunda, y tomando en cuenta que la producción de lipasas y esteroides está ampliamente distribuida entre los microorganismos del medio acuático (Dempsey y Kitting 1987; León *et al.*, 2000), es de esperarse que las exoenzimas producidas por éstos contribuyan en parte al proceso digestivo del camarón, en este trabajo se determinó la producción de lipasas/esteroides en bacterias provenientes del tracto

digestivo de *L. vannamei*, de las cepas ensayadas la totalidad presentó actividad, lo cual indica que la producción de amilasas/esterasas es muy común al menos para los géneros analizados, esto concuerda con trabajos previos en donde se reporta la producción de este tipo de enzimas en diferentes especies de *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* (Emod *et al.*, 1983; Hada, 1984; León *et al.*, 2000, Venkateswaran y Dohmoto, 2000, Gomez-Gil, 2008). Estos resultados además sustentan la posibilidad de que las enzimas secretadas por estos microorganismos sean relevantes en la hidrólisis del alimento consumido por el camarón.

Por otro lado, los bajos requerimientos de lípidos que tiene el camarón, se le adjudican a una baja actividad de las lipasas, del tal modo que niveles elevados de lípidos en las dietas (> 10%) no son aprovechados por éstos organismos (Lista y Velásquez, 2003), esto indica que la capacidad que tengan las bacterias para degradar los componentes del alimento puede ser aprovechada para incrementar la asimilación de los lípidos consumidos por *L. vannamei*.

Discusión general

Las bacterias simbióticas en el tracto digestivo de los animales frecuentemente producen enzimas para la digestión del alimento, el papel de la flora intestinal ha sido ampliamente documentado en herbívoros ungulados y en invertebrados terrestres tales como las termitas. La posibilidad de una flora bacteriana simbiótica está siendo estudiada en varios invertebrados marinos (Dempsey y Kitting, 1987).

Se considera que el papel de los microorganismos en la biología de los camarones peneidos es diverso, dichos microorganismos pueden actuar como patógenos, servir al organismo directamente como fuente de alimento o como productores de una amplia gama de metabolitos de valor nutritivo para el desarrollo de los crustáceos. Algunos autores señalan que las enzimas producidas por la flora del tubo digestivo de estos animales se encuentran involucradas en la digestión del alimento, como lo reportan Hood y Meyers (1973,1977) quienes encontraron bacterias productoras de quitinasas, aisladas de *Litopenaeus setiferus*.

De igual manera, en el presente trabajo se aisló a partir del tracto digestivo de la especie *Litopenaeus vannamei* bacterias con la capacidad de producir diferentes enzimas extracelulares de potencial relevancia en la digestión de estos organismos. Los microorganismos aislados corresponden a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, grupos que previamente han sido reportados como parte de la flora normal del sistema digestivo del camarón (Moss *et al.*, 2000; Oxley *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011). En la mayoría de las cepas de estudio se observó la presencia de la totalidad de enzimas ensayadas (proteasas, amilasas, lipasas/esterasas y quitinasas), lo cual indica que la flora bacteriana de estos organismos está compuesta por algunos grupos que tienen actividades multienzimáticas, esto concuerda con lo reportado por Dempsey y Kitting (1987) quienes a partir del tracto digestivo de la especie *Penaeus aztecus* aislaron bacterias que expresaban uno o más tipos de enzimas (lipasas, amilasas, gelatinasas, quitinasas y celulasas), cabe mencionar que los géneros analizados en este trabajo no incluyen a *Pseudoalteromonas*.

Los principales polímeros presentes en los alimentos para camarón son proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales representan también el mayor porcentaje en peso de la formulación (Akiyama *et al.*, 1991). La digestión que ocurre en el tracto digestivo de estos organismos permite la obtención de los monómeros alimentarios tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos (Nolasco *et al.*, 2006). Estos monómeros, además de los que ya vienen libres en la dieta, representan la principal fracción que eventualmente será asimilada y metabolizada a partir del alimento formulado y del alimento natural disponible (Akiyama *et al.*, 1991; Shiau, 1997). En este contexto, la capacidad multienzimática observada en las cepas aisladas en el presente estudio, vislumbra el potencial que tienen estos microorganismos para degradar los principales componentes de la dieta de *L. vannamei*, sin embargo, dicha capacidad se encuentra restringida a las condiciones propias del sistema digestivo de estos animales las cuales podrían o no favorecer la producción de enzimas. Se sabe que en las bacterias factores condicionantes de estrés pudiendo ser la temperatura, pH, nivel de oxígeno y disponibilidad de nutrientes, afectan la producción de ciertas enzimas, por ejemplo, Hoffman y Decho (2000), reportan que variaciones en el pH tienen efecto sobre la producción de metaloproteasas en *Pseudoalteromonas atlántica*. No obstante, los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, incluyen bacterias que están adaptadas a vivir en las condiciones que impone el sistema digestivo de diferentes especies acuáticas, entre ellas los crustáceos decápodos, esto sustenta la posibilidad de que las actividades enzimáticas determinadas en los ensayos *in vitro* puedan efectuarse *in vivo*.

En trabajos previos, especies de *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* han sido utilizadas como probióticos (Verschuere *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007). Para que una bacteria sea considerada como un posible probiótico, es necesario que sea capaz de colonizar el sistema digestivo del huésped, mediante su adhesión a la superficie de la mucosa o al epitelio intestinal, debe a su vez producir metabolitos que inhiban o antagonicen con la flora nativa, así como sobrevivir a los rigores del tránsito a través del tracto intestinal y proliferar (Thompson *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). En este sentido, las especies pertenecientes al género *Pseudoalteromonas* son de particular interés, ya que comúnmente se encuentran asociadas con organismos marinos y

se ha reportado en diversos trabajos que se trata de un grupo caracterizado por su capacidad de producir un amplio rango de compuestos con actividad antimicrobiana que le permiten competir con otros microorganismos en cuanto a la obtención de nutrientes y en la colonización de superficies, evitando la adherencia de patógenos (Holmström y Kjelleberg, 1999), estas características aunadas con la producción de diversas exoenzimas por parte de las cepas aisladas en el presente trabajo pueden ser aprovechadas en un futuro para realizar pruebas en su uso como probióticos, además de la ventaja que significa el hecho de que se trate de bacterias propias del sistema digestivo de *L. vannamei*.

Por otro lado, el conocimiento acerca de las capacidades enzimáticas que poseen las bacterias que habitan en el sistema digestivo de estos animales, abre la posibilidad de utilizar esta información como base para estudios posteriores que permitan la optimización de la formulación de los alimentos suministrados durante el cultivo, con la finalidad de minimizar los costos de producción e incrementar la digestibilidad del alimento.

Conclusiones

En el presente trabajo se logró aislar a partir del tracto digestivo de la especie *Litopeneus vannamei* cepas bacterianas productoras de proteasas, amilasas, lipasas/esterasas y quitinasas, lo cual confiere a estos microorganismos la posibilidad de degradar los principales componentes de la dieta del camarón.

Los datos obtenidos con técnicas microbiológicas tradicionales complementaron los resultados del análisis molecular, permitiendo identificar los géneros a los cuales pertenecen las bacterias aisladas. Los géneros encontrados corresponden a *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, grupos previamente reportados como parte de la flora normal del tracto digestivo del camarón.

Los resultados del presente estudio, concuerdan con trabajos previos realizados en diferentes organismos marinos, en los cuales se generan evidencias que permiten inferir la probable asociación de la flora bacteriana con el proceso digestivo de estos animales.

Perspectivas

La información generada en este trabajo puede ser útil en estudios posteriores que permitan aprovechar el potencial de estas bacterias como probables probióticos, significando una ventaja el hecho de que se trate de cepas aisladas directamente del tracto digestivo de *L. vannamei*, ya que aunque en la actualidad existen diversos probióticos no siempre es posible que estos provean sus beneficios debido a su origen ajeno al camarón.

Por otra parte, se recomienda la realización de pruebas adicionales para determinar la acción de las enzimas secretadas por estas bacterias sobre sustratos específicos utilizados en las dietas para camarón, esto con la finalidad de optimizar la composición de estos alimentos y de esta forma incrementar su digestibilidad.

5. Bibliografía

1. Akiyama, D., Dominy, W., & Lawrence, A. (1991). Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revised. In: Akiyama and Ronnie (eds). Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. Thailand and Indonesia. 80-98.
2. Atlas, R. (2005). Handbook of media for environmental microbiology (2 ed.).
3. Balcázar, J., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. (2007). Effect of the addition of four potential probiotics strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* , 96, 147-150.
4. Carrillo, F., & González, R. (2000). Control de la digestión en camarones. En: Civera, R., Pérez, C.J., Ricque, D., Cruz, L.E. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 a 18 Noviembre, 1998. La Paz, B.C.S. México , 138-148.
5. Clark, D., Lawrence, A., & Swakon, D. (1993). Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture* , 109, 51-57.
6. Connell, T., Metzger, D., Lynch, J., & Folser, J. (1998). Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* , 180 (21), 5591-5600.
7. Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., & Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* , 235, 513-551.
8. Dempsey, A., & Kitting, C. (1987). Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana* , 52 (1), 90-94.
9. Emod, I., Soubigou, P., Tong, N., Keil, B., & Richard, C. (1983). Assignment of *Achromobacter iophagus* strain I.029 to *Vibrio alginolyticus* chemovar iophagus. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 33 (3), 451-459.
10. Forrellat, A., & Gaxiola, G. (2006). Enzymas digestivas y control de la digestión . En: Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 27-60). México.
11. Fox, C. (1993). The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* , 109, 39-49.

12. Fujino, T., Sakazaki, R., & Tamura, K. (1974). Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 24 (4), 447-449.
13. Galindo, J. (1999). Aproximación a los requerimientos nutricionales de juveniles de camarón blanco *Penaeus schmitti*: evaluación de niveles y fuentes de proteína en la dieta. Tesis. Centro de Investigaciones Pesqueras Ministerio de la Industria Pesquera, Facultad de Biología. Habana, Cuba.
14. García, A. (2010). Inclusión de ensilado de pescado como fuente de proteína y de probiótico en la dieta del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Area interdisciplinaria de ciencias del mar departamento de ingeniería en pesquerías .
15. Gavrilovic, L., O'Brien, R., & Sanders, R. (1982). Secretion of amylase by the marine bacterium, *Alteromonas rubra*. *Aust.J.Biol.Sci* , 35, 111-124.
16. Gaxiola, G., Rosas, C., Arena, L., & Cuzón, G. (2006). Requerimiento de carbohidratos. En Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 143-153). México.
17. Gómez-Gil, B., Fajer-Avila, E., Pascual, J., Macián, M., Pujalte, M., Garay, E., y otros. (2008). *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 58, 1621-1624.
18. Goodrich, T., & Morita, R. (1977). Bacterial chitinase in the stomachs of marine fishes from Yaquina Bay, Oregon, USA. *Marine Biology* , 41, 355-360.
19. Hada, H., West, P., Lee, J., Stemmler, J., & Colwell, R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 34 (1), 1-4.
20. Hoffman, M., & Decho, A. (2000). Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology* , 23, 29-39.
21. Holmström, C., & Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* , 30, 285-293.
22. Hood, M., & Meyers, S. (1973). Microbial aspects of penaeid shrimp digestion. 81-91.

23. Hood, M., & Meyers, S. (1977). Microbiological and chitinoclastic activities associated with *Penaeus setiferus*. *Journal of the Oceanographical Society of Japan* , 33, 235-241.
24. Hunter, J., & Feller, R. (1987). Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from a South Carolina tidal creek. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* , 107, 61-70.
25. Izvekova, G. (2006). Hydrolytic activity of enzymes produced by symbiotic microflora and its role in digestion processes of bream and its intestinal parasite *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea). *Biology Bulletin* , 33 (3), 287-292.
26. Kar, N., & Ghosh, K. (2008). Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* , 8, 115-120.
27. Kono, M., Matsui, T., Shimizu, C., & Koga, D. (1990). Purification and some properties of chitinase from the liver of prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric. Biol Chem* , 54, 2145-2147.
28. Kumar, P., Sahu, N., Saharan, N., Reddy, A., & Kumar, S. (2006). Effect of dietary source and level of chitin on growth and survival of post-larvae *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Appl. Ichthyol* , 22, 363-368.
29. León, J., Pellón, F., Unda, V., David, J., Anaya, C., & Mendoza, V. (2000). Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Revista Peruana de Biología* , 7 (2).
30. Lista, M., & Velásquez, C. (2003). Influencia de tres dietas experimentales en el crecimiento de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista Científica, FCV-LUZ* , 13 (3), 167-172.
31. Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., y otros. (2011). The intestinal microbial diversity in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses . *Aquaculture* .
32. Moriarty, D. (1977). Quantification of carbon, nitrogen, and bacterial biomass in the food of some penaeid prawns. *Aust.J. Mar. Freshwater Res* , 28, 113-118.
33. Moss, S., Divakaran, S., & Kim, B. (2001). Stimulating effects of the pond water on digestive enzyme activity on the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* , 32, 125-131.

34. Moss, S., LeaMaster, B., & Sweeney, J. (2000). Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *Journal of the World Aquaculture Society* , 31, 255-263.
35. Nolasco, H., Del Monte, A., Hinojosa, P., Civera-Cerecedo, R., & Vega-Villasante, F. (2006). Digestibilidad in vitro de lípidos alimentarios para el camarón. En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Nieto, M.G., Villarreal D.A., Puello, A.C., García, A.(eds). Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León. México.
36. Oxley, A., Shipton, W., Owens, L., & McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured nanana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology* , 93, 214-223.
37. Ramirez, R. F., & Dixon, B. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* , 227, 417-426.
38. Rosas, C., & Carrillo, O. (2006). Principales rutas metabólicas. Utilización de la energía. En: Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica (págs. 61-88).
39. Sánchez-Porro, C. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de la haloproteasa CP1 producida por *Pseudoalteromonas ruthenica*. Tesis. Departamento de microbiología y parasitología. Facultad de farmacia. Universidad de Sevilla .
40. Schulze, A., Alabi, A., Tattersall-Sheldrake, A., & Miller, K. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture* , 256, 50-73.
41. Shiau, S. (1997). Nutrient requirements of Penaeid Shrimps. *Aquaculture* , 164, 77-93.
42. Spindler-Barth, M., Van Wormhoudt, A., & Spindler, K. (1990). Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Puluetnon serrum* during the moulting cycle. *Marine Biology* , 106, 49-52.

43. Sugita, H., Kawasaki, J., & Deguchi, Y. (1997). Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* , 24, 105-108.
44. Thompson, F., Abreu, P., & Cavalli, R. (1999). The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* , 174, 139-153.
45. Venkateswaran, K., & Dohmoto, N. (2000). *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 50, 565-574.
46. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 64 (4), 655-671.
47. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M., Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A., & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* , 252, 516-524.