

COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
QUITINOLÍTICAS RUMINALES**

JAVIER PILONI MARTINI

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS RUMINALES** realizada por el alumno: **JAVIER PILONI MARTINI** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

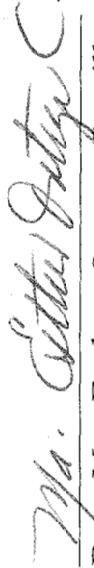
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Mario A. Cobos Peralta

ASESOR:



Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla

ASESOR:



Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR:



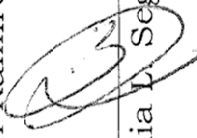
Dr. Sergio S. González Muñoz

ASESOR:



Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR:



Dra. Obdulia V. Segura León

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo 2008

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS RUMINALES

Javier Piloni Martini, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

Los principales objetivos del presente estudio fueron aislar y seleccionar bacterias ruminales quitinolíticas con alta capacidad para degradar quitina pura y caparazón de camarón *in vitro*, e identificar genéticamente a las bacterias seleccionadas usando secuencias de su gen 16S rARN amplificado mediante PCR. El aislamiento de las bacterias ruminales se inició con un cultivo mixto liofilizado de bacterias quitinolíticas (CMBQ) obtenido de borregos alimentados con una dieta con 25% de caparazón de camarón. Se requirieron tres aislamientos progresivos para obtener dos bacterias ruminales puras. En el primer aislamiento se obtuvieron seis consorcios bacterianos: BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT6 y BQT6, a partir de CMBQ. Por su alta capacidad para degradar quitina pura (62.69% a las 72 h de incubación) se seleccionó al consorcio BQT1 para el segundo proceso de aislamiento. Se usaron medios de cultivo a base de glucosa, quitina pura o caparazón de camarón y se aislaron 18 colonias (seis de cada uno de los medios de cultivo). De estas colonias se seleccionó el consorcio bacteriano Q6 (aislado del medio de cultivo con quitina pura) ya que causó la mayor degradación ($p \leq 0.01$) de quitina (33.31%) y caparazón de camarón (23.10%) a las 72 h de fermentación. En el tercer aislamiento se obtuvieron dos bacterias, Q6a y Q6b. Estas bacterias no tienen una importante capacidad de degradar caparazón de camarón en cultivos axénicos (17.64 y 12.60% a las 72 h de incubación), pero en cocultivo, su capacidad aumenta ($p \leq 0.05$) a 36.37%. Estos resultados indican una interacción sinérgica en la degradación del caparazón de camarón entre las dos bacterias aisladas. Para la identificación genética de las dos bacterias aisladas se usaron fragmentos de 796 pb y se encontró que, con un 99% de similitud, Q6a pertenece a la especie *Bacillus licheniformis*, mientras que Q6b está emparentada al género *Enterococcus* y sólo falta discernir si pertenece a la especie *E. faecium*, *E. durans* o *E. lactis*.

Palabras claves: Rumen, quitina, caparazón de camarón, bacterias quitinolíticas, 16S rARN.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINOLYTIC RUMINAL BACTERIA

Javier Piloni Martini, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

The main objectives of this study were to isolate and select chitin- degrading rumen bacteria with high capacity to degrade pure chitin and shrimp shell waste *in vitro*, as well as to identify genetically these bacteria, using their 16S rRNA gene sequences amplified by PCR. The isolation of rumen bacteria was started with a lyophilized chitin-degrading mixed culture (ChDMC), obtained from lambs fed a diet containing 25% shrimp shell waste. Three progressive isolations were required in order to obtain two pure rumen bacteria. In the first isolation six bacteria consortia were obtained: BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT5 and BQT6, from the ChDMC. Due to its high capacity to degrade pure chitin (62.69% after 72 h incubation), BQT1 was selected for the second isolation procedure. Culture media based on glucose, chitin or shrimp shell waste were used, and 18 bacteria colonies were obtained (six from each culture media). The bacteria consortia Q6 (isolated from the culture medium with pure chitin) was selected from all these colonies, since these bacteria caused the highest ($p \leq 0.01$) chitin (33.31%) and shrimp shell waste (23.10%) degradation after 72 h incubation. Two bacteria, Q6a and Q6b, were obtained in the third isolation. Axenic cultures of these bacteria have not an important chitin-degrading capacity (17.64 and 12.60% after 72 h incubation), but in coculture their capacity has a significant ($p \leq 0.05$) increase, 36.37%. These results indicate a synergic interaction for chitin degradation between this two isolated bacteria. Fragments of 796 bp were used for the genetic identification of the two isolated bacteria; it was found, with 99% of similitude, that Q6a belongs to the specie *Bacillus licheniformis*, and Q6b is a family member of the genus *Enterococcus*, but it is still required to confirm if this bacteria belongs to the specie *E. faecium*, *E. durans* or *E. lactis*.

Key words: Rumen, Chitin, shrimp shell waste, chitinolytic bacteria, 16S rRNA.

DEDICATORIA

A mis padres:

Isidoro Piloni Berra y Cecilia Martini Merlo

*A quienes agradezco por su apoyo
en mis decisiones tomadas en mi
vida.*

A mis hermanos:

Raquel, José Luis, Claudia, Domingo, Lorena, Enrique y Verónica

*Por estar conmigo y apoyarme en
los momentos más difíciles en esta
etapa de formación.*

A mi esposa:

Verónica Azucena Ibarra Medina

*Por tener la paciencia y estar
conmigo en los momentos difíciles
durante este proceso de mi
formación.*

A mis sobrinos y cuñados

*Por tener una participación
importante en mi vida.*

A mi querido y adorable Chipilo:

*Doy gracias a Dios por permitirme
nacer y crecer en este pueblo querido
que aunque estuve lejos de él siempre
estuvo presente en mí.*

A mis amigos:

A todos los amigos del laboratorio de microbiología ruminal, a mis amigos de generaciones otoño 2004 del programa de Ganadería, a mis vecinos, amigos de Chipilo y Puebla y a todos aquellos que me faltaron por mencionar.

A todos ellos Mil Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible obtener el grado de doctor en Ciencias. Número de becario 192402.

Sr. J. Agustín Hernández-Romero (Jefe de Laboratorio de Microbiología Ruminal)

Por su apoyo en el laboratorio para llevar acabo esta investigación.

Dr. Mario A. Cobos peralta

Gracias por compartir su experiencia, dedicación y apoyo para que se llevara acabo este trabajo con mucho éxito.

Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla

Por sus consejos y comprensión hacia los alumnos.

Dr. Sergio S. González Muñoz

Por sus sabios consejos durante esta etapa de mi formación.

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Gracias por tu apoyo, dedicación y paciencia en la parte de la identificación de bacterias y como amiga eres una excelente persona.

Por estar siempre al pendiente.

Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

Dr. David Hernández Sánchez
Por su gran amistad y apoyo en este trabajo.

Dra. Obdulia L. Segura León
Por su tiempo, apoyo y dedicación en la parte de biología molecular.

iii Mil gracias !!!

“El que quiera instruirse debe primeramente saber dudar, pues la duda del espíritu conduce a la manifestación de la vida”

Descartes

“Si me equivoco, deduzco que soy, pues el que no es no puede equivocarse, y, precisamente porque me equivoco, siento que soy”

San Agustín

Gracias a ti por permitirme culminar con esta etapa de mi vida y me diste la oportunidad de aprender lo mejor que nos dio la vida: amar, aprender y dar gracias por los días como estos.

Javier Piloni Martini

CONTENIDO

	Paginas
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Quitina	4
2.2 Caparazón de camarón y cangrejo	5
2.3 Composición química del caparazón de camarón y otros crustáceos	6
2.4 Estructura de la molécula de quitina	8
2.5 Fuente de caparazón de camarón	9
2.6 Microorganismos quitinolíticos en diferentes ambientes	10
2.7 Microorganismos quitinolíticos ruminales	11
2.8 Rutas metabólicas microbianas para la degradación de quitina	12
2.9 Uso de caparazón de camarón y cangrejo en la alimentación de rumiantes	15
2.10 Aislamiento de bacterias ruminales	19
2.11 Identificación de bacterias ruminales	20
2.12 Genómica nutricional, nutrigenética y nutrigenómica	22
3. OBJETIVO GENERAL	23
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
4. HIPÓTESIS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Activación del cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ) liofilizada	25
5.2 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el cultivo CMBQ reactivado	25
5.3 Primer aislamiento de bacterias quitinolíticas, usando el CMBQ reactivado	27
5.3.1 Comparación de la degradación de quitina pura entre los seis consorcios bacterianos obtenidos del CMBQ	27
5.3.2 Determinación del porcentaje de degradación de quitina	28
5.3.3 Cuento de bacterias totales	28
5.3.4 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el consorcio bacteriano BQT1	29
5.3.5 Comparación de la degradación de quitina pura y caparazón de camarón por BQT1 a diferentes pH	29
5.4 Segundo aislamiento de bacterias quitinolíticas usando el consorcio BQT1	30
5.4.1 Preparación de las cajas Petri con diferentes fuentes de carbono	30
5.4.2 Cuento y selección de colonias	31

5.4.3 Pruebas microbiológicas	31
5.4.4 Determinación de la degradación de quitina pura y caparazón de camarón de las bacterias aisladas usando BQT1	32
5.5 Tercer aislamiento de bacterias quitinolíticas (Q6a y Q6b) usando el consorcio microbiano Q6	32
5.5.1 Pruebas microbiológicas de las bacterias puras Q6a y Q6b	34
5.5.2 Preparación de inóculo	34
5.5.3 Prueba <i>in vitro</i> de degradación de caparazón de camarón	34
5.5.4 Comparación de la degradación del caparazón de camarón de las bacterias Q6a y Q6b solas en cocultivo (Q6) o mezcladas con fluido ruminal fresco	35
5.5.5 Proceso de hidratación de los inóculos	36
5.5.6 Ajuste de la concentración de bacterias mL ⁻¹ de medio de cultivo a 10 ⁶ y 10 ⁸ bacterias mL ⁻¹ de medio de cultivo	36
5.5.7 Preparación de los tubos de ensaye para estimar el porcentaje de degradación	36
5.5.8 Caracterización fermentativa de Q6, Q6a y Q6b	37
5.6 Caracterización molecular del gen 16S rARN de las bacterias aisladas	39
5.6.1 Extracción de ADN	39
5.6.2 Amplificación del gen 16S rARN	39
5.6.3 Inferencia de la filogenia	40
5.6.4 Reconstrucción de árboles filogenéticos	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Concentración de bacterias viables en el cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ) reactivadas	43
6.2 Primer aislamiento de bacterias quitinolíticas a partir de CMBQ reactivado	44
6.3 Comparación de la degradación de quitina pura entre los seis consorcios bacterianos liofilizados	45
6.4 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el liofilizado del consorcio microbiano (BQT1)	48
6.5 Comparación de la degradación de quitina pura y caparazón de camarón por BQT1 a diferentes valores de Ph	48
6.6 Segundo aislamiento de bacterias quitinolíticas a partir del consorcio BQT1	52
6.7 Tercer aislamiento de bacterias quitinolíticas puras (Q6a y Q6b) a partir del cultivo mixto Q6	61
6.8 Comparación de la degradación de caparazón de camarón, entre las bacterias Q6a, Q6b y el cultivo mixto Q6 solas o mezcladas con otras bacterias ruminales	64
6.9 Caracterización fermentativa de Q6, Q6a y Q6b	69
6.10 Caracterización molecular del gen 16S rARN de las bacterias aisladas	75

6.1.1 Distancias genéticas	76
6.1.2 Inferencia filogenética	78
7. CONCLUSIONES	83
8. LITERATURA CITADA	85

ÍNDICE DE CUADROS

	Paginas
Cuadro 1. Composición química del caparazón de camarón.	7
Cuadro 2. Porcentaje de aminoácidos esenciales en la proteína de caparazón de camarón, cangrejo y pasta de soya.	8
Cuadro 3. Composición de tres medios de cultivo (por cada 100 mL de medio).	26
Cuadro 4. Tratamientos para evaluar el consorcio bacteriano Q6 y las bacterias que lo forman (Q6a y Q6b) solas o mezcladas con bacterias presentes en líquido ruminal fresco.	35
Cuadro 5. Bacterias obtenidas del Banco de Genes GenBank (NCBI, 2007), con sus claves de acceso y número de pb obtenidas por los autores.	42
Cuadro 6. Cambios en pH y degradación (%) de quitina pura a diferentes horas de fermentación por seis consorcios bacterianos y CMBQ.	47
Cuadro 7. Cambios en el pH del medio de cultivo y en la degradación <i>in vitro</i> (DIVMS; %) de quitina y caparazón de camarón del consorcio bacteriano BQT1.	49
Cuadro 8. Coeficiente de correlación y regresión lineal entre tres diferentes pH sobre la degradación de quitina y camarón.	51
Cuadro 9. Concentración de bacterias quitinolíticas en medios sólidos con tres fuentes de carbono a 48 h de incubación.	53
Cuadro 10. Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono.	56
Cuadro 11. Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con quitina como única fuente de carbono.	57

Cuadro 12.	Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con caparazón de camarón como única fuente de carbono.	58
Cuadro 13.	Comparación del porcentaje de degradación de quitina pura y caparazón de camarón a las 72 h de fermentación por las 18 bacterias aisladas.	60
Cuadro 14.	Características morfológicas de las bacterias Q6a y Q6b a las 48 h de crecimiento.	62
Cuadro 15.	Cambios de pH y porcentaje de degradación de caparazón de camarón a las 72 h de fermentación.	63
Cuadro 16.	Comportamiento del pH a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación.	65
Cuadro 17.	Porcentaje de degradación de caparazón de camarón a diferentes horas de incubación.	66
Cuadro 18.	Concentración de bacterias mL ⁻¹ de medio de cultivo a diferentes horas de incubación.	67
Cuadro 19.	Comportamiento del pH a las 0 y 72 h de incubación en tres diferentes medios de cultivo inoculados con Q6, Q6a y Q6b.	70
Cuadro 20.	Degradación (%) de quitina pura y caparazón de camarón por las bacterias Q6a, Q6b a las 0 y 72 h de incubación.	71
Cuadro 21.	Producción de AGV por las bacterias Q6a, Q6b y Q6 usando diferentes sustratos de cultivo a las 72 h de incubación.	73
Cuadro 22.	Comparación de la concentración (mg dL ⁻¹) de nitrógeno amoniacal por Q6, Q6a y Q6b en tres diferentes sustratos a las 0 y 72 h de incubación.	74
Cuadro 23.	Distancias genéticas del gen 16S rARN de las bacterias quitinolíticas Q6a, Q6b y bacterias del NCBI.	77
Cuadro 24.	Características fisiológicas y genéticas de las bacterias Q6a y Q6b.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Estructura química de la quitina.	9
Figura 2. Rutas metabólicas para la degradación de quitina.	14
Figura 3. Ruta de fermentación de quitina en el rumen.	15
Figura 4. Procesos de aislamiento involucrados para obtener las bacterias Q6a y Q6b, a partir del cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ).	33
Figura 5. Árbol filogenético de las bacterias Q6a y Q6b con base en NJ con soporte de ramas con analisis bootstrap. El árbol filogenético muestra tres grupos bien definidos que corresponden a la identificación morfológica y fisiológica.	79

1. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes pueden degradar y asimilar los nutrientes contenidos en el exoesqueleto o caparazón de camarón y cangrejo, debido a la presencia de bacterias ruminales que usan la quitina como sustrato (Cobos y Yokoyama, 1995). En México se recolectan 61 mil t de camarón de mar y 61 mil t de camarón de granja, cantidad que aumentó 40% respecto al año 2003 (Corral, 2004). En el proceso de extracción de la carne se genera aproximadamente 100 mil t anuales de caparazón de cangrejo y camarón. Este subproducto se puede usar para la extracción de quitina y la producción de quitosano, que tienen diferentes usos en la industria (Lárez-Velásquez, 2003). Sin embargo, la demanda de caparazón de camarón es menor a su oferta, por lo que es común observar su acumulación en el mar y en lugares cercanos a las cooperativas camaroneras, lo que ha provocado problemas de contaminación ambiental. Considerando el valor nutritivo del caparazón de camarón, se considera que su uso en la alimentación de rumiantes puede ayudar a solucionar el problema de contaminación ambiental sin que se afecte negativamente la eficiencia productiva de los animales o la rentabilidad de una empresa ganadera (Nicholson *et al.*, 1996). Por ejemplo, la inclusión de caparazón de camarón y cangrejo en dietas para borregos disminuye el uso de pasta de soya u otras fuentes nitrogenadas usadas para cubrir los requerimientos de proteína, lo cual reduce los costos de alimentación (Cobos *et al.*, 2002). Además la sustitución de pasta de soya por harina de caparazón de camarón o cangrejo no afecta la eficiencia productiva de bovinos y ovinos, debido en parte a que los aminoácidos esenciales que forman la proteína del caparazón de camarón y cangrejo son similares a los presentes en la pasta de soya (Spinelli *et al.*, 1974).

La eficiencia de los rumiantes para nutrirse a partir de forrajes y subproductos que tienen un nulo o escaso valor nutritivo para otras especies, se debe a la actividad de diversos microorganismos presentes en el rumen incluyendo: protozoarios ciliados ($10^4 - 10^6$ mL⁻¹), hongos ($10^3 - 10^5$ mL⁻¹),

bacteriófagos ($10^8 - 10^9$ mL⁻¹) y bacterias ruminales ($10^{10} - 10^{11}$ células mL⁻¹), aunque no todos los microorganismos pueden ser cultivables (Kamra, 2005). En particular, se han aislado diferentes especies de bacterias que degradan quitina como: *Vibrio harviyi* y *V. frunci* en el medio marino (Montgomery y Kirchman, 1993); especies de los géneros *Myxobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* y *Flavobacterium* aisladas de suelos (Goody, 1990b); mientras que Cobos y Yokoyama (1995) reportaron el aislamiento de una bacteria ruminal (*Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*) en el contenido ruminal de vacas lecheras.

Para identificar bacterias es importante usar métodos basados en procedimientos de genética molecular que permiten detectar secuencias específicas del ADN de cada género y especie microbiana. Mediante estos procedimientos se ha reclasificado varias bacterias ruminales (Krause y Russell, 1996). El método usado en laboratorios de diagnóstico es el PCR (Polymerase Chain Reaction), con el cual puede aumentarse la cantidad de ADN hasta niveles detectables mediante electroforesis o con sondas de ADN (Madigan *et al.*, 2004; Valadez y Kahl, 2005).

El propósito de este trabajo fue seleccionar bacterias quitinolíticas capaces de degradar caparazón de camarón *in vitro* y las bacterias fueron aisladas de líquido ruminal liofilizado obtenido de borregos alimentados con 25% de caparazón de camarón en la dieta durante 60 d (Pérez-Sato, 2001). El estudio realizado es parte de un proyecto que tiene como meta desarrollar un inóculo de bacterias ruminales quitinolíticas que permitan un uso efectivo del caparazón de camarón como ingrediente en la formulación de dietas para borregos de carne. Para cumplir dicho propósito se plantearon los siguientes objetivos: 1) Aislar mediante el uso de cultivos anaerobios selectivos con quitina pura o caparazón de camarón bacterias quitinolíticas a partir de un cultivo mixto obtenido de borregos alimentados durante 60 d con una dieta que contenía 25% de caparazón de camarón. 2) Determinar la capacidad de

degradación de quitina pura y caparazón de camarón de cada bacteria aislada y seleccionar las más eficientes. 3) Caracterizar el tipo de fermentación (concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal) en tres medios de cultivo (glucosa, quitina pura y caparazón de camarón) de las bacterias seleccionadas. 4) Identificar las bacterias seleccionadas mediante pruebas de morfología colonial, microscópicas y genéticas (secuenciación del gen 16S rARN).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Quitina

La quitina es un polisacárido natural, abundante y ampliamente distribuido en el mundo, al igual que la celulosa (Sakurada *et al.*, 1996; Svitil y Kirchman, 1998; Ravi-Kumar, 2000; Saito *et al.*, 2002; Fadel El-Seed *et al.*, 2003). Las fuentes de quitina incluyen diversas formas de organismos marinos (crustáceos, moluscos, colenterados), insectos, protozoarios, hongos y algunas algas verdes (Sugita *et al.*, 1996). Hay varias formas cristalinas de quitina, pero las más comunes son la α -quitina y la β -quitina; la α -quitina se encuentra en hidrozooos, mientras que la β -quitina forma parte de las cubiertas de los braquiópodos, moluscos, crustáceos, insectos y del esqueleto de peces y calamares (Saito *et al.*, 2002). La quitina se extrae del exoesqueleto de camarones o cangrejos mediante un tratamiento químico con álcalis y ácidos para remover pigmentos, carbonato de calcio y proteínas (Parada *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2002).

La quitina es un material insoluble en agua, presenta baja reactividad química, es un polisacárido blanco, duro, inelástico y nitrogenado, y es la principal fuente de contaminación de áreas costeras (Muzzarelli, 1973; Zikakis, 1984). La quitina y el quitosano (forma desacetilada de la quitina) son de interés comercial debido a su contenido de nitrógeno (6.89% de MS), que es superior al de la celulosa (1.25%, Muzzarelli, 1973; Shahidi y Synowieckit, 1991; Fadel El-Seed *et al.*, 2003). La quitina puede ser desacetilada mediante una digestión alcalina (1 a 3 h) en una solución 40 a 50% de hidróxido de sodio a 120 °C; y se obtiene aproximadamente 30 a 70% de quitosano (Ravi-Kumar, 2000).

El peso molecular de la quitina es 1.03×10^6 a 2.5×10^6 y en el quitosano es 1×10^5 a 5×10^5 (Ravi-Kumar, 2000; Kato *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2007). Estos compuestos (quitina y quitosano) se producen industrialmente en la India, Japón, Polonia, Noruega y Australia y tienen diferentes usos comerciales (Ravi-Kumar, 2000; Mármol *et al.*, 2006). La quitina, al igual que el quitosano, tiene muchas aplicaciones en medicina, fotografía, cosméticos, captura de metales pesados en aguas negras y en la producción de alimentos. Dentro de la biotecnología se ha empleado en agricultura, ganadería, como agente antibacteriano y anticoagulante (Ravi-Kumar, 2000; Shahidi y Synowieckit, 1991; No *et al.*, 2007). Además se estudian como posibles ingredientes para dietas de rumiantes (Fadel El-Seed *et al.*, 2003; Cobos; *et al.*, 2002; 2007).

2.2 Caparazón de camarón y cangrejo

Los desechos de caparazón de camarón y cangrejo durante su acumulación y degradación producen residuos considerados agentes químicos tóxicos, los cuales si no tienen un manejo adecuado pueden convertirse en un riesgo para el ambiente y la salud humana con la consecuente afectación de la integridad de los atributos ecológicos de los sistemas naturales acuáticos y terrestres (Mohammad *et al.*, 2005). Sin embargo, como ingrediente en la formulación de dietas para rumiantes, el exoesqueleto de camarón y cangrejo tiene potencial por su abundancia como desperdicio de la industria pesquera. Además, el caparazón es una fuente de proteínas, carbonato de calcio y magnesio (González, *et al.*, 2001). En otros sistemas de producción se ha reportado que los carotenoides presentes en el desecho del caparazón de camarón se incorporan a dietas para pescado, principalmente del salmón para favorecer la coloración rosa de la carne (Satio y Regier, 1971; Chen *et al.*, 1984; Long y Haard 1988).

2.3 Composición química del caparazón de camarón y otros crustáceos

Cuando la carne de camarón o de cangrejo son procesados solo se aprovecha entre 15 a 20% del peso, mientras que 80% restante se desecha y acumula en zonas costeras (Patton *et al.*, 1975). Los residuos obtenidos durante la extracción de la carne de camarón, cangrejo y langostino son principalmente cabezas, patas caparazón y vísceras que contienen 30 a 40% de proteína, 30 a 40% de minerales y 14 a 35% de quitina (Velez *et al.*, 1991). Químicamente la quitina está constituida por unidades de *N*-acetil-glucosamina con enlaces β -1,4-glicosídicos (Knorr, 1991; Sakurada *et al.*, 1996). Aunque la composición del caparazón de camarón varía (Cuadro 1), este subproducto está compuesto principalmente por proteína, quitina y calcio, los cuales pueden ser aprovechados por los rumiantes.

El contenido de aminoácidos esenciales de la proteína del caparazón de camarón y de cangrejo es similar al de la pasta de soya. La proteína del caparazón de camarón tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales, los cuales pueden servir como un excelente componente para formular dietas para rumiantes y peces (Cuadro 2). Además, la proteína de caparazón de cangrejo es de menor calidad que la del camarón y de la pasta de soya (Cuadro 2), debido a su menor contenido de lisina, leucina e isoleucina (Spinelli *et al.*, 1974). Sin embargo, la pasta de soya presenta una mayor digestibilidad *in vitro* (del 100% a las 60 h de fermentación) mientras que los desechos de camarón y cangrejo tienen una degradación aproximada de 35.9% MS y 50.2% de la proteína a las 60 h, lo cual depende del tamaño de partícula (Velez *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Composición química del caparazón de camarón.

Nutrientes	Revah-Moissev Carroad, 1981	y Watkins 1982	et al., Cobos et al., 2002
	Materia seca, %		
Materia seca	80.00	93.90	85.00
Proteína	27.90	34.12	32.31
Extracto etéreo	nd	4.31	2.43
Cenizas	6.00	29.39	26.45
Calcio	0.28	13.75	3.01
Fósforo	nd	2.08	1.40
Quitina*	21.40	17.59	15.73
Carbonato de calcio	40.00	nd	nd
Elementos (ppm)			
Ca	3.65	nd	nd
Co	0.00	nd	nd
Cu	2.30	nd	nd
Mn	0.29	nd	nd
Ni	0.20	nd	nd
Fe	2.93	nd	nd
Zn	1.83	nd	nd

nd = no determinado; * Determinada como fibra detergente ácido (FDA).

Cuadro 2. Porcentaje de aminoácidos esenciales en la proteína de caparazón de camarón, cangrejo y pasta de soya.

Aminoácidos	Spinelli <i>et al.</i> , 1974	Watkins <i>et al.</i> , 1982	Spinelli <i>al.</i> , 1974	NRC, 1996
	Camarón, %		Cangrejo, %	
Arginina	6.13	7.16	6.66	6.55
Histidina	2.24	2.79	3.58	2.82
Isoleucina	5.78	4.76	2.67	4.65
Leucina	7.01	7.06	5.14	7.23
Lisina	6.58	6.93	2.51	5.36
Metionina	2.41	3.67	1.93	1.01
Fenilalanina	5.13	5.99	5.98	4.94
Treonina	4.14	3.87	4.74	3.52
Triptofano	1.19	nd	0.78	1.64
Valina	5.95	5.93	7.07	5.09

nd = no determinado.

2.4 Estructura de la molécula de quitina

La quitina (poli-[1-4]- β -N-acetil-D-glucosamina), uno de los componentes más abundantes de la naturaleza después de la celulosa, se encuentra principalmente en el exoesqueleto de insectos, crustáceos y pared celular de algunos hongos (Rodríguez *et al.*, 2002). Es un biopolímero tipo polisacárido con una estructura similar a la celulosa; la diferencia se encuentra en el carbono 2 (Figura 1), donde el grupo hidroxilo de la celulosa está sustituido por un grupo N-acetil. El polímetro de quitina se forma por unidades de N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucosa) unidas por enlaces β -1-4 (González *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; Parada *et al.*, 2004).

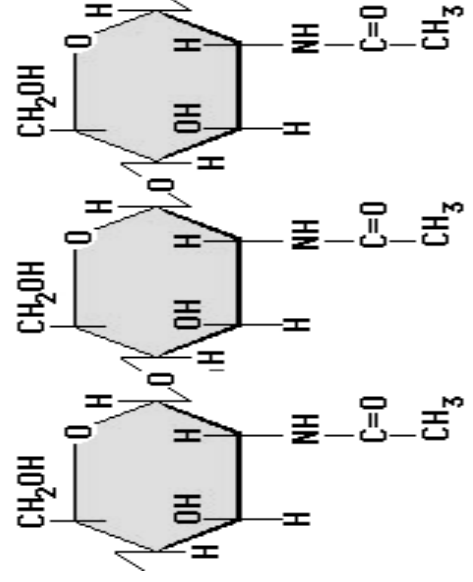


Figura 1. Estructura química de la quitina.

2.5 Fuente de caparazón de camarón

La producción mundial anual de desechos de caparazón de camarón, cangrejo, langosta, almeja, de origen marino se calcula en 1.44 millones t en base seca (Knorr 1991), mientras que la producción mundial anual de quitina (a partir de los desechos) es 120,000 t (Velez *et al.*, 1991). Otra fuente importante de caparazón de camarón proviene de la producción mundial de camarones de agua dulce, la cual aumentó poco más de 1300% en los últimos 10 años. En la producción de camarón de agua dulce se usan principalmente dos especies: *Macrobrachium rosenbergii* (60%) y *Macrobrachium nipponense* (38%). Los principales países productores son China, Vietnam, India, Tailandia, Bangladesh y Taiwan. En Latinoamérica el cultivo se inició en la década de 1970, se ha extendido en México y en casi todos los países del Sur y Centro América (Ponce-Palafox *et al.*, 2006). En México en el 2004 se produjeron 61 mil t de camarón de mar y 61 mil t de camarón de granja, un aumento de 40% respecto al 2003 y debido a tal crecimiento, a finales del 2003 se creó el Consejo Mexicano del Camarón, integrado por productores, distribuidores y comercializadores, y cuyo objetivo es promover y orientar al mercado nacional e internacional (Corral, 2004). Sin embargo, la producción de caparazón de

camarón representa un problema de contaminación ambiental en las zonas costeras donde se procesa, aunque debido a su valor nutritivo se puede usar en la alimentación de ganado (Nicholson *et al.*, 1996; Cobos *et al.*, 2002; 2007). Por tanto, se considera que el uso de estos subproductos en la alimentación de rumiantes permitirá disminuir problemas de contaminación ambiental generados por la acumulación de estos subproductos.

2.6 Microorganismos quitinolíticos en diferentes ambientes

Los organismos con una envoltura de quitina algunas veces son presa de diferentes depredadores que pueden hidrolizar la quitina hasta su monómero, mediante las enzima quitinasa (EC 3.2.1.14) y β -N-acetilglucosaminidasa (β -GlcNAcase; EC 3.2.1.30) (Svitil y Kirchman, 1998; Olsen *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2006). Estas enzimas son producidas por bacterias heterotróficas (Knorr, 1991; Sugita *et al.*, 1996) y hongos ruminales *Piromyces communis* OTS1 (Sakurada *et al.*, 1996), También se ha reportado el aislamiento de bacterias quitinolíticas asociadas o simbiontes de pulpos, calamar, peces y ballenas (Seki y Taga 1963, 1965). En la mayoría de los ecosistemas microbianos anaeróbicos la degradación de polisacáridos se logra por la combinación de diferentes especies bacterianas (Pel *et al.*, 1989). En la degradación de quitina en condiciones anaerobias Pel (1986), Pel *et al.* (1989) y Pel y Gottschal (1987,1989) reportaron que la cepa *Clostridium sp.* 9.1 (aislada del sedimento de barro) a concentraciones bajas de sustrato (0.1% MS) acumulo N-acetilglucosamina (NAG) en el medio de cultivo, pero cuando la cepa *Clostridium sp.* 9.1 se incubó junto con bacterias sacarolíticas, esta segunda especie consumió la NAG producida por *Clostridium sp.* 9.1., lo cual indica una interacción bacteriana para la degradación de quitina.

Las bacterias que degradan quitina se han aislado en numerosos hábitats y pueden ser especies Gram positivas o Gram negativas: *Vibrio harviyi* y *V. frunci* se encuentran en el ambiente marino (Montgomery y Kirchman, 1993;

Svitil y Kirchman, 1998); *Myxobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* y *Flavobacterium* se encuentran en el suelo (Gooday, 1990b). En diferentes suelos Sabry (1992) aisló diversas bacterias que pueden degradar quitina de caparazón de camarón mediante la producción de quitinasas; los microorganismos más activos fueron: *Alcaligenes denitrificans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. subtilis*.

Olsen *et al.* (2000) aislaron 44 bacterias de ballenas que se alimentaron de krill y otros crustáceos; los principales géneros aislados fueron: *Eubacterium* (25%), *Streptococcus* (18%), *Clostridium* (14%), y *Bacteroides* (11%). El 12% de ellas eran bacterias quitinolíticas, mientras que la actividad de la enzima β -N-acetilglucosaminidasa se demostró en 54% de las bacterias aisladas y la utilización de N-acetil-D-glucosamina se observó en el 73%. Las bacterias quitinolíticas aisladas pertenecían a los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y *Streptococcus*.

Varios compuestos de quitina en hongos e invertebrados son parte importante de la dieta de muchos herbívoros y carnívoros. La microflora típica de los peces marinos está dominada por bacterias característicamente quitinolíticas, principalmente de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Enterobacteriaceae* (Gooday, 1990a). Aunque hay poca información, algunos hongos quitinolíticos aislados de suelo de bosques tienen una actividad quitinolítica superior al de las bacterias quitinolíticas (Gooday, 1990b).

2.7 Microorganismos quitinolíticos ruminales

La degradación parcial de material quitinoso por microorganismos ruminales se ha reportado mediante la detección de N-acetil- β -glucosaminidasa de tipo extracelular en bacterias ruminales y en hongos usando 4-metillumbeliferil quitobiosa como sustrato (Sakurada *et al.*, 1996). Mediante esta técnica se comprobó que las enzimas quitinasa N-acetil- β -D-

glucosaminidasa y N-acetil- β -D-hexosaminidasa están distribuidas extensamente en bacterias, hongos e incluso en algunos protozoos (Sakurada *et al.*, 1996).

La producción de enzimas quitinasas se encuentra ampliamente distribuida entre bacterias ruminales de los géneros *Clostridium* y *Vibrio* (Clarke y Tracey, 1956) y en los hongos ruminales *Neocallimastix frontalis* (Gay *et al.*, 1988) y *Piromyces communis* OTS1 (Sakurada *et al.*, 1996). Cobos y Yokoyama (1995) reportaron el aislamiento en medios selectivos de una bacteria ruminal (*Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*) con alta capacidad para degradar quitina y caparazón de camarón. Según Cobos *et al.* (2002), la concentración de bacterias quitinolíticas tiene un significativo aumento en borregos alimentados con dietas con 15 a 25% de desecho de caparazón de camarón (9.5×10^5 y 9.5×10^6 bacterias mL^{-1} de fluido ruminal) en comparación con borregos alimentados con dietas sin el subproducto (2×10^4 bacterias mL^{-1} de fluido ruminal). Los mismos autores concluyen que se requiere de 30 a 60 d de adaptación para establecer una importante microflora ruminal quitinolítica, por lo que sugieren estudiar la producción de inóculos de bacterias quitinolíticas para mejorar el uso del caparazón de camarón como alimento para rumiantes.

2.8 Rutas metabólicas microbianas para la degradación de quitina

En 1995, Cobos y Yokoyama describen el proceso de degradación física de caparazón de camarón a través del microscopio electrónico por la bacteria ruminal *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*. En las primeras 24 h la bacteria crece y coloniza la superficie interna del caparazón de camarón, entre 24 y 72 h de incubación la bacteria comienza a degradar las capas de quitina que forman este desecho y a las 96 h de incubación, cuando el caparazón de camarón ha sido degradada, la bacteria entra a una fase de muerte y latencia. Metabólicamente la bacteria *C. paraputrificum* var. *ruminantium* puede degradar quitina siguiendo una de las dos vías posibles: 1) quitinolítica y 2) quitosano

(Figura 2). La vía quitinolítica es considerada la más importante y consiste en la hidrólisis completa de la quitina a unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina mediante la acción de las enzimas quitinasa y la *N*-acetil- β -glucosaminidasa que actúan consecutivamente a un pH óptimo de 6.5 y a una temperatura de 40 °C (Boller *et al.*, 1983; Sakurada *et al.*, 1996; Sastoque-Cala *et al.*, 2007). La hidrólisis de la quitina comienza con la ruptura de los enlaces glicosídicos β -1-4, por acción de la quitinasa. La exo-quitinasa produce unidades libres de *N*-acetil-glucosamina iniciando por el extremo no reductor del polímero; mientras que, la endo-quitinasa rompe puentes glicosídicos aleatoriamente a lo largo de la cadena de quitina, produciendo quitobiosa, quitotriosa, quitotetrosas y diacetilquitobiosa, la cual es transformada en dos unidades de *N*-acetilglucosamina por acción de la *N*-acetilglucosamidasa. La *N*-acetilglucosamina es transportada al interior de la bacteria y es transformada vía fosforilación a *N*-acetilglucosamina-6-fosfato y desaminada, obteniendo glucosa-6-P, NH_2 y CH_3 (Boller *et al.*, 1983; Sakurada *et al.*, 1996; Swiontek y Wojciech, 2006).

La otra vía alterna en la degradación de quitina es la del quitosano donde participan las enzimas: 1) quitin-diacetilasa que produce la desacetilación de quitina a quitosano; 2) quitosanosasa que hidroliza el polímero de quitosano y produce quitobiosa; 3) glucosamidasa que hidroliza la quitobiosa a glucosamina, la cual puede ser transportada al interior de la célula donde es desaminada. Finalmente, la glucosa liberada se puede incorporar a la ruta glucolítica y la bacteria usa el grupo amino para la síntesis de proteínas (Cobos, 1994; Sakurada *et al.*, 1996).

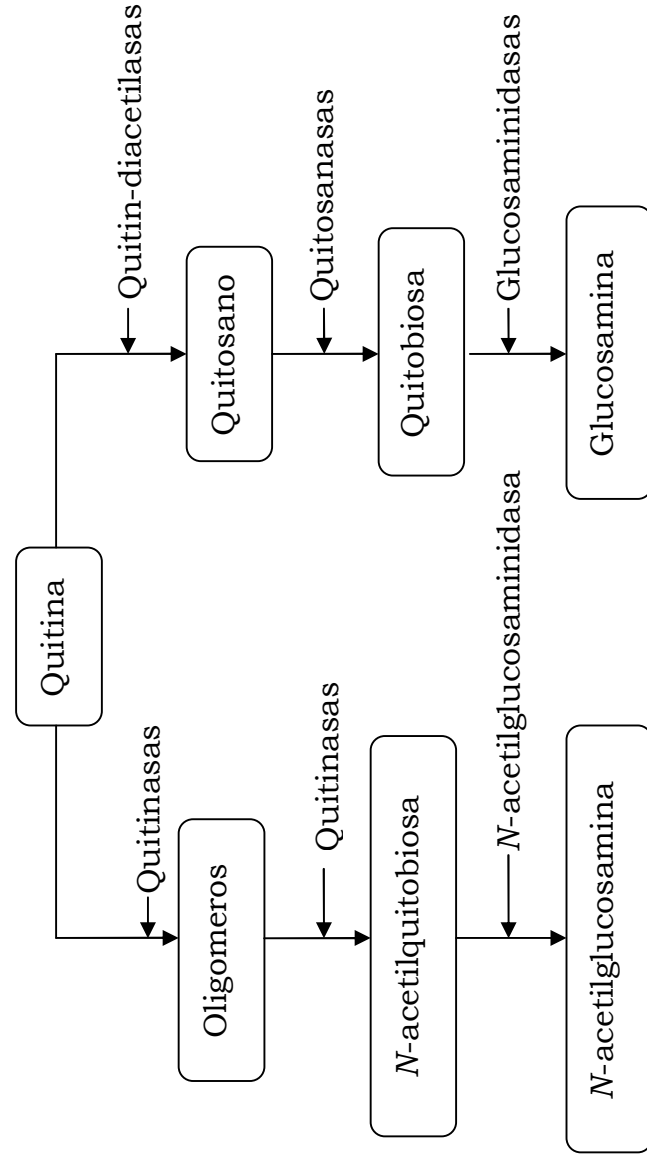


Figura 2. Rutas metabólicas para la degradación de quitina.

La glucosa producida desde la hidrólisis de la quitina se usa para generar AGV (ácidos grasos volátiles) y masa microbiana por acción de los microorganismos del rumen (Mathews y Van Holde, 1998). Después de la introducción de *N*-acetilglucosamina al citoplasma bacteriano es transformada a glucosa, ya sea por los propios microorganismos quitinolíticos u otros organismos ruminales. En el proceso se libera nitrógeno amoniacal (Figura 3) que puede ser usado por las bacterias ruminales para sintetizar proteína bacteriana. Durante el proceso también se produce 1 mol de acetato (Orskov *et al.*, 1979; Mathews y Van Holde 1998).

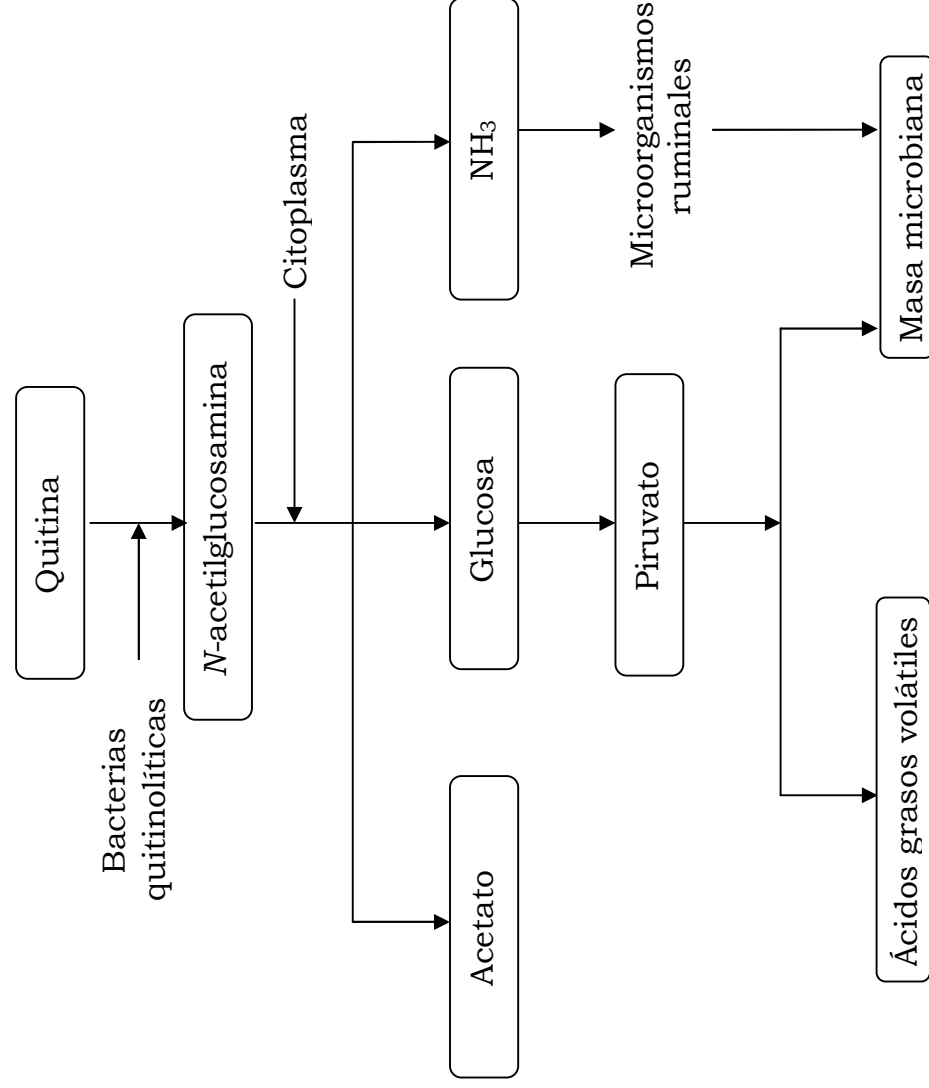


Figura 3. Ruta de fermentación de quitina en el rumen.

2.9 Uso de caparazón de camarón y cangrejo en la alimentación de rumiantes

El conocimiento de la digestibilidad de los desechos de camarón y cangrejo es básico para establecer su valor nutritivo y, por tanto, para la formulación de raciones para los animales rumiantes. Sin embargo, la determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso laborioso y costoso, que requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, por lo que se han propuesto distintos métodos de degradación *in vitro* con fluido ruminal fresco como inóculo (Bochi-Brum *et al.*, 1999).

Los protozoarios, hongos y bacterias son los principales componentes de la microflora involucrada en los procesos de fermentación de los polisacáridos estructurales de plantas o crustáceos consumidos para generar energía en forma de ácidos grasos volátiles para los rumiantes (Rezaeiana *et al.*, 2006). Aunque el rumen ha sido investigado por más de 50 años por microbiólogos y bioquímicos, es un ambiente tan complejo que no ha sido posible manipularlo fácilmente. Desde el inicio, las investigaciones del rumen se han orientado no sólo a la identificación de la microbiota, sino también en la búsqueda de la eficiencia de esos organismos para degradar más rápido y más extensivamente los nutrientes. Mucho de los intentos se han orientado hacia la modificación de los alimentos, remoción de algunos componentes estructurales y tratamientos sobre estos carbohidratos para hacerlos más accesibles a las enzimas microbianas (Hobson y Stewart, 1998).

Patton *et al.* (1975) evaluaron la inclusión de 10 y 20% de harina de cangrejo en dietas a base de heno, maíz y pasta de soya para novillos en crecimiento y concluyeron que la digestibilidad de la harina de cangrejo fue 66% y se cubrieron los requerimientos proteínicos de los novillos. La principal limitante del caparazón de camarón como ingrediente para la formulación de dietas es la cantidad de quitina (21% MS) la cual no puede ser eficientemente degradada por la mayoría de los animales domésticos (Cobos y Yokoyama, 1995). Sin embargo, los rumiantes están mejor adaptados que los no rumiantes para aprovechar los nutrientes de los subproductos de mariscos, debido principalmente a los microorganismos simbióticos en el rumen y porque algunas especies de estas bacterias pueden degradar y fermentar quitina a compuestos más simples (Brundage *et al.*, 1984; Cobos y Yokoyama, 1995). Según Nicholson *et al.* (1996), la harina de caparazón de cangrejo se puede usar como suplemento proteínico de sobrepaso en dietas para rumiantes porque es altamente resistente a la degradación en el rumen, pero es altamente digestible cuando sale del rumen. Según Brundage *et al.* (1981,1984), la harina de caparazón de cangrejo (*Paralithodes cantchatica* y *Chionoecetes bairdi*),

incluidas en la dieta (25.5% de la MS) de ganado lechero no causa efecto negativo en la producción o sabor de la leche, pero cuando se incluyó 30% en las dietas bajó el consumo de alimento, la ganancia de peso y se afectó el sabor de la leche; estos efectos negativos se atribuyeron a una baja palatabilidad y alto contenido mineral de la harina.

Estudios con ovinos en engorda muestran que la inclusión de desechos de caparazón de camarón en la dieta disminuye el uso de pasta de soya o de otros ingredientes usados para cubrir los requerimientos de proteína, lo que reduce los costos de producción por concepto de alimentación (Cobos *et al.*, 2002). Además la inclusión de harina de caparazón de camarón (0, 15 y 25%) no afectó el consumo de alimento promedio (1.405, 1.274, 1.183 kg d⁻¹) de los borregos en engorda por 72 d ni la conversión alimenticia, pero la ganancia de peso disminuyó progresivamente al aumentar el contenido de caparazón de camarón (18.62a, 15.50ba y 13.08b kg animal⁻¹). En el mismo estudio se determinó que no cambió la producción molar de AGV, el pH, la concentración de N-NH₃ ni la concentración de bacterias totales y celulolíticas, pero la concentración de bacterias quitinolíticas aumentó a los 30 d en borregos alimentados con 15 y 25% de caparazón de camarón (García-González, 2000).

En la mayoría de los ecosistemas microbianos anaerobios la degradación de los polisacáridos es el resultado de la actividad combinada de diferentes bacterias. La mezcla de bacterias quitinolíticas y bacterias fermentadoras de carbohidratos aumentan de 5 a 8 veces más la cantidad de quitina degradada (Pel *et al.*, 1989). Cobos *et al.* (2007) evaluaron la adición de un inóculo de una bacteria (*Streptococcus milleri*) con alta capacidad para degradar quitina en borregos en crecimiento alimentados con una dieta que contenía 25% de caparazón de camarón y determinaron que la adición de 0.12 g de inóculo de *S. milleri* aumentó significativamente el consumo de alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia fueron similares con respecto a los borregos que no fueron inoculados; además la población de bacterias quitinolíticas fueron

mayores a los 30 d en los animales inoculados. Por lo que concluyen, que puede usar eficientemente hasta 25% de caparazón de camarón como un ingrediente de la dieta, si se agrega un inóculo de bacterias con una alta capacidad para degradar caparazón de camarón en un nicho ecológico que requiere su interacción con otros microorganismos ruminales.

La degradación *in vitro* de la materia orgánica del caparazón de cangrejo es de 50 a 75% (Brundage *et al.*, 1979). La digestibilidad *in vivo* de los desechos de cangrejo y camarón usada como ingrediente en dietas para borregos es muy variable (26 a 87%) y, a pesar de esta variabilidad, esos desechos son una fuente potencial de energía que se puede usar para sustituir otras fuente de proteína de mayor valor económico (Brundage *et al.*, 1981). Abazinge *et al.* (1994) proponen métodos basados en el ensilaje de caparazón de cangrejo mezclados con rastrojos de maíz, avena, trigo o pastos como una alternativa más efectiva para la preservación, utilización y aprovechamiento como alimento para rumiantes; además, estas mezclas permiten la adición de aditivos como melaza (favorece la palatabilidad), urea o inoculantes bacterianos, que pueden mejorar el valor nutritivo y la digestibilidad del material ensilado.

Los desechos de camarón, cangrejo y langostino también se han evaluado en dietas para pollos, gallinas, conejos, gatos y pescados en concentraciones de 1 a 20%. Sin embargo en pollos y gallinas no es muy recomendable la adición de estos desechos en la dieta ya que la quitina estimula el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium* que pueden sintetizar lactosa en el intestino de estos animales y ocasionarles problemas de diarrea e incluso la muerte (Knorr, 1991, Fadel El-Seed *et al.*, 2003).

2.10 Aislamiento de bacterias ruminales

Para el aislamiento de microorganismos ruminales se requiere el uso de medios de cultivos que se asemejen a las condiciones físico-químicas presentes en el rumen. Por tanto, el medio de cultivo para bacterias ruminales debe contener fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, así como las condiciones de pH, temperatura, un potencial de oxido-reducción negativo y condiciones anaerobias que permitan un óptimo crecimiento y actividad de los microorganismos aislados (Mantilla y Álvarez, 2002).

Hungate en 1947 desarrolló un medio de cultivo con agentes reductores solución de minerales y fluido ruminal estéril, que permite el crecimiento de bacterias ruminales estrictamente anaerobias (Krause y Russell, 1996). El uso de las técnicas anaerobias propuestas por Hungate (1957) marcó el inicio del uso de medios selectivos que han permitido el aislamiento de bacterias amilolíticas (Hamlin y Hungate, 1956), fermentadoras de formato y malato (Wolin *et al.*, 1961) y productoras de ácido succínico (Bryant y Burkey, 1953). Siguiendo la metodología de Hungate (1969) y usando un medio selectivo que contenía quitina, Cobos y Yokoyama (1995) aislaron una bacteria del rumen de vacas lecheras identificada como *Clostridium parapatrificum* var. *ruminantium*. Esta bacteria no puede degradar celulosa, pero sí puede degradar quitina, caparazón de camarón y caparazón de cangrejo. Kopecny *et al.* (1996) aislaron bacterias quitinolíticas en heces y digesta de herbívoros silvestres y domésticos; la presencia de dichas bacterias en el rumen de vacas se verificó en medios de cultivo con fluido ruminal y quitina coloidal, calculándose una concentración entre 5×10^4 a 2×10^8 bacterias mL^{-1} de fluido ruminal. La mayoría de las bacterias aisladas de heces y fluido ruminal se identificaron como clostridios con capacidad para degradar quitina coloidal y producir principalmente acetato, butirato y lactato.

2.1.1 Identificación de bacterias ruminales

Tradicionalmente las bacterias han sido clasificadas por características fenotípicas (forma de la célula, presencia o ausencia de flagelos, anaerobios o aerobios, capacidad de fermentar carbohidratos y atributos nutricionales) pero estas características aportan pocos criterios significativos evolutivos o filogenéticos. La comparación de las secuencias del 16S rARN, ha facilitado enormemente la identificación de bacterias incluyendo aquellas que difícilmente son cultivables. Consecuentemente, se pueden utilizar las secuencias para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su ADN (Krause y Russell, 1996). Por tanto, para identificar bacterias es importante usar métodos sustentados en el análisis de secuencias de ADN específicas para un determinado microorganismo. Un método valioso para el proceso de secuenciación es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction). Con esta reacción se puede aumentar la cantidad de ADN hasta niveles detectables mediante electroforesis o mediante sondas de ADN (Madigan *et al.*, 2004; Valadez y Kahl, 2005). La comparación de secuencias de algunas macromoléculas es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas de las especies (Murray *et al.*, 1999), debido a que permite interpretaciones cuantitativas y directas sobre cercanías evolutivas; además, se conforma una creciente base de datos disponibles en el mundo (Pace *et al.*, 1986).

Se ha usado el gen 16S rARN para la identificación y estudio de muchas especies y grupos específicos de bacterias del rumen como *Ruminococcus albus*, *Clostridium proteoclasticum*, *Butyrivibrio fibrosolvens* (Kobayashi *et al.*, 2000) y *Methanomicrobium mobile* (Yanagita *et al.*, 2000). Todos estos estudios se han basado en el uso de secuencias de ADN de cepas cultivadas de bacterias ruminales que han sido clasificadas en algún género y especie por sus características metabólicas derivadas de experimentos *in vitro*. Sin embargo, es posible que la verdadera diversidad del ecosistema ruminal se haya

subestimado. Kamra (2005) menciona que la clasificación de bacterias ruminales basada en características fenotípicas y pruebas bioquímicas no es suficiente para identificarlas ya que bacterias como *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus* parecen ser fenotípicamente y bioquímicamente similares. Por tanto, es necesario un análisis filogenético a partir del gen 16S rARN de las bacterias para una identificación más verídica. La comparación de las secuencias del 16S rARN ha facilitado en gran medida la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, y la elucidación de sus relaciones filogenéticas. Las relaciones filogenéticas determinadas mediante secuenciación se representan mediante una gráfica de conexiones en forma de árbol, lo que facilita identificar las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas (Eisen *et al.*, 1992).

El uso de métodos de genética molecular ha permitido reclasificar varias bacterias ruminales que habían sido clasificadas con base a su perfil metabólico, morfología y tinción Gram: *Bacteroides amylophilus* es ahora *Ruminobacter amylophilus* y *Bacteroides succinogenes* ha sido reclasificada como *Fibrobacter succinogenes*; además, se han identificado nuevas bacterias aisladas del rumen como por ejemplo *Clostridium aminophilum* (Krause y Russell, 1996). De acuerdo con los resultados de la secuencia 16S del rARN e hibridación ADN, se concluye que la diversidad de géneros y especies bacterianas del rumen está subestimada. Además, los métodos tradicionales de identificación bacteriana basada en pruebas bioquímicas son laboriosos y algunas bacterias ruminales no crecen en medios de cultivo. Por tanto, una ventaja de los métodos moleculares para la clasificación bacteriana es que no se requieren cultivos *in vitro* y se puede identificar bacterias con sólo una célula o muestras directas de microorganismos no cultivables (Krause y Russell, 1996).

2.12 Genómica nutricional, nutrigenética y nutrigenómica

Los avances en áreas del conocimiento de la genética y la nutrición han favorecido el surgimiento de la genómica nutricional, la cual estudia la interacción entre los alimentos y sus componentes con el genoma a nivel molecular, celular y sistémico (García-Vallejo, 2004). Uno de sus objetivos es usar la dieta para prevenir y tratar enfermedades y hay dos campos de acción y de investigación. Uno es la nutrigenética, que estudia el efecto de la variación genética en la interacción entre la dieta y la enfermedad, incluyendo la identificación y caracterización de las variantes genéticas de cada animal asociadas a las diferentes respuestas a los nutrientes; y su objetivo es elaborar recomendaciones sobre riesgos y beneficios de dietas concretas o de componentes dietéticos aislados para cada animal teniendo en cuenta sus genes, por lo cual se la conoce como nutrición personalizada o individualizada. Otra área es la nutrigenómica que estudia el efecto de los alimentos, nutrientes y componentes alimentarios bioactivos sobre el genoma (el ADN), el proteoma (las proteínas) y el metaboloma (los metabolitos); es decir, analiza el efecto de los nutrientes en la expresión y respuesta de los genes, si éstos se activan o se inactivan, y con qué frecuencia. Se considera que la genómica nutricional permitirá organizar dietas que eviten o retarden la aparición de enfermedades graves en los animales y así poder mejorar la producción ya sea de la canal o de leche (Pérez *et al.*, 2005; Mutch *et al.*, 2005; Marti *et al.*, 2005; Casas, 2006).

Aunque la investigación realizada se enfoca en el aislamiento e identificación molecular de bacterias ruminales quitinolíticas, la meta es producir un inóculo bacteriano que puede influir en la expresión genética y metabólica de los animales inoculados. Por tanto es recomendable seguir los avances en las áreas de nutrigenómica y que permitirán un uso más racional y eficiente de un inóculo bacteriano con el cual se pretenda mejorar la eficiencia productiva de los rumiantes.

3. OBJETIVO GENERAL

Aislar y seleccionar bacterias ruminales quitinolíticas con alta capacidad para degradar quitina pura y caparazón de camarón a partir de un cultivo mixto obtenido de borregos alimentados con una dieta con 25% de caparazón de camarón. Además identificar genéticamente a la bacteria o bacterias que tengan la mayor capacidad para degradar quitina o caparazón de camarón.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1)** Aislar bacterias quitinolíticas a partir de un cultivo mixto obtenido de borregos alimentados con una dieta con 25% de caparazón de camarón, usando cultivos anaerobios con glucosa, quitina pura o caparazón de camarón.
- 2)** Determinar la capacidad de degradación de quitina pura y caparazón de camarón de cada bacteria aislada y seleccionar aquellas que causen la mayor degradación.
- 3)** Evaluar la concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal en tres medios de cultivo (glucosa, quitina pura y caparazón de camarón) por las bacterias seleccionadas.
- 4)** Identificar las bacterias seleccionadas mediante pruebas fenotípicas (morfología colonial, celular y tipo de fermentación) y genéticas (secuenciación del gen 16S rARN).

4. HIPÓTESIS

- 1) Se puede aislar las bacterias ruminales quitinolíticas que tengan una mayor capacidad para degradar quitina pura y caparazón de camarón usando medios de cultivo anaerobios selectivos con quitina pura y caparazón de camarón como única fuente de carbono.
- 2) Mediante la amplificación de la subunidad 16S de rARN bacteriano se puede identificar filogenéticamente las especies bacterianas quitinolíticas aisladas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ruminal perteneciente al programa de Ganadería, Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, de enero del 2006 a septiembre del 2007.

5.1 Activación del cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ) liofilizada

Se usó un cultivo mixto liofilizado de bacterias quitinolíticas (CMBQ) obtenido por Pérez-Sato (2001). Este CMBQ se obtuvo del fluido ruminal de borregos alimentados 60 d con una dieta con 25% (BS) de caparazón de camarón y estuvo almacenado poco más de cuatro años. Para activar el CMBQ se rehidrató el inóculo en un medio de cultivo con quitina pura como única fuente de carbono (Ch-FR; Cuadro 3). Se agregó, con flujo de CO₂, 0.05 g del CMBQ en tubos con 4.5 mL de medio de cultivo y se incubó 48 h a 39 °C.

5.2 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el cultivo CMBQ reactivado

En un matraz Erlenmeyer de bola (1000 mL) se preparó medio de cultivo anaerobio sin fuente de carbohidratos, el cual se esterilizó 20 min a 121 °C. El medio de cultivo se vertió (4.5 mL), con flujo de CO₂, en tubos de cultivo esterilizados (16x100 mm) que contenían 0.05 g de quitina pura, y en los tubos se agregaron 0.5 mL del CMBQ rehabilitado. La concentración de bacterias totales por 0.1 g de liofilizado se calculó por la técnica del NMP (Harrigan y McCance, 1979) con tres repeticiones y diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹³. Los tubos inoculados con el CMBQ rehabilitado se incubaron a 39 °C y el crecimiento microbiano se monitoreó cada 24 h por 72 h. Se consideró como crecimiento

positivo a todos los tubos que presentaron turbidez. Para calcular un rango estadístico con 95% de confiabilidad se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias} = \text{NMP} / 4.68 \text{ a NMP} \times 4.68.$$

Cuadro 3. Composición de tres medios de cultivo (por cada 100 mL de medio).

Reactivos	G-FR	Ch-FR	CC-FR
Agua destilada (mL)	52.6	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL)	30.0	30.0	30.0
Solución mineral I (mL)	5.0	5.0	5.0
Solución mineral II (mL)	5.0	5.0	5.0
Solución de resazurina al 0.1% (mL)	0.1	0.1	0.1
Peptona triptícase (g)	0.2	0.2	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1	0.1	0.1
Solución de carbonato de sodio al 8% (mL)	2.5	2.5	2.5
Solución de cisteína (mL)	2.0	2.0	2.0
Agar (g)	2.0	2.0	2.0
Glucosa (g)	1.0	- - -	- - -
Quitina (g)	- - -	1.0	- - -
Caparazón de camarón (g)	- - -	- - -	1.0
pH	6.5	6.5	6.5

Líquido ruminal clarificado: previamente filtrado en tela cielo, centrifugado a 11,000 rpm, por 15 minutos y esterilizado 35 min a 121 °C (tres veces)
Solución mineral I: 6 g de K_2HPO_4 (para 1000 mL).
Solución mineral II: 6 g de KH_2PO_4 , 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12 g NaCl, 2.45 g MgSO_4 y 1.6 g de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (para 1000 mL).
Solución de cisteína: disolver 2.5 g de L-cisteína en 50 mL de agua destilada. Ajustar el pH de la mezcla a 10 con NaOH al 10% (4 N). Añadir 2.5 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y aforar a 200 mL. Pasar la mezcla a un matraz de bola y llevar a ebullición de mezcla con flujo de CO_2 . El matraz de bola con la muestra disuelta se cierra con un tapón de hule y se esteriliza a 121 °C por 15 min.
Solución de resazurina 0.1%: (0.1 g de resazurina) en un volumen final de 100 mL, de H_2O calentar para disolver y esterilizar.

5.3 Primer aislamiento de bacterias quitinolíticas, usando el CMBQ reactivo

Se prepararon 6 tubos (16x100 mm) con 4.5 mL de medio de cultivo para bacterias ruminales quitinolíticas y 0.05 g de quitina pura como única fuente de carbono (Ch-FR; Cuadro 3). Los tubos de cultivo se esterilizaron 20 min a 121 °C y se incubaron 24 h a 39 °C para asegurar su esterilidad y anaerobiosis. Cada tubo se inoculó con 0.01 g del CMBQ y se incubó 7 d a 39 °C liberando el gas producido cada 24 h, se transfirieron 0.5 mL del cultivo y se depositaron en tubos de cultivo con 4.5 mL de medio Ch-FR y se incubaron 7 d; se repitió una vez el proceso descrito. Se obtuvieron seis consorcios bacterianos: BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT5, BQT6, que se depositaron individualmente en seis frascos serológicos con 50 mL medio de cultivo Ch-FR y se incubaron 48 h a 39 °C. Los frascos se congelaron 24 h a 0 °C antes de ser liofilizados, lo cual se hizo en una liofilizadora (LABCONCO; USA) a -40 °C y un vacío de 133×10^{-3} mBar. Las muestras se liofilizaron 72 h, hasta obtener un producto libre de humedad.

5.3.1 Comparación de la degradación de quitina pura entre los seis consorcios bacterianos obtenidos del CMBQ

Se comparó la degradación de quitina pura comercial (SIGMA; USA) entre los seis consorcios bacterianos liofilizados para seleccionar aquél con mayor degradación de quitina y continuar el proceso de aislamiento de bacterias quitinolíticas. Se prepararon 7 viales (100 mL) con 20 mL de medio de cultivo para bacterias quitinolíticas (Ch-FR) y 0.2 g de quitina como fuente de carbono a un pH de 6.5 (Cuadro 3). Los viales se esterilizaron 20 min a 121 °C y se incubaron 24 h a 39 °C para asegurar esterilidad. Cada vial se inoculó con 0.05 g del liofilizado de BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT5, BQT6 y CMBQ, se incubó 48 h a 39 °C hasta una concentración final de 10^9 bacterias mL⁻¹ de medio de cultivo. Luego se inoculó por triplicado 1 mL de cada consorcio aislado en tubos

de cultivo (18x150 mm) con 8.9 mL de medio de cultivo Ch-FR más 0.1 g de quitina se ajustó el pH del medio a 6.5 con 2.5 mL de Na₂CO₃ 100 mL⁻¹ al 8% y HCl 4N para alcalinizar ó acidificar el medio de cultivo. Los tubos de cultivo inoculados se incubaron 72 h a 39 °C, tomando muestras (había tubos para cada 24 h de fermentación) cada 24 h para calcular el porcentaje de degradación de quitina, y el pH se midió con un potenciómetro (Orion, modelo 710A; México) calibrado a pH 4 y 7.

5.3.2 Determinación del porcentaje de degradación de quitina

Cada 24 h de fermentación se recuperó por filtración en papel Whatman No. 541 la quitina no degradada presente en los medios de cultivo. Los filtros de papel Whatman con el residuo se deshidrataron 24 h en una estufa a 60 °C, se dejaron 24 h en un secador y se pesaron en una balanza analítica. Por diferencias entre peso inicial y final se calculó el porcentaje de degradación de MS en cada muestra:

$$\% \text{ Quitina degradada} = \left[\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right] \times 100$$

El diseño estadístico fue completamente al azar, se hizo un análisis de varianza de los datos con GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

5.3.3 Conteo de bacterias totales

El conteo bacteriano se realizó con una cámara Petroff-Hausser y un microscopio de contraste marca Zeiss a una magnificación de 1000X. El conteo de bacterias se hizo en el cuadro central de la cámara Petroff-Hausser con un área de 0.05 mm² y una profundidad de 0.02 mm (Madigan *et al.*, 2004). La

concentración de bacterias mL^{-1} de medio de cultivo se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Concentración de bacterias} = (\text{Promedio}) (\text{factor de dilución}) (2 \times 10^7)$$

5.3.4 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el consorcio bacteriano BQT1

Como resultado de la comparación en la degradación de quitina pura entre los seis consorcios bacterianos quitinolíticos aislados (BQT1 – BQT6) se seleccionó al BQT1 para continuar su caracterización y aislamiento de bacterias quitinolíticas, debido a que mostró el mayor porcentaje de degradación de la MS de quitina. En un matraz Erlenmeyer de bola (1000 mL) se prepararon 300 mL de medio de cultivo anaerobio (Ch- FR; Cuadro 3) y se esterilizó 20 min a 121 °C. El medio de cultivo (4.5 mL) se vertió, con flujo de CO_2 , en tubos (16x100 mm) esterilizados que contenían 0.05 g de quitina, se inocularon con 0.05 g del consorcio BQT1 y se incubaron 48 h a 39 °C, con el fin de rehabilitar las bacterias quitinolíticas. La concentración de bacterias por 0.1 g de liofilizado se calculó con la técnica del NMP (Harrigan y McCance, 1979), usando tres repeticiones y diluciones de 10^{-1} a 10^{-13} . Los tubos inoculados con BQT1 se incubaron a 39 °C y el crecimiento microbiano se monitoreó cada 24 h por 72 h. Se consideró como crecimiento positivo a todos los tubos que presentaron turbidez.

5.3.5 Comparación de la degradación de quitina pura y caparazón de camarón por BQT1 a diferentes pH

Para determinar el efecto del pH en la degradación de quitina ó caparazón de camarón se prepararon medios de cultivo con un pH inicial de 6.0, 6.5 y 7.0 y se inocularon con el consorcio BQT1 a una concentración inicial de 10^9 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo. La degradación de los sustratos se midió a

las 72 h de fermentación. Los tubos de cultivo a pH 6.0, 6.5 y 7.0 se prepararon de la siguiente manera: 45 tubos de cultivo con 0.1 g de quitina y 45 tubos con 0.1 g de caparazón de camarón cada uno. El pH de los tubos de cultivo se ajustó a 6.0 y 6.5 con HCl 4N y a 7.0 con NaOH 4 N.

El diseño experimental fue completamente al azar y con los datos de pH, porcentaje de degradación de quitina pura y porcentaje de degradación de caparazón de camarón se hizo un análisis de coeficiente de correlación y regresión lineal con los procedimientos CORR y REG. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998; Johnson y Kubby, 1999).

5.4 Segundo aislamiento de bacterias quitinolíticas usando el consorcio BQT1

Para el aislamiento de bacterias en el consorcio bacteriano BQT1 se usaron tres medios de cultivo con quitina pura, caparazón de camarón y glucosa como fuentes de carbono (Cuadro 3). El consorcio bacteriano BQT1 (liofilizado) se rehabilitó usando la técnica descrita en el punto 5.1; se agregaron 0.027 g de liofilizado en 20 mL de medio de cultivo Ch-FR y se incubó 48 h a 39 °C. El conteo de bacterias totales por mL de medio de cultivo se hizo con una cámara Petroff-Hauser usando la misma técnica del punto 5.3.3.

5.4.1 Preparación de las cajas Petri con diferentes fuentes de carbono

Para cada medio de cultivo sólido con quitina, caparazón de camarón o glucosa, se realizó lo siguiente: en tres matraces Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 240 mL de medio de cultivo para bacterias ruminales y 2.4 g de quitina, caparazón de camarón o glucosa (Ch-FR, CC-FR ó G-FR), se ajustó el pH a 6.5 con HCl 4N y se agregaron 20 g L⁻¹ de agar bacteriológico. Después de

esterilizar los medios de cultivo 20 min a 121 °C, se depositaron 15 mL en placas Petri estériles, dejándolas a temperatura ambiente (25 °C) para que solidificaran. Se guardaron las cajas Petri en una jarra de anaerobiosis, se incubaron 24 h a 39 °C para confirmar su esterilidad y se inocularon en una campana de flujo laminar vertical (LABCONCO Purifier Class II Biosafety cabinet; USA), haciendo diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) del consorcio microbiano BQT1. De las diluciones se inocularon 100 µL en las placas de Petri y se sembraron por la técnica de barrido con rastrillos de plástico estériles. Luego las placas Petri se colocaron en una jarra de anaerobiosis con un sobre de GasPak para producir condiciones anaerobias y se incubaron 48 h a 39 °C.

5.4.2 Conteo y selección de colonias

Después de 48 h de incubación se realizó el conteo de colonias tomando en cuenta las placas que contenían entre 30 a 300 UFC. Se seleccionaron las seis colonias más abundantes, que crecieron en los medios de cultivo sólidos a base de quitina, caparazón de camarón ó glucosa y se resembraron usando una asa bacteriológica en otras cajas Petri que contenía el mismo medio de cultivo, para asegurar su purificación. Una vez aisladas y purificadas las bacterias se liofilizaron: se prepararon frascos serológicos con 30 mL de medio de cultivo Ch-FR, CC-FR, G-FR, se inocularon con las bacterias aisladas, se incubaron 48 h a 39 °C, se congelaron 48 h a 0 °C y se liofilizaron a -40 °C con una presión de vacío de 133×10^{-3} mBar.

5.4.3 Pruebas microbiológicas

En cada bacteria aislada, purificada y liofilizada (18 en total) se hicieron pruebas de tinción Gram y morfología colonial y bacteriana (Madigan *et al.*, 2004). Para la morfología colonial se midió el diámetro, aspecto, coloración, elevación y bordes de las colonias usando una lupa del equipo para contar colonias. Para caracterizar la morfología, las bacterias se observaron con un

microscopio de contraste (OLYMPUS modelo BX51; USA) a una magnificación de 1000X y se tomaron fotos digitales con una cámara Evolution VF adaptada al microscopio.

5.4.4 Determinación de la degradación de quitina puara y caparazón de camarón de las bacterias aisladas usando BQT1

Se determinó el porcentaje de degradación de quitina pura y caparazón de camarón en las 18 bacterias aisladas de los tres medios de cultivo (glucosa, quitina y caparazón de camarón) durante 72 h de incubación en un medio de cultivo que contenía quitina ó caparazón de camarón, usando el procedimiento descrito en el punto 5.3.1 a un pH inicial en los medios de cultivo de 6.5. El diseño estadístico fue completamente al azar, se hizo un análisis de varianza de los datos con GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

5.5 Tercer aislamiento de bacterias quitinolíticas (Q6a y Q6b) usando el consorcio microbiano Q6

En la Figura 4 se describen los procesos de aislamiento selección de bacterias quitinolíticas puras iniciando con el CMBQ, seguido de la obtención de los consorcios bacterianos BQT1 a BQT6, de los cuales se selecciono el consorcio bacteriano BQT1 que causó la mayor degradación de quitina. Con el BQT1 se obtuvieron 18 bacterias aisladas en los medios de cultivo glucosa, quitina y caparazón de camarón, seleccionando el consorcio bacteriano Q6 que causó la mayor degradación de quitina y caparazón de camarón. De dicho consorcio se obtuvieron dos bacterias quitinolíticas Q6a y Q6b las cuales se identificaron molecularmente.

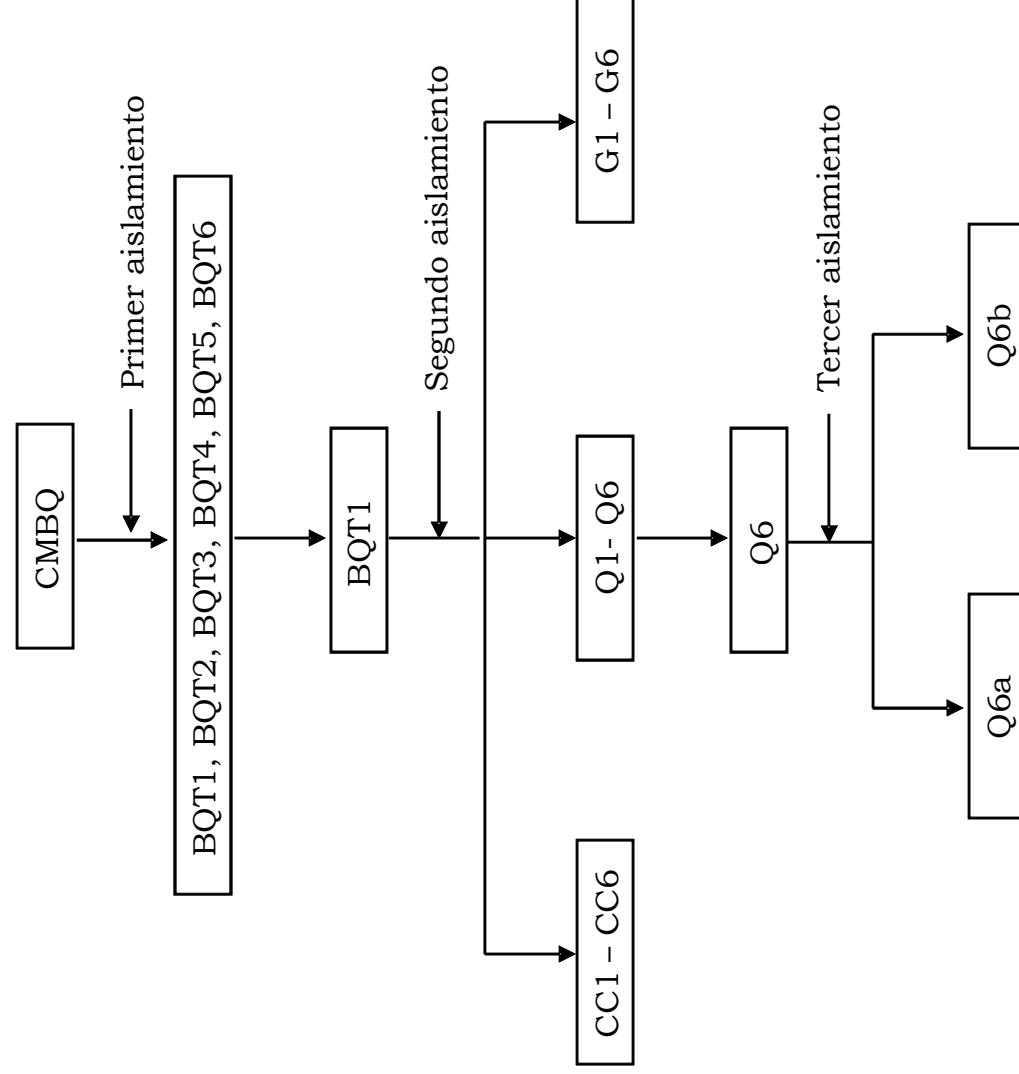


Figura 4. Procesos de aislamiento involucrados para obtener las bacterias Q6a y Q6b, a partir del cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ).

Las bacterias Q6a y Q6b se aislaron desde el consorcio microbiano Q6 debido a que presentó en mayor porcentaje de degradación de quitina pura y caparazón de camarón. Para su aislamiento el consorcio microbiano Q6 se sembró en cajas Petri que contenían medio de cultivo sólido Ch-FR por estría cruzada, las cuales se incubaron 24 h a 39 °C; las cajas de Petri fueron depositadas en una jarra de anaerobiosis. Los dos tipos de colonias desarrolladas se resembraron en las mismas condiciones. Una vez que las colonias crecieron se liofilizaron siguiendo la metodología descrita en el punto 5.3.

5.5.1 Pruebas microbiológicas de las bacterias puras Q6a y Q6b

En las bacterias Q6a y Q6b se realizaron las siguientes pruebas microbiológicas: tinción Gram, morfología colonial y morfología celular siguiendo la metodología descrita anteriormente (punto 5.4.3). También se comparó la degradación de caparazón de camarón y pH entre las bacterias Q6a, Q6b y el consorcio microbiano Q6, durante 72 h de fermentación.

5.5.2 Preparación de inóculo

Se prepararon 3 frascos serológicos de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo CC-FR a un pH de 6.50 más 0.2 g de caparazón de camarón (Cuadro 3), los cuales se esterilizaron 20 min a 121°C y se incubaron 24 h a 39 °C para comprobar su esterilidad. Los frascos fueron inoculados con 0.05 g de liofilizado de las bacterias aisladas Q6a, Q6b o del consorcio bacteriano Q6 y se incubaron 48 h. Al terminar la incubación se logró una concentración final de 10^9 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo.

5.5.3 Prueba *in vitro* de degradación de caparazón de camarón

Se prepararon 15 tubos de cultivo con 8.9 mL de medio de cultivo CC-FR (pH de 6.46 más 0.1 g de caparazón de camarón), los cuales fueron esterilizados 15 min a 121 °C y se incubaron 24 h a 39 °C para asegurar su esterilidad. Se inocularon tres tubos de cultivo con 1 mL de cada inóculo bajo flujo de CO_2 ; estos tubos se incubaron 72 h a 39 °C. Al final, se determinó pH y porcentaje de degradación la MS del caparazón de camarón. El diseño estadístico fue completamente al azar, se hizo un análisis de varianza de los datos con GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

5.5.4 Comparación de la degradación del caparazón de camarón de las bacterias Q6a y Q6b solas en cocultivo (Q6) o mezcladas con fluido ruminal fresco

Un problema común en el proceso de aislamiento de bacterias ruminales seleccionadas por su alta capacidad para degradar un sustrato determinado es que la actividad que tienen en cultivos puros se pierde o no se expresa cuando en el medio de cultivo hay otras bacterias ruminales. Por tanto, se comparó la degradación de caparazón de camarón del consorcio bacteriano Q6 y de las dos bacterias que lo componen (Q6a y Q6b) solas, o en cocultivo con bacterias presentes en el líquido ruminal fresco (LRF).

Se evaluaron 10 tratamientos usando como inóculos a los cultivos bacterianos Q6, Q6a y Q6b a una concentración de 10⁸ bacterias mL⁻¹ solas o mezclados con líquido ruminal fresco a dos concentraciones: 10⁶ y 10⁸ bacterias mL⁻¹ de fluido ruminal. Las pruebas se realizaron por triplicado y los tratamientos se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos para evaluar el consorcio bacteriano Q6 y las bacterias que lo forman (Q6a y Q6b) solas o mezcladas con bacterias presentes en líquido ruminal fresco.

Q6	Q6a	Q6b	Fluido ruminal
Q6 ⁸	Q6a ⁸	Q6b ⁸	L.R.F. ⁸
Q6 ⁸ +LRF ⁶	Q6a ⁸ +LRF ⁶	Q6b ⁸ +LRF ⁶	- - -
Q6 ⁸ +LRF ⁸	Q6a ⁸ +LRF ⁸	Q6b ⁸ +LRF ⁸	- - -

LRF= Líquido ruminal fresco; ⁶ = Concentración inicial de bacterias de 10⁶ mL⁻¹ de medio de cultivo; ⁸ = Concentración inicial de bacterias de 10⁸ mL⁻¹ de medio de cultivo.

5.5.5 Proceso de hidratación de los inóculos

Los liofilizados Q6, Q6a y Q6b se rehabilitaron siguiendo la misma técnica descrita en el punto 5.1, se usaron tres frascos serológicos de 100 mL que contenían 0.5 g de caparazón de camarón más 50 mL de medio de cultivo CC-FR (Cuadro 3) y se ajustó el pH a 6.5 con HCl al 4N antes de esterilizar los viales. Los viales fueron inoculados con 0.05 g los liofilizadas e incubados 48 h a 39 °C. Las bacterias que crecieron en cada vial (Q6, Q6a y Q6b) se usaron como inóculo en la prueba de degradación *in vitro* del caparazón de camarón.

5.5.6 Ajuste de la concentración de bacterias mL⁻¹ de medio de cultivo a 10⁶ y 10⁸ bacterias mL⁻¹ de medio de cultivo

Se calculó usando la cámara Petroff Hausser la concentración de bacterias en los tres frascos serológicos inoculados con Q6, Q6a y Q6b y en el líquido ruminal fresco. Se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de 10⁷ y 10⁹ bacterias mL⁻¹ de medio de cultivo o del líquido ruminal fresco. Así cuando se inoculó 1 mL en 9 mL de medio, se logró la concentración de 10⁶ y 10⁸ bacterias mL⁻¹ señalada en el Cuadro 4.

5.5.7 Preparación de los tubos de ensaye para estimar el porcentaje de degradación

Se prepararon 159 tubos (18x150 mm) de cultivo: 120 se usaron en los tratamientos y 39 como testigos. Los tubos de cultivo contenían 0.1 g de caparazón de camarón 9 mL⁻¹ de medio de cultivo, ajustando el pH a 6.47 con HCl al 4N antes de esterilizar. Todos los tubos se esterilizaron 20 min a 121 °C. De acuerdo a cada tratamiento, los tubos fueron inoculados con 1 mL de líquido ruminal fresco, 1 mL de inóculo rehidratado de Q6, Q6a ó Q6b ó 0.5 mL de Q6, Q6a o Q6b más 0.5 mL de fluido ruminal. Una vez preparados los diferentes tratamientos, se incubaron 72 h a 39 °C tomando muestras cada 24

h (en este caso se contaban con tubos para cada 24 h de fermentación) para determinar el porcentaje de degradación de caparazón de camarón. El diseño estadístico fue completamente al azar, se hizo un análisis de varianza de los datos con GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

5.5.8 Caracterización fermentativa de Q6, Q6a y Q6b

Para este ensayo se utilizó una concentración inicial de bacterias de 10^8 mL^{-1} de medio de cultivo. La producción de AGV y nitrógeno amoniacal, se realizó con el cultivo mixto Q6 y las bacterias Q6a y Q6b usando tres substratos (glucosa, quitina pura y caparazón de camarón) tomando muestras a las 72 h de incubación. Además, se determinó el porcentaje de degradación de quitina y caparazón de camarón.

Las muestras para determinar AGV y nitrógeno amoniacal se obtuvieron (por cuadruplicado) de tubos de cultivo que contenían 9 mL de medio de cultivo Ch-FR, CC-FR y G-FR (Cuadro 3) inoculados con 1 mL del consorcio bacteriano Q6 o las bacterias Q6a y Q6b. La concentración de bacterias en todos los cultivos fue 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo. La incubación se realizó en un pH inicial de 6.5 y a 39 °C. Al final de las 72 h de incubación, se retiraron 1.5 mL de medio de cultivo de cada tubo, evitando el contacto con partículas de quitina o caparazón de camarón no degradado (residuo) y se depositaron en viales Eppendorf que contenían 0.375 mL de una solución de ácido metafosfórico al 25%. Se agitó la muestra con un agitador y se centrifugaron 10 min los viales a 1,400 rpm. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se depositaron en viales para cromatografía de gases. Los viales se mantuvieron en congelación a 0 °C hasta realizar el análisis de AGV y nitrógeno amoniacal.

El resto del medio de cultivo (8 mL) de los tubos de cultivo que contenían quitina pura o caparazón de camarón fueron filtrados usando una bomba de

vacío, en papel Whatman No. 541, (7 cm de diámetro) para recuperar el residuo. Los filtros de papel Whatman con el residuo se secaron en una estufa a 60 °C, se almacenaron 24 h en una secadora para obtener un peso constante y se pesaron en una balanza analítica. Se determinó la degradación de la MS después de 72 h de incubación como la diferencia de peso inicial y residual en base seca.

La concentración de AGV (acético, propiónico y butírico) de las muestras se midió por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Clarus 500 con automuestreador. Se utilizó una columna capilar empacada Elite FFAP Perkin-Elmer (15 m longitud) con un intervalo de temperatura de 40 a 250 °C. Se usó un detector de ionización de flama (FID), gas N₂ acarreador a una presión de 60 psi y los gases H₂ y O₂ para generar la flama con un flujo de 45 y 450 mL min⁻¹. Las temperaturas del inyector, columna y horno fueron 250, 200 y 140 °C y se inyectó 1 µL de muestra. Con dichas condiciones se obtuvieron tres picos, con un tiempo de retención de 2.07, 2.55 y 3.27 min para acético, propiónico y butírico.

De la misma muestra usada para determinar AGV se determinó nitrógeno amoniacal. Se tomó una muestra de 20 µL y se colocó en un tubo de ensaye de 18x150 mm al cual se le agregó 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio, se mezclaron y se incubaron 30 min a 37 °C en baño María. Se agregó 5 mL de agua destilada, agitando la muestra con un vórtex y se hizo la lectura de la concentración de amoniaco a 630 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer™ uv/vis, modelo Lambda 40, de acuerdo a la metodología descrita por McCullough (1967). El diseño estadístico fue completamente al azar, se hizo un análisis de varianza de los datos con GLM y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

5.6 Caracterización molecular del gen 16S rARN de las bacterias aisladas

El rARN es el fragmento del genoma de las bacterias que cuenta con secuencias aproximadamente 1500 pb (Miyajima *et al.*, 2002; Janda y Abbott, 2007) y se ha usado para determinar las relaciones taxonómicas entre bacterias, debido a que la molécula de 16S rARN contiene regiones altamente variables que permite diferenciar especies de bacterias. (Murray *et al.*, 1999). Por tanto, la identificación de las bacterias quitinolíticas, Q6a y Q6b se realizó con base en el gen 16S rARN. La identificación se basó en la obtención de un fragmento de 796 pb de las bacterias y la comparación de secuencias de nucleótidos del gen 16S rARN de las bacterias Q6a y Q6b con secuencias depositadas en el Gen-Bank NCBI (2007), así como un análisis de la posible filogenia de este gen.

5.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de las bacterias Q6a y Q6b se realizó de colonias crecidas en un medio de cultivo sólido con quitina pura como única fuente de carbono después de 24 h de incubación. La extracción se hizo en 35 µL de la solución Lyse-*N-Go*, seguida de un calentamiento por 5 min a 95 °C, en un termociclador (Biometra). La extracción se confirmó con la electroforesis de los productos en un gel de agarosa al 0.8%.

5.6.2 Amplificación del gen 16S rARN

Para la amplificación del gen 16S rARN se utilizaron los iniciadores 8F y 1492R. Las secuencias de oligonucleótidos fueron 8F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; y 1492R: TACGGYTACCTTGTACGACTT, los cuales amplifican aproximadamente 1500 pb. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, la mezcla de la reacción fue 5 µL de amortiguador 5X, 2 µL de dNTP's, 2 µL de MgCl₂ al 50 mM, 0.4 µL de Flexi Taq' polimerasa

(marca Promega®) y 10 µL ADN bacteriano. Las condiciones de amplificación en el termociclador (Biometra) fueron: un ciclo inicial de pre-desnaturalización de 2 min a 94 °C; seguido de desnaturalización por 2 min a 94 °C; acoplamiento por 1 min a 58 °C; elongación por 1.30 min a 72 °C, que se repitió por 29 ciclos más, y un ciclo de post-elongación 5 min a 72 °C, para terminar a 4 °C. La confirmación de la amplificación se realizó con 5 µL de producto de PCR y 5 µL de ADN escalera de 100 pb que se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8%. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con 1.66 µL de bromuro de etidio 100 mL⁻¹ y amortiguador TBE al 0.5% a 75 V por 30 min. La amplificación se documentó en un fotodocumentador (GENE WIZARD, USA).

Los fragmentos amplificados se limpiaron con el kit de limpieza para PCR QIAquick PCR Purification® de Quiagen siguiendo la metodología del proveedor. Finalmente las muestras se enviaron a la empresa Macrogen (Genome Research, Corea del Sur) para ser secuenciadas en ambos sentidos.

5.6.3 Inferencia de la filogenia

El análisis de la filogenia del gen 16S rARN de las bacterias aisladas (Q6a y Q6b) se realizó con las secuencias obtenidas de esta investigación y secuencias registradas en la base de datos del Gen-Bank (Cuadro 5). Las secuencias obtenidas del secuenciador se analizaron con el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Con estas secuencias se realizó una búsqueda de secuencias homologas en el Gen-Bank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), y se seleccionaron las que presentaron la mayor similitud con las secuencias de este estudio, que son miembros representativos de los géneros *Bacillus* para la bacteria Q6a y *Enterococcus*, para Q6b. Para la bacteria identificada como *Bacillus licheniformis* ATCC14580 con clave de acceso CP000002 se obtuvo el genoma completo (2,222,597); en las demás bacterias se obtuvieron entre 1,360 y 1,653 pb. Posteriormente se realizó la alineación de estas secuencias y se

uniformizó a 796 pb que es el fragmento obtenido de las bacterias en estudio con el programa Clustal W incluido en el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

5.6.4 Reconstrucción de árboles filogenéticos

Para la reconstrucción de la filogenia se usaron 13 secuencias alineadas, (Cuadro 5) relacionadas con los género *Bacillus* y *Enterococcus*, además de la bacteria *Tetragenococcus solitarius* (AJ301840) que se usó como grupo de comparación. Finalmente se obtuvieron las estadísticas básicas del número de sitios informativos variables e invariables y se obtuvo la matriz de distancia genética dentro y entre los grupos de bacterias Q6a y Q6b con la corrección de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1984), y se realizó la inferencias filogenéticas con base a Neighbor-Joining en el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Cuadro 5. Bacterias obtenidas del Banco de Genes Gen-Bank (NCBI, 2007), con sus claves de acceso y número de pb obtenidas por los autores.

Bacteria depositadas en		Clave	de	No. de pb	Autor
GenBank		acceso		(16S rARN)	
<i>Bacillus licheniformis</i>		AY631057		1360	Iwashita <i>et al.</i> , 2004
TKW3					
<i>Bacillus circulans</i>		DQ981456		1371	Burmolle <i>et al.</i> , 2007
SB1					
<i>Bacillus licheniformis</i>		EF433410		1468	Wang <i>et al.</i> , 2007
BCRC11702					
<i>Bacillus licheniformis</i>		AY786999		1500	Cheng <i>et al.</i> , 2004
CICC10219					
<i>Bacillus licheniformis</i>		CP000002		4,222,597	Rey <i>et al.</i> , 2004
ATCC14580					
<i>Enterococcus faecium</i>		AB362603		1555	Tanaka <i>et al.</i> , 2007
NRIC0114					
<i>Enterococcus faecium</i>		DQ672262		1485	Shao <i>et al.</i> , 2006
CICC6078					
Bacteria ruminal		EU124837		1513	Sundset <i>et al.</i> , 2007
R4_91_13					
Bacteria ruminal		DQ393036		1513	Sundset <i>et al.</i> , 2007
R4-4					
<i>Enterococcus lactis</i>		DQ255948		1526	Botina y Sukhodolets, 2005
CK1026					
<i>Enterococcus durans</i>		AJ420801		1506	Manero y Blanch, 2002
CECT411T					
<i>Enterococcus lactis</i>		AY902459		1510	Botina y Sukhodolets, 2005
CK1114					
<i>Tetragenococcus solitarius</i> DSM 5634		AJ301840		1653	Behr <i>et al.</i> , 2000

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Concentración de bacterias viables en el cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ) reactivadas

Después de la activación del cultivo mixto de bacterias quitinolíticas se determinó una concentración de 2.8×10^{12} bacterias viables g^{-1} de liofilizado. De acuerdo con la ecuación usada del NMP, la concentración mínima y máxima que puede obtenerse es 6.0×10^{11} y 1.3×10^{13} células g^{-1} de masa microbiana liofilizada (Harrigan y McCance, 1979). Este resultado indica una excelente concentración de bacterias viables después del proceso de rehidratación del cultivo liofilizado (CMBQ) y que estuvo almacenado cinco años. Algunos factores pueden afectar la concentración y viabilidad de los microorganismos liofilizados, entre los que se citan la naturaleza de la cepa, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento, la concentración celular, la formulación de los medios protectores contra la liofilización, los parámetros de la liofilización y el modo de rehidratación. Borrego *et al.* (2001) reportan que el uso de protectores contra la liofilización (leche descremada sola o con glutamato de sodio) asegura una supervivencia de 14 a 55.2%, después de 10 años de almacenamiento. En el presente estudio no se utilizó ningún protector contra la liofilización; por tanto, se considera que el fluido ruminal (en el cual fue recuperado el CMBQ) actuó como protector. Al parecer, algunos componentes (p. ej. proteínas y lípidos) del nicho ecológico de las bacterias, pueden actuar como protectores naturales contra la liofilización; por ejemplo, Cobos *et al.* (2004) reportaron una supervivencia de 21.1 y 66.6% en dos bacterias (*Clostridium sordellii* y *Peptrostreptococcus tetradus*) cuando se liofilizaron sin agregar un protector, pero recuperadas junto con otros componentes de los cecotrofos del conejo, su nicho ecológico natural.

Además del proceso de liofilización, para la preservación de microorganismos se han desarrollado metodologías como la congelación de

cultivos a -20° C ó -40 °C con 20% de glicerol (Teather, 1982), y la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C. Todos estos métodos de preservación han demostrado mayores índices de supervivencia y estabilidad genética microbiana (Arcos *et al.*, 2004).

De acuerdo con García y Fernández (1997), las tres condiciones que se deben cumplir en la conservación de bacterias son: 1) que el cultivo se mantenga puro y sin contaminación; 2) una buena sobrevivencia bacteriana durante el tiempo de conservación superior al 70% de las células; 3) que las células permanezcan genéticamente estables. Considerando que el CMBQ usado en el presente experimento fue obtenido y liofilizado el 2001 (Pérez-Sato, 2001) y que después de cinco años no se perdió la viabilidad bacteriana, ni la actividad quitinolítica, se puede concluir que el método de liofilización es un proceso adecuado para conservar especies ruminales bacterianas con capacidad para degradar quitina o caparazón de camarón.

6.2 Primer aislamiento de bacterias quitinolíticas a partir de CMBQ reactivo

Siguiendo la metodología descrita para el aislamiento en medios sólidos de bacterias quitinolíticas a partir del CMBQ, se obtuvieron seis cultivos: BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT5 y BQT6, cada uno formado por al menos dos diferentes tipos de bacterias con capacidad para crecer en medios de cultivo con quitina como única fuente de carbono. Los medios de cultivo sólidos se usan para aislar cultivos puros de una bacteria y este proceso se basa en la acelerada tasa de generación o tiempo de duplicación bacteriana que es de 15 a 30 min (Holt *et al.*, 1994) lo que permite, después de 24 a 48 h de incubación, que se desarrolle una colonia bacteriana formada por millones de copias de una célula. Sin embargo, cuando dos o más bacterias tienen una estrecha interdependencia, ya sea nutricional o metabólica, resulta difícil separarlas. Considerando que los seis cultivos aislados (BQT1 – BQT6) están formados por

al menos dos diferentes especies bacterianas, se considera que hay una interacción entre estas bacterias en el uso de quitina como fuente de nutrientes. En microorganismos ruminales se conocen al menos dos tipos de interacción: la interdependencia alimentaria, *Bacteroides amylophilus*, *Megaspheara elsdenii* y *Ruminococcus albus*, y la alimentación cruzada, entre bacterias celulolíticas y amilolíticas con bacterias utilizadoras de ácidos orgánicos (Cobos, 2007). Debido a que se obtuvieron varios cultivos mixtos de bacterias, se decidió liofilizar los seis consorcios bacterianos obtenidos y evaluar su capacidad para degradar quitina pura; esto, con el objetivo de seleccionar el consorcio bacteriano con la mayor actividad quitinolítica y continuar con el proceso de aislamiento y purificación de las bacterias que forman el consorcio.

6.3 Comparación de la degradación de quitina pura entre los seis consorcios bacterianos liofilizados

La concentración de bacterias inicial, los valores de pH y el porcentaje de degradación de quitina pura (BS) a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación en los consorcios bacterianos BQT1 – BQT6 y CMBQ, se presentan en el Cuadro 6. La concentración inicial de bacterias fue similar entre BQT1, BQT2, BQT3, BQT4, BQT5, BQT6 y CMBQ (9.84×10^8 a 2.1×10^9 bacterias mL^{-1}). Entre 0 y 24 h de incubación no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el pH del medio de cultivo, pero a las 48 h de incubación el pH disminuyó para todos los tratamientos, donde el medio de cultivo inoculado con BQT1 tuvo el pH más bajo (6.06; $p \leq 0.05$). Con excepción del consorcio BQT3, el pH fue menor a 6.2, considerado el mínimo requerido por las bacterias ruminales para mostrar su máxima eficiencia fermentativa (Russell y Wilson, 1996; Scandolo *et al.*, 2007) y a las 72 h todos los tratamientos presentaron un pH de 5.95 a 6.08. Por tanto, se considera que a partir de las 48 h de incubación la capacidad para degradar quitina de las bacterias en los diferentes consorcios fue limitada.

Desde las 24 h de incubación hubo diferencias en la degradación de quitina pura en los medios de cultivo inoculados con los diferentes consorcios microbianos (Cuadro 6). El consorcio BQT1 causó la mayor ($p \leq 0.05$) degradación de la quitina (BS), seguido de BQT4, BQT6 y BQT3, mientras que BQT2, BQT5 y CMBQ causaron la menor ($p \leq 0.05$) degradación de quitina. Cabe señalar, que a las 24h reincubación la menor degradación fue detectada en el cultivo mixto de bacterias quitinolíticas (CMBQ) usado para aislar los consorcios BQT1 a BQT6. A las 48 h BQT1 produjo la mayor ($p \leq 0.05$) degradación de quitina (45.62%), en tanto que BQT4, BQT6 y CMBQ degradaron de forma similar ($p > 0.05$) la quitina; en este periodo reincubación destaca la recuperación de la actividad quitinolítica del CMBQ. A las 72 h la respuesta fue similar a las de las 48 h en todos los tratamientos, pero BQT5 causó la menor ($p \leq 0.05$) degradación de quitina.

Los resultados obtenidos indican que el CMBQ aislado por Pérez-Sato (2001) contenía diferentes bacterias, incluyendo quitinolíticas, y que usando medios de cultivo líquidos selectivos se recuperaron diferentes consorcios bacterianos con actividad quitinolítica. La diferencia para degradar quitina depende de las asociaciones bacterianas que se dieron al azar durante el desarrollo de colonias bacterianas en el medio de cultivo sólido selectivo usado (Cuadro 3). Con base los resultados obtenidos se selecciono al consorcio BQT1 para continuar con el proceso de purificación y caracterización de sus bacterias. No se encontraron reportes científicos que permitan comparar los resultados de degradación de quitina obtenidos. Aunque de acuerdo a Pérez-Sato (2001), la degradación *in vitro* de MS (DIVMS) de una dieta que contenía 25% de caparazón de camarón e inoculada con el CMBQ, fue 50.32% a las 72 h de fermentación. En este estudio se obtuvo un degradación de quitina pura a las 72 h de incubación de 49.49% para el CMBQ, resultado similar al reportado por Pérez-Sato (2001), y de 62.69% para el consorcio BQT1; esto permite considerar que este consorcio tiene una alta capacidad para degradar quitina y cáscara de camarón.

Cuadro 6. Cambios en pH y degradación (%) de quitina pura a diferentes horas de fermentación por seis consorcios bacterianos y CMBQ.

	Consortio bacteriano							E.E.M
	BQT1	BQT2	BQT3	BQT4	BQT5	BQT6	CMBQ	
Horas	Concentración de bacterias mL ⁻¹ de medio de cultivo							
	1.0X10 ⁹	1.1X10 ⁹	1.2X10 ⁹	2.1X10 ⁹	9.84X10 ⁸	1.3X10 ⁹	1.0X10 ⁹	
	pH							
	0	6.43a	6.44a	6.45a	6.43a	6.45a	6.43a	0.01
	24	6.37a	6.37a	6.41a	6.37a	6.37a	6.42a	0.01
	48	6.06c	6.15b	6.26a	6.12bc	6.19ab	6.15b	0.01
	72	5.95b	5.97b	6.03ab	5.95b	6.07a	5.96b	0.01
	Degradación de quitina, %							
	0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.01
	24	15.52a	10.86b	11.57ab	12.30ab	10.62b	11.93ab	2.77
	48	45.61a	28.46c	27.52c	37.30b	28.61c	37.27b	2.85
	72	62.69a	46.92b	46.74b	51.19b	34.60c	53.12b	9.01

a,b,c = Medias con diferente letras en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$); E.E.M = Error estándar de la media.

6.4 Evaluación de la viabilidad y concentración de bacterias en el liofilizado del consorcio microbiano (BQT1)

EL consorcio BQT1 se liofilizó para no perder su composición bacteriana y mantenerlo como inóculo base o madre. Cada vez que se requirió del consorcio BQT1, se tomó una muestra liofilizada y se reactivó su masa microbiana con el procedimiento descrito en la sección 5.1 de Materiales y Métodos. La concentración de bacterias quitinolíticas en BQT1 liofilizado y reactivado fue 2.7×10^{13} bacterias mL^{-1} de medio de cultivo, la cual es superior a la cantidad en CMBQ (2.8×10^{12} bacterias mL^{-1}). Esto puede deberse a que el CMBQ aislado por Pérez-Sato (2001) se obtuvo directamente del rumen de borregos alimentados con una dieta de 25% de caparazón de camarón. Entonces, el cultivo CMBQ contiene, además de bacterias quitinolíticas, otras especies de bacterias ruminales, mientras que el consorcio BQT1 contiene únicamente bacterias quitinolíticas.

6.5 Comparación de la degradación de quitina pura y caparazón de camarón por BQT1 a diferentes valores de pH

El cambio en el pH del medio de cultivo y la degradación de quitina pura (SIGMA) y caparazón de camarón después de 0, 24, 48 y 72 h de fermentación se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Cambios en el pH del medio de cultivo y en la degradación *in vitro* (DIVMS; %) de quitina y caparazón de camarón del consorcio bacteriano BQT1.

Horas	Quitina		Caparazón de camarón				
	pH		pH				
	6.0	6.5	7.0	6.0	6.5	7.0	E.E.M
0	6.06c	6.50b	6.94a	6.00c	6.58b	6.95a	0.01
24	6.11e	6.45c	6.82a	6.29d	6.54b	6.83a	0.01
48	6.02f	6.38c	6.68a	6.21e	6.27d	6.57b	0.01
72	6.01c	6.30b	6.53a	5.93c	6.23b	6.58a	0.01
Degradación <i>in vitro</i> (MS), %							
0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00
24	10.15c	10.68c	14.32b	16.13b	16.32b	20.02a	1.55
48	14.66d	15.95d	24.61cd	34.64bc	43.69ab	46.96a	15.05
72	24.85c	25.60c	44.46b	53.72a	53.78a	55.94a	4.60

a,b,c = Medias con diferente lateras en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$) ;E.E.M = Error estándar de la media.

Como se esperaba, a las 0 h de incubación los medios de cultivo tenían el pH inicial deseado (6.0, 6.5 y 7.0). A las 24 h de incubación los medios de cultivo con un pH inicial de 6.0 presentaron el pH más ácido ($p \leq 0.01$) con respecto a los medios de cultivo con un pH inicial de 6.5 y 7.0. A las 48 h de incubación, el medio de cultivo con un pH inicial de 6.0 y con quitina como sustrato tuvo un pH más ácido (6.01) menor al mínimo recomendado (6.2) para la actividad microbiana (Russell y Wilson, 1996; Scandolo *et al.*, 2007). A las 72 h de incubación los medios de cultivo con un pH inicial de 6.0 mantuvieron el pH más ácido ($p < 0.01$) con respecto a los otros medios de cultivo. En general, con un pH inicial entre 6.5 y 7.0 se mantiene un pH más estable y adecuado para la actividad microbiana. El descenso del pH se atribuye principalmente a la acumulación de CO₂ y la concentración de AGV producido por las bacterias

quitinolíticas a partir de la fermentación de los carbohidratos (Seki y Toga, 1963).

En cuanto a la degradación de quitina pura y caparazón de camarón (Cuadro 7) hubo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre los tiempos evaluados. La diferencia entre tratamientos con quitina y caparazón de camarón se comenzó a observar después de 24 h de fermentación. El porcentaje de degradación de los dos substratos aumentó al prolongarse el tiempo de fermentación. El porcentaje de degradación de caparazón de camarón en los medios de cultivo con un pH inicial de 6.0, 6.5 y 7.0 fue superior al porcentaje de quitina degradada a estos valores de pH (6.0, 6.5 y 7.0). La degradación de quitina no fue diferente ($p > 0.05$) entre medios de cultivo con pH 6.0 y 6.5, mientras que los medios de cultivo con pH inicial 7.0 tuvieron casi el doble de degradación (44.46%) respecto a los otros tratamientos. En el caso de los medios con caparazón de camarón a partir de las 24 h de fermentación se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo con pH inicial de 6.0 y 6.5, con relación al de 7.0. A partir de las 48 h de incubación la mayor ($p \leq 0.01$) degradación de MS se presentó en los medios de cultivo con un pH inicial de 7.0. Sin embargo a las 72 h de incubación no hubo diferencias ($p > 0.05$) en la degradación de la caparazón de camarón entre los tratamientos.

El consorcio bacteriano BQT1 presentó mayor porcentaje de degradación de quitina a un pH de 7.0, mientras que, con el caparazón de camarón la mayor degradación se logró a un pH de 6.5 y 7.0. Estos resultados, de acuerdo a Kopecny *et al.* (1996), se deben a que la actividad de enzimas intracelulares y extracelulares quitinolíticas es sensible al pH del medio. Las endoquitinasas tienen un amplio intervalo de pH óptimo (4.5 a 6.1); mientras que la *N*-acetilglucosaminidasa tiene una mayor actividad a un pH de 7.4. Según Gay *et al.* (1989), la actividad de la enzima quitina sintasa obtenida de *Neocallimastix frontalis* (aislado de rumen de borrego) es más activa entre 32 – 39 °C a un pH alcalino (8.5). Sin embargo, Sakurada *et al.* (1996)

obtuvieron una enzima quitinasa de un hongo ruminal (*Piromyces communis* OTS1) aislado de cabras y reportan que la mayor actividad de la enzima se encuentra entre 40 y 60 °C a un pH de 6.2. Kopecny y Hobrova (1998) mencionan que la mayor actividad de las enzimas exoquinasas es con pH de 4.5 a 6.2, mientras que las enzimas chitosanasas, N-acetilglucosaminasa y quitina diacetilasa tienen mayor actividad con pH cercanos a la neutralidad (6.5 – 7.0).

En el Cuadro 8 se muestra el coeficiente de correlación y regresión lineal de seis diferentes medios de cultivo a tres pH (6.0, 6.5 y 7.0) usando dos substratos (quitina pura y caparazón de camarón) con el consorcio bacteriano BQT1 a las 72 h de fermentación.

Cuadro 8. Coeficiente de correlación y regresión lineal entre tres diferentes pH sobre la degradación de quitina y camarón.

Variable (pH)	Degradación de quitina a Degradación de caparazón diferentes pH de camarón a diferentes pH					
	6.0	6.5	7.0	6.0	6.5	7.0
6.0	<i>R</i>	-0.586	-0.591	-0.649	-0.256	-0.165
	<i>P>(F)</i>	(0.413)	(0.408)	(0.350)	(0.743)	(0.887)
6.5	<i>R</i>	-0.982	-0.983	-0.993	-0.946	-0.980
	<i>P>(F)</i>	(0.017)	(0.017)	(0.006)	(0.053)	(0.019)
7.0	<i>R</i>	-0.987	-0.989	-0.994	-0.933	-0.982
	<i>P>(F)</i>	(0.012)	(0.010)	(0.005)	(0.066)	(0.017)
	<i>R</i> ²	0.171	0.917	0.960	0.0594	0.958
					0.885	

R = Coeficiente de correlación; *R*² = Coeficiente de regresión

La correlación (*R*) indica si dos variables varían conjuntamente (pH y degradación); mientras que la regresión (*R*²) indica una relación de causa-efecto entre pH y degradación de substratos. Para pH 6.0 no hubo correlación significativa (*P*>0.05) con la degradación de quitina y caparazón de camarón, es

decir el pH y la degradación de dichos sustratos no varían conjuntamente. Mientras que las variables pH 6.5 y 7.0 variaron conjuntamente con la degradación de quitina (-0.983 y -0.994) y caparazón de camarón (-0.980 y -0.984) pero esta relación fue negativa. Además, hubo un efecto significativo ($p \leq 0.05$) de la regresión ya que 91.7% y 96.0% de la degradación de quitina se explica por el pH 6.5 y 7.0, en tanto que esos pH tienen una relación causal de 95.8% y 88.5% de los efectos observados en la degradación de caparazón de camarón.

Estos resultados pueden deberse a que la actividad de las enzimas intracelulares y extracelulares quitinolíticas son sensibles al pH del medio. Por ejemplo, la actividad de la enzima quitina sintasa obtenida de *Neocallimastix frontalis* es más activa entre 32 – 39 °C a un pH superior a 6.5 (Gay *et al.* 1989). Otras variables que pueden afectar la tasa de degradación del caparazón de camarón y la quitina pura son: fase lag bacteriana, concentración inicial de bacterias, minerales y vitaminas, del sustrato a degradar; así como la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos en el medio. Por tanto, al conocer más variables involucradas en este proceso se debe analizar su efecto en la degradación de quitina o cáscara de camarón mediante un análisis múltiple de varianzas.

6.6 Segundo aislamiento de bacterias quitinolíticas a partir del consorcio BQT1

Al realizar el conteo directo en una cámara de Petroff-Hausser de las bacterias quitinolíticas rehabilitadas en un medio de cultivo Ch-FR líquido, se obtuvo una concentración de 2.0×10^9 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo. Sin embargo, cuando se utilizaron medios sólidos la concentración de bacterias quitinolíticas a las 48 h de incubación (UFC) fue menor en cualquiera de los medios que contenían diferentes fuentes de carbono (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de bacterias quitinolíticas en medios sólidos con tres fuentes de carbono a 48 h de incubación.

Fuente de carbono	Concentración UFC mL ⁻¹
Glucosa	4.7X10 ⁵
Quitina	5.0X10 ⁵
Caparazón de camarón	6.5X10 ⁵

Kopencny *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares cuando aislaron bacterias quitinolíticas de fluido ruminal proveniente de vacas alimentadas con una dieta a base de ensilado de maíz y concentrado. Para el aislamiento de bacterias quitinolíticas usaron un medio de cultivo sólido similar al utilizado en el presente estudio, a base de vitaminas, soluciones de microminerales 20%, líquido ruminal, 1.1% de agar y como fuente de carbono 0.5% de quitina coloidal (SIGMA), obteniendo concentraciones de bacterias de 5x10⁴ a 2x10⁸ UFC mL⁻¹. Los resultados indican que algunas bacterias quitinolíticas aisladas en el medio de cultivo líquido con quitina o caparazón de camarón no son capaces de crecer o desarrollar una colonia en medios sólidos.

La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo fue similar con las tres fuentes de carbono; por tanto, se considera que las bacterias quitinolíticas tienen la capacidad de usar glucosa, quitina y caparazón de camarón como energía para su crecimiento. De las colonias presentes en la dilución a la 10⁻⁴ se seleccionaron seis (las colonias más representativas o numerosas) de cada fuente de carbono y fueron trasferidas individualmente en placas Petri por estría cruzada hasta obtener colonias puras. Se aislaron 18 bacterias: 6 que crecieron en glucosa, 6 en quitina y 6 en caparazón de camarón. En cada bacteria se determinó su morfología colonial después de 48 h de incubación en condiciones de anaerobiosis.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de la morfología colonial de las bacterias aisladas en el medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono. Las 6 bacterias presentaron características similares en cuanto tamaño, color, forma, elevación, etc. De las bacterias aisladas solamente dos (G2 y G6) dieron tinción Gram +.

En el Cuadro 11 se muestra la morfología colonial de las 6 bacterias aisladas de medios de cultivo con quitina como fuente de carbono. Las bacterias Q1, Q2, Q3 y Q4 presentan las mismas características, por lo que se deduce que se puede tratar de la misma bacteria. Sin embargo, aunque las bacterias Q5 y Q6 presentan las mismas características, se consideró que son diferentes de Q1, Q2, Q3 y Q4 debido a que presentaron tinción Gram positivo. Los cultivos mixtos Q5 y Q6 presentaron dos tipos de células bacterianas (bacilos y cocos), lo cual sugiere que se trata de un consorcio bacteriano formado por dos bacterias que viven en una estrecha relación donde una necesita de la otra para vivir.

Las características morfológicas de las 6 bacterias aisladas de medios de cultivo con caparazón de camarón como única fuente de carbono (Cuadro 12) indican que las colonias CC2, CC3, CC5 y CC6 presentan las mismas características, mientras que las colonias CC1 y CC4 son diferentes entre ellas y con respecto a las colonias CC2, CC3, CC5 y CC6. Por tanto, se deduce que se aislaron dos tipos de bacterias diferentes.

Comparando los tres grupos de bacterias obtenidas en las diferentes fuentes de carbono se puede decir que las colonias aisladas en los medios de cultivo con glucosa, quitina y caparazón de camarón son diferentes. En el caso de las colonias aisladas de glucosa predominaron cocos Gram - y Gram +, y presentaron reacciones catalasa -; mientras que, las colonias aisladas de quitina y caparazón de camarón predominaron bacilos Gram - y Gram + con reacciones catalasa +.

Las bacterias quitinolíticas aisladas por Kopencny *et al.* (1996) en un medio de cultivo con quitina como fuente de carbono fueron básicamente bacilos Gram positivos y catalasa negativa, mientras que en el presente estudio se logró aislar una mayor diversidad de bacterias quitinolíticas. Las bacterias aisladas incluyen formas de cocos y bacilos, con tinción Gram + y Gram -, así como una reacción catalasa positiva o negativa.

También se ha reportado el aislamiento de bacterias quitinolíticas en otros hábitats; así, Boyer (1986) aisló bacterias quitinolíticas de fangos salados usando un medio de cultivo a base de agar marino heterotrófico y quitina como fuente de energía y una temperatura de incubación de 30 °C por 5 d. Las bacterias quitinolíticas fueron identificadas por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias. Con este proceso logró aislar 17 bacterias, ocho fueron anaerobias obligadas y nueve anaerobias facultativas; de las ocho bacterias anaerobias obligadas cinco fueron bacilos Gram positivo móviles, mientras que las otras tres fueron bacilos Gram negativos. La diversidad microbiana aislada por Boyer (1986) tiene semejanza a la obtenida en el presente estudio. Mientras que Sastoque-Cala *et al.* (2007) aislaron nueve bacterias quitinolíticas de residuos de camarón en medios de cultivo con quitina coloidal a pH 9.2; las bacterias presentaron diferentes grupos morfológicos como cocos y bacilos Gram positivos y actinomicetos.

Cuadro 10. Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono.

Características	No. de bacterias					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Tamaño (mm)	1	1	1	1	1	1
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Aspecto	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
Borde	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Luz transmitida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Consistencia	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave
	butirosa	butirosa	butirosa	butirosa	butirosa	butirosa
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Tinción Gram	-	+	-	-	-	+

Cuadro 11. Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con quitina como única fuente de carbono.

Características	No. de bacterias					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
Tamaño (mm)	1	1	1	2	3	2
Color	Café claro	Café claro	Café claro	Café claro	Crema	Crema
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular	Irregular
Elevación	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Plana	Plana
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Plana	Plana
Aspecto	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Seca	Seca
Borde	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Ondulados	Ondulados
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Mate	Mate
Luz trasmitida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida
Consistencia	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave
	butirosa	butirosa	butirosa	butirosa		
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Tinción Gram	Bacilo -	Bacilo -	Bacilo -	Bacilo -	Bacilo/Coco +	Bacilo/Coco +

Cuadro 12. Morfología colonial de las colonias aisladas de medio de cultivo con caparazón de camarón como única fuente de carbono.

Características	No. de bacterias					
	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6
Tamaño	Toda la placa	1	1	3	1	1
Color	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema
Forma	irregular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular
Elevación	Plana	Elevada	Elevada	Plana	Elevada	Elevada
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa	Lisa	Lisa
Aspecto	Seca	Húmeda	Húmeda	Seca	Húmeda	Húmeda
Borde	Irregular	Enteros	Enteros	Ondulado	Enteros	Enteros
Luz reflejada	Mate	Brillante	Brillante	Mate	Brillante	Brillante
Luz trasmitida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida
Consistencia	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave	Suave
		butirosa	butirosa	mucoide	butirosa	butirosa
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Tinción Gram	Bacilo +	Bacilo -	Bacilo -	Bacilo+	Bacilo -	Bacilo -

Los resultados obtenidos en el porcentaje de degradación de quitina y caparazón de camarón a las 72 h de incubación (Cuadro 13) presentan diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre las bacterias aisladas. El porcentaje de degradación de quitina varió de 2.72 a 37.76% y en caparazón de camarón de 6.0 a 34.41%. También se observó que las bacterias que presentaron una eficiente degradación de quitina no lo fueron con caparazón de camarón. El consorcio bacteriano Q6 mostró el mayor porcentaje en la degradación de quitina (37.76%) y de caparazón de camarón (23.11%). En segundo orden de importancia en degradación de quitina está esta el consorcio bacteriano Q5 (33.33%), pero su capacidad para degradar caparazón de camarón fue baja (8.90%). En tercer lugar está la bacteria CC6, aunque el porcentaje de degradación de quitina (27.37%) fue 10% menor al cultivo mixto Q6. Tomando como base la degradación de caparazón de camarón, las bacterias de la colonia G4 degradaron mayor cantidad de este sustrato (34.41%), pero su capacidad para degradar quitina fue baja (7.28%). Por lo anterior, se seleccionó el cultivo mixto Q6 para continuar con el proceso de aislamiento. El porcentaje de degradación de quitina y caparazón de camarón obtenido en el presente trabajo fue similar a lo reportado por Velez *et al.* (1991), quienes determinaron una degradación de desechos de camarón y cangrejo de 35.9% MS a las 60 h de fermentación.

Cuadro 13. Comparación del porcentaje de degradación de quitina pura y caparazón de camarón a las 72 h de fermentación por las 18 bacterias aisladas.

Colonias aisladas	Porcentaje de degradación	
	Quitina, %	Caparazón de camarón, %
G1	6.65de	6.40d
G2	8.97de	8.35d
G3	6.10de	26.36ab
G4	7.28de	34.40a
G5	7.92de	7.82d
G6	7.66de	8.64d
Q1	24.12bc	6.00d
Q2	4.14de	11.95d
Q3	4.37de	7.01d
Q4	15.78cd	8.03d
Q5	33.32ab	8.90d
Q6	37.76a	23.10bc
CC1	3.04de	10.83d
CC2	6.85de	6.85d
CC3	25.89abc	9.81d
CC4	2.72e	10.49d
CC5	4.87de	12.86cd
CC6	27.36abc	12.55cd
E.E.M	17.77	13.24

a,b,c,d,e Medias con diferente lateras en una columna son diferentes (ps0.05); E.E.M = Error estándar de la media; Bacterias aisladas en medio con glucosa (G), quitina (Q) y caparazón de camarón (CC).

6.7 Tercer aislamiento de bacterias quitinolíticas puras (Q6a y Q6b) a partir del cultivo mixto Q6

A partir del cultivo mixto Q6 se aislaron dos bacterias puras identificadas como Q6a y Q6b, las cuales fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente (25 °C) hasta su uso. En las bacterias Q6a y Q6b se determinó sus características morfológicas y fisiológicas a las 48 h de crecimiento. Como se observa en el Cuadro 14, las características morfológicas y fisiológicas de estas dos bacterias son totalmente diferentes. Las colonias formadas por la bacteria Q6a son irregulares, elevación plana, aspecto seco, bordes irregulares, luz reflejada mate, las células tienen forma de coco y presentan reacciones de catalasa +, mientras que las colonias formadas por la bacteria Q6b son circulares, elevación elevada, aspecto húmedo, bordes enteros, luz reflejada brillante, las células tienen forma de bacilo y presentan reacciones de catalasa -. La morfología colonial y microscópica no son variables suficientes para determinar el género de una bacteria y mucho menos la especie, pero sí es una herramienta que puede ayudar a su identificación.

A partir de un cultivo mixto y usando un procedimiento similar al del presente trabajo, Mateo-Sánchez *et al.* (2002) aislaron dos bacterias Gram negativas, un cocobacilo y un bacilo en una proporción de 45:55, este cultivo mixto tiene la capacidad de degradar aserrín. El cultivo mixto se obtuvo del fluido ruminal de dos vacas y tres borregos alimentados con alfalfa fresca (60%) y ensilado de maíz (40%), y para el proceso de aislamiento se usó un medio de cultivo selectivo para bacterias ruminales más aserrín como fuente de carbono. Los autores concluyen que la interacción de estas dos bacterias puede ser necesaria para una eficiente degradación del aserrín, pero no lograron comprobar su hipótesis.

Cuadro 14. Características morfológicas de las bacterias Q6a y Q6b a las 48 h de crecimiento.

Características	Q6a	Q6b
Morfología colonial		
Tamaño (mm)	Irregular	1
Color	Blanca	Blanca
Forma	Irregular	Circular
Elevación	Plana	Elevada
Superficie	Lisa	Lisa
Aspecto	Seca	Húmeda
Borde	Irregular	Enteros
Luz reflejada	Mate	Brillante
Luz trasmitada	Translúcida	Translúcida
Consistencia	Suave	Suave
Catalasa	+	-
Tinción Gram	Bacilos +	Cocos +

En el presente estudio se evaluó la posible interacción de las dos bacterias aisladas Q6a y Q6b. Los resultados obtenidos en pH y porcentaje de degradación de caparazón de camarón, en cultivos axénicos de las bacterias Q6a, Q6b y el cultivo mixto Q6, se muestran en el Cuadro 15. Se puede observar que el cultivo mixto Q6 presentó el mayor ($p \leq 0.05$) porcentaje de degradación de caparazón de camarón (36.37%) a las 72 h de fermentación con un pH de 6.49, en comparación con los cultivos axénicos de las bacterias Q6a y Q6b (17.37% y 12.60%, a pH 6.37 y 6.34). Con estos resultados se puede afirmar que existe una simbiosis sinérgica entre las bacterias Q6a y Q6b que les permite una mayor eficiencia degradativa.

Cuadro 15. Cambios de pH y porcentaje de degradación de caparazón de camarón de caparazón de camarón a las 72 h de fermentación.

Bacterias	Degradación de caparazón de camarón, %	pH
Q6 (cultivo mixto)	36.37a	6.49a
Q6a (cultivo axénico)	17.64b	6.37b
Q6b (cultivo axénico)	12.60b	6.34b
E.E.M.	23.096	0.001

a,b Medias con diferente lateras en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); E.E.M = Error estándar de la media.

Los porcentajes de degradación de caparazón de camarón obtenidos por las bacterias Q6a y Q6b son 20% menos que lo obtenido por Q6. Esto puede deberse a lo reportado por Pel *et al.* (1989), quienes observaron que la cepa quitinolítica *Clostridium sp.* 9.1 aislada del sedimento de barro a concentraciones bajas de substrato (0.1% MS) pudo degradar quitina hasta *N*-acetilglucosamina (NAG), pero cuando esta cepa se inoculó junto con bacterias sacarolíticas, esta segunda especie consumió la NAG producida por *Clostridium sp.* 9.1; esto indica una interacción bacteriana que hace más eficientes la degradación de quitina. Entre las interacciones conocidas de bacterias ruminales participan más de dos especies bacterianas, por lo que resulta difícil clasificar dichas interacciones en términos simples de mutualismo, comensalismo o parasitismo (Cobos, 2007). Por ejemplo, Miura *et al.* (1980) reportan una interacción compleja entre las bacterias ruminales *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii* y *Ruminococcus albus*, donde *B. amylophilus* usa el almidón del medio para su crecimiento y al morir libera aminoácidos ramificados que son asimilados por *M. elsdenii*; esta bacteria produce en exceso ácidos grasos de cadena ramificados, que son aprovechados por *R. albus* como factores de crecimiento y le permiten una degradación más eficiente de la celulosa. En esta interacción queda claro los beneficios para *M. elsdenii* y para *R. albus*, sin que se note el beneficio para *B. amylophilus*. Por lo anterior, es importante tener en cuenta que una vez que el consorcio BQT1

entre en contacto con otras bacterias ruminales, se pueden producir interacciones que pueden mejorar o disminuir la actividad quitinolítica.

6.8 Comparación de la degradación de caparazón de camarón, entre las bacterias Q6a, Q6b y el cultivo mixto Q6 solas o mezcladas con otras bacterias ruminales

Este ensayo se realizó con la finalidad de evaluar si las bacterias aisladas (Q6a y Q6b) o el cultivo mixto (Q6) cambiaban su capacidad para degradar caparazón de camarón, cuando en el medio de cultivo existan otras bacterias ruminales. Se evaluó el comportamiento de las bacterias Q6a, Q6b y el cultivo mixto Q6 a una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo mezcladas con líquido ruminal fresco (LRF) a dos concentraciones bacterianas 10^6 y 10^8 mL^{-1} durante 72 h de fermentación. En total se elaboraron 10 combinaciones o tratamientos.

Los resultados obtenidos en el comportamiento del pH se muestran en el Cuadro 16. Se obtuvieron valores de pH de 6.70 a 6.36. El pH más alto ($p < 0.05$) se obtuvo con Q6a⁸ 6.70 a las 24 h de fermentación, mientras que el pH más bajo (6.36) fue para Q6⁸+LRF⁶ a las 72 h de fermentación. Estos valores de pH indican que al pasar el tiempo de incubación, el pH fue disminuyendo. Aunque cabe señalar que el pH nunca disminuyó a valores menores de 6.2, considerado el límite del óptimo requerido para la actividad de bacterias ruminales (Russell y Wilson 1996; Scandolo *et al.*, 2007).

Cuadro 16. Comportamiento del pH a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación.

Tratamientos	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Q6 ⁸	6.66abcd	6.63abcd	6.39ef	6.39ef
Q6 ⁸ +LRF ⁶	6.66abcd	6.60abcde	6.40ef	6.36f
Q6 ⁸ +LRF ⁸	6.68ab	6.66abcd	6.54abcdef	6.58abcdef
Q6a ⁸	6.69 ^a	6.70a	6.56abcdef	6.48abcdef
Q6a ⁸ +LRF ⁶	6.65abcd	6.67ab	6.56abcdef	6.50abcdef
Q6a ⁸ +LRF ⁸	6.69 ^a	6.61abcde	6.65abcd	6.59abcde
Q6b ⁸	6.65abcd	6.49abcdef	6.44cdef	6.44def
Q6b ⁸ +LRF ⁶	6.64abcd	6.48abcdef	6.46bcdef	6.57abcdef
Q6b ⁸ +LRF ⁸	6.67abc	6.51abcdef	6.58abcdef	6.52abcdef
L.R.F. ⁸	6.66abcd	6.55abcdef	6.58abcdef	6.49abcdef

E.M (Error estándar de la media) = 0.004; a,b,c,d,e,f medias con diferente letras dentro de hileras y columnas son diferentes ($p \leq 0.05$); 8 = 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo; 6 = 10^6 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo.

El porcentaje de degradación del caparazón de camarón obtenido en los 10 tratamientos durante 0, 24, 48 y 72 h de fermentación se muestra en el Cuadro 17. El porcentaje de degradación más alto ($p < 0.05$) fue 42.36% a las 72 h fue para Q6⁸+LRF⁶, mientras que el menor porcentaje fue para Q6b⁸+LRF⁶ (13.82% a las 72 h). Estos porcentajes de degradación de caparazón de camarón indican que al transcurrir el tiempo de fermentación aumenta la degradación del sustrato en todos los tratamientos.

Debido a lo anterior se observó lo siguiente:

- 1) Se confirma que el cultivo mixto Q6 tiene una mejor ($p \leq 0.05$) eficiencia degradativa que la expresada individualmente por las bacterias Q6a y Q6b, que forman dicho cultivo mixto.

- 2) El cultivo mixto Q6 tuvo una interacción sinérgica en la degradación de caparazón de camarón con las bacterias ruminales presentes en el LRF, cuando su concentración fue superior.
- 3) Cuando la concentración bacteriana fue similar entre el cultivo mixto y LRF, se perdió el efecto sinérgico en la degradación del caparazón de camarón.
- 4) El comportamiento de la bacteria Q6a sola o en cocultivo con LRF fue similar al observado con Q6.
- 5) La bacteria Q6b tuvo como variante (con respecto a Q6 y Q6a) que el sinergismo sólo se presentó cuando la concentración de bacterias del LRF fue igual a Q6b (10^8 bacterias mL^{-1}).

Cuadro 17. Porcentaje de degradación de caparazón de camarón a diferentes horas de incubación.

Tratamientos	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Q6 ⁸	0.001	14.75efg	29.61bc	34.77b
Q6 ⁸ +LRF ⁶	0.001	12.21fgh	34.92b	42.36a
Q6 ⁸ +LRF ⁸	0.001	10.60ghi	21.21ed	31.30b
Q6a ⁸	0.001	0.46l	0.52l	15.87efg
Q6a ⁸ +LRF ⁶	0.001	7.93ghij	5.28ijkl	28.98bc
Q6a ⁸ +LRF ⁸	0.001	1.92kl	14.55gf	17.60ef
Q6b ⁸	0.001	1.94kl	13.73fgh	18.19def
Q6b ⁸ +LRF ⁶	0.001	0.63l	3.27jkl	13.81fgh
Q6b ⁸ +LRF ⁸	0.001	4.23ijkl	9.47ghij	24.56cd
L.R.F. ⁸	0.001	0.89l	11.92fgh	14.50fgh

E.E.M. (Error estándar de la media) = 3.997; a,b,c,d,e,f,g,h,i,j medias con diferente letras dentro de hileras y columnas son diferentes ($p \leq 0.05$); 8 = 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo; 6 = 10^6 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo.

En general, la concentración bacteriana aumentó ($p \leq 0.05$) con el tiempo de incubación (Cuadro 18) y entre las 0 y 24 h de incubación hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo a partir de las 48 h de

incubación, la concentración bacteriana se estabilizó en todos los tratamientos entre 9.62×10^9 a 9.76×10^9 , sin diferencias significativas entre tratamientos. El hecho de que no haya incrementado más la concentración de bacterias se debe a que los experimentos en medios de cultivo en tubo son sistemas cerrados, en los cuales la disminución de un nutriente, la acumulación de productos de desecho o la disminución del pH, detienen el crecimiento y la actividad bacteriana, y se inicia la fase de crecimiento estacionaria de las bacterias.

Cuadro 18. Concentración de bacterias mL^{-1} de medio de cultivo a diferentes horas de incubación.

Tratamientos	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Q6 ⁸	6.1X10 ⁸ ghi	1.9X10 ⁹ cdefg	5.4X10 ⁹ abc	5.1X10 ⁹ abc
Q6 ⁸ +LRF ⁶	5.2X10 ⁷ i	4.2X10 ⁹ abc	4.8X10 ⁹ abc	1.2X10 ¹⁰ a
Q6 ⁸ +LRF ⁸	7.0X10 ⁸ ghi	3.7X10 ⁹ bcd	3.5X10 ⁹ bcde	4.2X10 ⁹ abc
Q6a ⁸	2.6X10 ⁸ i	6.1X10 ⁸ ghi	3.9X10 ⁹ bcde	4.7X10 ⁹ abc
Q6a ⁸ +LRF ⁶	4.1X10 ⁷ j	1.3X10 ⁹ defgh	4.8X10 ⁹ abc	4.7X10 ⁹ abc
Q6a ⁸ +LRF ⁸	7.6X10 ⁸ ghi	4.9X10 ⁹ abc	4.3X10 ⁹ abc	6.0X10 ⁹ abc
Q6b ⁸	8.4X10 ⁸ ghi	9.4X10 ⁸ fgh	3.9X10 ⁹ bc	5.1X10 ⁹ abc
Q6b ⁸ +LRF ⁶	4.9X10 ⁷ j	1.1X10 ⁹ efgh	3.5X10 ⁹ bcd	6.9X10 ⁹ ab
Q6b ⁸ +LRF ⁸	9.0X10 ⁸ hi	4.1X10 ⁹ bc	3.3X10 ⁹ bcde	5.7X10 ⁹ abc
L.R.F. ⁸	7.9X10 ⁸ ghi	2.9X10 ⁹ bcdef	5.8X10 ⁹ abc	6.0X10 ⁹ ab

E.E.M. (Error estándar de la media) = 0.022; a,b,c,d,e,f,g,h,i medias con diferente letras dentro de hileras y columnas son diferentes ($p \leq 0.05$); 8 = 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo; 6 = 10^6 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo.

Considerando las tres variables evaluadas (pH, degradación de caparazón de camarón y concentración de bacterias totales), el tratamiento Q6⁸+LRF⁶ obtuvo el mayor porcentaje de degradación de caparazón de camarón a las 72 h de fermentación manteniendo un pH y una concentración de bacterias por mL de medio de cultivo similar ($p > 0.05$) a la de los otros tratamientos. Esto sugiere que el cultivo mixto Q6 degrada mejor el caparazón de camarón en presencia de

bacterias ruminales, siempre y cuando la concentración de estas sea menor a la del cultivo mixto, ya que cuando se mezcló este cultivo mixto con una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} de líquido ruminal la degradación de caparazón de camarón fue menor (31.31%). Estos resultados de la concentración de bacterias quitinolíticas indican que la fase estacionaria se encuentra después de 24 h de fermentación en medios de cultivo con quitina como única fuentes de carbono. Mientras que Seki y Toga (1963) reportan que la fase estacionaria de las bacterias quitinolíticas cultivadas en medios de cultivo con quitina y glucosa como fuente de carbono (0.18 y 0.10 g 10 mL^{-1}) fue después de las 72 h de fermentación.

Las bacterias Q6a y Q6b aumentaron el porcentaje de degradación cuando fueron mezcladas con bacterias presentes en el líquido ruminal fresco, pero respondieron a diferentes concentraciones (10^6 y 10^8) Q6a aumentó el porcentaje de degradación de caparazón de camarón con una concentración de 10^6 bacterias mL^{-1} LRF (28.99%), mientras que la bacteria Q6b degradó el mayor ($p \leq 0.05$) porcentaje de caparazón de camarón con una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} de LRF (24.56%). Resultados semejantes obtuvieron Pel *et al.* (1989) al evaluar la fermentación de quitina con un cultivo puro de la cepa *Clostridium* sp 9.1 o combinado con bacterias sacaralíticas (*E. coli* tipo silvestre, *Klebsiella aerogenes* ATCC15380 y tres cepas de *Clostridium acetobutylicum*: ATCC 824, HA 8.1 y GH 8.2). Estos autores concluyeron que la combinación de la bacteria quitinolítica con bacterias sacarolíticas mejora la hidrólisis y fermentación de la quitina de 5 a 8 veces con relación a la cepa quitinolítica pura.

6.9 Caracterización fermentativa de Q6, Q6a y Q6b

Se comparó el cambio de pH y producción de AGV en tres medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (glucosa, quitina y caparazón de camarón) por las bacterias Q6a, Q6b y el cultivo mixto Q6 a una concentración inicial de 10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo a las 0 y 72 h de incubación. En el caso de la degradación solamente se realizó en quitina y caparazón de camarón.

Los valores obtenidos (Cuadro 19) indican que el pH inicial (0 h de incubación) fue diferente ($p \leq 0.05$) en los medios de cultivo con quitina y caparazón de camarón. Solamente se determinó un menor ($p \leq 0.05$) pH en los medios de cultivo con glucosa inoculados con el cultivo mixto Q6. Sin embargo, el pH inicial de esta prueba se puede considerar adecuado para la actividad bacteriana, ya que el mínimo fue 6.51. A las 72 h de incubación los medios de cultivo con caparazón de camarón mantuvieron un pH superior ($p \leq 0.05$) con respecto a los medios de cultivo con quitina inoculados con Q6 y Q6b, y con relación a los medios con glucosa inoculados con Q6, Q6a y Q6b. Sin embargo, en todos los medios de cultivo inoculados con Q6, Q6a y Q6b, se logró un pH estable superior al mínimo recomendado como óptimo para actividad quitinolítica microbiana (Russell y Wilson 1996; Scandolo *et al.*, 2007). Esto también es apoyado con los resultados obtenidos en cuanto a pH óptimo para la actividad quitinolítica y discutido anteriormente.

Cuadro 19. Comportamiento del pH a las 0 y 72 h de incubación en tres diferentes medios de cultivo inoculados con Q6, Q6a y Q6b.

Bacterias	pH	
	0 h	72 h
	Glucosa	
Q6	6.51c	6.36b
Q6a	6.57b	6.36b
Q6b	6.57b	6.37b
	Quitina	
Q6	6.54bc	6.34b
Q6a	6.55bc	6.49ab
Q6b	6.55bc	6.32b
	Caparazón de camarón	
Q6	6.63 ^a	6.59a
Q6a	6.64 ^a	6.59a
Q6b	6.65 ^a	6.58a
E.E.M.	0.001	0.001

a,b medias con diferente letras en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); E.E.M = Error estándar de la media.

El porcentaje de degradación de quitina y caparazón de camarón reportado en el Cuadro 20, indicó que existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las bacterias y el cultivo mixto a las 72 h de fermentación: el cultivo mixto (Q6) tiene una mayor eficiencia para degradar quitina y caparazón de camarón que Q6a y Q6b, que conforman el cultivo mixto Q6.

Cuadro 20. Degradación (%) de quitina pura y caparazón de camarón por las bacterias Q6a, Q6b a las 0 y 72 h de incubación.

Bacterias	Porcentaje de degradación	
	0 h	72 h
	Quitina, %	
Q6	0.00a	48.55a
Q6a	0.00a	3.80c
Q6b	0.00a	5.73c
	Caparazón de camarón, %	
Q6	0.00a	33.66b
Q6a	0.00a	3.82c
Q6b	0.00a	1.07c
E.E.M.	0.00	8.85

a,b,c medias con diferentes letras en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); E.E.M = Error estándar de la media.

Los valores obtenidos indican que existe una estrecha interacción entre las bacterias Q6a y Q6b para que se manifieste una importante actividad quitinilítica. Boyer (1986) no reporta el porcentaje de degradación de quitina por las 17 cepas aisladas solas o en cocultivo; sin embargo, menciona que la mezcla de las bacterias quitinolíticas es más exitosa en la degradación de quitina y producción de CO₂, H₂ y acetato, en comparación con cepas individuales. Sabry (1991) aisló 40 cepas de bacterias quitinolíticas a partir de diferentes tipos de suelos, de las cuales solamente cuatro presentaron una importante actividad de la enzima quitinasa: *Alcaligenes denitrificans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. subtilis*, y se evaluó su capacidad para degradar quitina coloidal, quitina comercial y caparazón de camarón. Las cuatro cepas degradaron 89.7 a 95.2% de quitina coloidal, 72.0 a 76.6% de quitina comercial y 59.4 a 62.3% de caparazón de camarón, los cuales son superiores a lo obtenido por el cultivo mixto aislado Q6 (Cuadro 20). Sin embargo, este autor realizó su evaluación en condiciones aeróbicas y la

incubación duró 7 d, mientras que en el presente estudio se usaron condiciones anaerobias y la incubación sólo duro 3 d.

La producción de AGV por las bacterias Q6a y Q6b solas o en cocultivo (Q6) tuvo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). En el Cuadro 21 se aprecia que Q6 produce una mayor concentración de AGV totales usando quitina como sustrato (55.69 mM L⁻¹), en comparación con Q6a y Q6b (23.56 y 36.01 mM L⁻¹). Resultados muy parecidos se obtuvieron cuando se utilizó caparazón de camarón como sustrato, aunque la producción total de AGV fue menor ($p \leq 0.01$) que la obtenida con quitina pura. En contraste, en los medios de cultivo con glucosa, la mayor producción de AGV se dio en el cultivo axénico de la bacteria Q6b ($p \leq 0.01$) en comparación con el consorcio bacteriano Q6 (33.50 vs 28.1 mM L⁻¹).

La concentración de AGV obtenido durante la fermentación de glucosa, quitina y caparazón de camarón fue similar a la obtenida por Abazinge *et al.* (1994) en borregos alimentados con ensilaje compuesto 1:1 de desechos de cangrejo y paja de trigo, la concentración total fue 73.4 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ después de 2 h de consumo de los cuales 65% fue ácido acético, 26% ácido propiónico y 1.3% ácido butírico. Los resultados obtenidos por Kopečný *et al.* (1996) con una bacteria quitinolítica (*Clostridium tertium* ChK5) fueron inferiores a lo reportado en el presente estudio, ya que este autor reportó 38 mmol L⁻¹ de AGV en medio de cultivo con glucosa y 31 mmol L⁻¹ de AGV en medios de cultivo con quitina a las 72 h de fermentación. La mayor producción de AGV totales obtenido por Q6 con relación a cultivos axénicos (Q6a y Q6b) de las mismas especies (Cuadro 21), confirma que existe una actividad bacteriana sinérgica entre estos cultivos, cuando se utiliza quitina ó caparazón de camarón como sustrato.

Cuadro 21. Producción de AGV por las bacterias Q6a, Q6b y Q6 usando diferentes sustratos de cultivo a las 72 h de incubación.

Bacterias	Ácidos grasos volátiles, %			Total (mM L ⁻¹)	Degradación de sustrato, %
	Acético,%	Propiónico,%	Butírico,%		
	Glucosa				
Q6	75.31cd	15.76a	8.93bc	28.14b	n d
Q6a	84.90a	15.10ab	0.000d	19.01b	n d
Q6b	74.95cd	14.21ab	10.85b	33.50ab	n d
	Quitina				
Q6	72.79d	7.64c	19.57a	55.69a	48.55a
Q6a	72.90cd	14.95ab	12.15b	23.56b	3.80c
Q6b	74.75cd	12.651b	12.59b	36.01ab	5.73c
	Caparazón de camarón				
Q6	77.10bc	13.57ab	9.32bc	40.90ab	33.67b
Q6a	74.92cd	14.46ab	10.61b	30.75b	3.83c
Q6b	79.54b	14.34ab	6.11c	30.93b	1.07c
E. E. M.	3.13	1.30	3.48	90.21	8.85

a,b,c,d = medias con diferente letras en una columna son diferentes (p<0.01); E.E.M = Error estándar de la media; nd = no determinado.

En cuanto a la producción de amoniaco no se determinaron diferencias significativas a las 0 h de fermentación (p>0.01) y la concentración inicial de nitrógeno amoniacal en los medios de cultivo fue menor a la requerida para actividad microbiana (10 mg HN₃ 100 mL⁻¹ fluido ruminal) (Abdoun *et al.*, 2007). A las 72 h de fermentación se determinó una mayor (p≤0.01) concentración de nitrógeno amoniacal en los tres medios de cultivo con respecto a la 0 h de incubación (Cuadro 22). Sin embargo, únicamente en el consorcio bacteriano Q6 inoculado en el medio de cultivo con quitina se observó una acumulación importante de amoniaco (22.11 mg dL⁻¹).

Cuadro 22. Comparación de la concentración (mg dL⁻¹) de nitrógeno amoniacal por Q6, Q6a y Q6b en tres diferentes sustratos a las 0 y 72 h de incubación.

Bacterias	Nitrógeno amoniacal, mg dL ⁻¹	
	0 h	72 h
	Glucosa	
Q6	3.44a	5.71b
Q6a	4.29a	7.41b
Q6b	4.78a	6.00b
	Quitina	
Q6	4.91a	22.11a
Q6a	4.21a	5.93b
Q6b	4.60a	8.53b
	Caparazón de camarón	
Q6	4.55a	7.03b
Q6a	4.31a	6.72b
Q6b	5.67a	4.40b
E. E. M.	1.26	6.91

a,b = medias con diferente letras en una columna son diferentes (p≤0.01); E. E. M = Error estándar de la media.

La concentración de amoniaco obtenida es inferior a la reportada por Nicholson *et al.* (1996) quienes utilizaron como inóculo en cultivos *in vitro*, líquido ruminal de ovinos alimentados con dietas que contenían harina de caparazón de cangrejo, y determinaron una concentración de 13.3 a 20.1 mg dL⁻¹. En el presente trabajo la concentración de nitrógeno amoniacal en medio de cultivo con quitina y el consorcio bacteriano Q6 fue 22.11 mg dL⁻¹. Una mayor concentración de (26.9 mg dL⁻¹) fue reportada por Abazinge *et al.* (1994) en fluido ruminal obtenido de borregos alimentados con ensilaje a base de desechos de cangrejo y paja (1:1) a las 2 h de alimentación de los animales. De acuerdo a Abdoun *et al.* (2007), la concentración mínima de amoniaco en

rumen requerida para estimular la síntesis de masa microbiana es 10 mg de HN₃ 100 mL⁻¹ fluido ruminal. Por tanto, después de 72 h de incubación los medio de cultivo con glucosa o cáscara de camarón tuvieron una concentración de amoniaco inferior al mínimo requerido, mientras que en los medios con la quitina sólo los medios de cultivo inoculados con Q6 lograron una concentración de amoniaco superior al requerido para síntesis de masa microbiana. Estos resultados indican la necesidad de incluir una fuente de NNP que permita cumplir con el requerimiento de amoniaco para síntesis de proteína bacteriana.

6.10 Caracterización molecular del gen 16S rARN de las bacterias aisladas

De las secuencias obtenidas de las bacterias quitinolíticas Q6a y Q6b se realizó un BLAST (Altschul *et. al.*, 1997) para obtener secuencias homólogas en el Gen-Bank, donde se obtuvieron 100 secuencias semejantes (99%) a las de las bacterias quitinolíticas. De estas 100 secuencias con homología a la bacteria Q6a sólo se seleccionaron cinco para la reconstrucción del árbol filogenético, mientras que para la bacteria Q6b fueron ocho secuencias homólogas.

La caracterización del gen 16S rARN se realizó en tres repeticiones de la bacteria Q6b y una de la Q6a; de éstas se obtuvo un fragmento de $\approx$ 1500 pb de las que se obtuvo 796 pb. Para el análisis de éstas se obtuvieron 13 secuencias más del Gen-Bank que corresponden a dos géneros (*Bacillus*, *Enterococcus*) de bacterias ruminales.

La estadística básica del gen 16S rARN (Cuadro 5) de las bacterias utilizadas para el análisis señalan que de las 796 pb analizadas, 634 son sitios conservados, 158 sitios son variables (es decir, son nucleotidos que cambian dentro de las 15 secuencias comparadas), 89 son sitios de información de parsimonia y 69 sitios corresponden a mutaciones únicas.

6.1.1 Distancias genéticas

El análisis de las distancias genéticas del gen 16S rARN (Cuadro 23) señala que la mayor distancia (0.09) entre las secuencias analizadas del grupo 1 fue entre las bacterias *B. circulans* (DQ981456) y *B. licheniformis* (AY631057). La menor distancia (0.00) se encuentra entre las bacterias *B. licheniformis* (CP000002) y la bacteria *B. licheniformis* (AY786999). Para el caso del grupo 2 no se encontraron diferencias entre las bacterias que forman el grupo 2. Entre grupos, la mayor distancia (0.19) fue entre las bacterias *E. faecium* (AB362603) y la bacteria *B. circulans* (DQ981456), mientras que la menor distancia genética (0.11) fue entre las bacterias Q6b y *B. licheniformis* (EF433410). Finalmente, el grupo de comparación (3) presenta la mayor distancia (0.17) con el grupo 1 con las bacterias *T. solitarius* (AJ301840) y *B. licheniformis* (AY631057) y la menor distancia genética (0.13) se encuentra *T. solitarius* (AJ301840) y la bacteria *B. circulans* (DQ981456). En el caso del grupo 2 *T. solitarius* (AJ301840) muestra una mayor distancia genética con la bacteria *E. faecium* (AB362603) y una menor distancia con la bacteria Q6b.

La distancias genéticas entre todas la secuencias analizadas señalan que la distancia entre ellas fue 0.116, en tanto que dentro de cada grupo de bacterias, el grupo 1 que incluye la bacteria Q6a, presenta una distancia de 0.27 que está asociada a una mayor variación genética, en tanto que el grupo 2 que incluye la bacteria Q6b no presenta variación (0.00). La mayor distancia fue de los grupos 1 y 2 con el grupo de comparación (0.116 y 0.107).

Con base a las distancias genéticas determinadas en las bacterias aisladas (Q6a y Q6b) y las reportadas en el Gen Bank se puede concluir que la bacteria Q6a pertenece a la especie *B. licheniformis*, con un 99% de semejanza; mientras que la bacteria Q6b pertenece al género *Enterococcus* (99% de semejanza) y queda pendiente dilucidar si pertenece a la especie *E. faecium*, *E. lactis* o *E. durans*.

Cuadro 23. Distancias genéticas del gen 16S rARN de las bacterias quitinolíticas Q6a, Q6b y bacterias del NCBI.

Bacteria	Q6a	<i>B. licheniformis</i> (AY631057)	<i>B. circulans</i> (DQ981456)	<i>B. licheniformis</i> (EF433410)	<i>B. licheniformis</i> (AY786999)	<i>B. licheniformis</i> (CP000002)	Q6b	<i>E. faecium</i> (AB362603)	<i>E. faecium</i> (DQ672262)	<i>B. ruminal</i> (EU124837)	<i>B. ruminal</i> (DQ393036)	<i>E. lactis</i> (DQ255948)	<i>E. durans</i> (AJ420801)	<i>E. lactis</i> (AY902459)
Q6a														
<i>B. licheniformis</i> (AY631057)	0.01													
<i>B. circulans</i> (DQ981456)	0.06	0.09												
<i>B. licheniformis</i> (EF433410)	0.00	0.01	0.07											
<i>B. licheniformis</i> (AY786999)	0.00	0.01	0.07	0.00										
<i>B. licheniformis</i> (CP000002)	0.00	0.01	0.08	0.00	0.00									
Q6b	0.11	0.13	0.12	0.11	0.11	0.12								
<i>E. faecium</i> (AB362603)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00							
<i>E. faecium</i> (DQ672262)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00						
<i>B. ruminal</i> (EU124837)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00					
<i>B. ruminal</i> (DQ393036)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00				
<i>E. lactis</i> (DQ255948)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
<i>E. durans</i> (AJ420801)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>E. lactis</i> (AY902459)	0.11	0.12	0.19	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>T. solitarius</i> (AJ301840)	0.16	0.17	0.13	0.16	0.16	0.16	0.10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11

6.12 Inferencia filogenética

La inferencia de la filogenia del gen 16S rARN se realizó con las secuencias alineadas en el programa MEGA versión 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) y el árbol filogenético (Figura 5) señala que existen tres grupos bien definidos: uno para cada bacteria aislada Q6a y Q6b y otro para el grupo de comparación. El análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) para el soporte de las ramas con 1000 repeticiones señala un soporte de 100% para cada rama, que permite indicar que las bacterias Q6a y Q6b son dos grupos genéticamente diferentes; sin embargo, comparten fragmentos nucleotídicos similares (634 pb).

En el grupo 1 se encuentra la bacteria quitinolítica Q6a la cual se encuentra relacionada con bacterias de las especies *Bacillus licheniformis* y *Bacillus circulans*; se piensa que la bacteria *B. circulans* puede ser la bacteria ancestral de este grupo. En el grupo 2 se encuentra la bacteria quitinolítica Q6b la cual se encuentra emparentada al género *Enterococcus*, principalmente a las especies *E. faecium*, *E. durans* y *E. lactis* y con un grupo identificado como bacterias ruminales, las cuales no han sido identificadas apropiadamente en el Gen-Bank en género y especies. El tercer grupo está formado por la bacteria *Tetragenococcus solitarius* (AJ301840) la cual se utilizó como referencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo señalan que los grupos de bacterias encontradas en el rumen de borregos alimentados con caparazón de camarón corresponden a los géneros *Bacillus* y *Enterococcus*, y éstos corresponden con lo señalado por Holt *et al.* (1994) en el manual Bergey's. Las características del género *Bacillus*: son células bacilos, con un tamaño de 0.5 - 2.5 x 1.2 - 10 µm y a menudo están arreglados en pares o en cadena, Gram positivo, móviles por flagelo, aerobias o anaerobias facultativos con una amplia diversidad fisiológica para desarrollarse en un intervalo grande de temperatura, pH y salinidad, usualmente son catalasa positivo (Colombo *et al.*, 2004). La mayoría de las especies del género *Bacillus* tienen una amplia distribución en la

naturaleza y se encuentran en suelo, agua y como parte de la flora intestinal normal de algunos mamíferos, incluyendo al hombre. Rojo-Rubio *et al.* (2001) mencionan que la bacteria *Bacillus licheniformis* tiene una función importante en el rumen ya que produce amilasas, enzimas necesarias para la degradación de almidón proveniente de los granos usados como alimento. Pattnaik *et al.* (2001) aislaron *Bacillus licheniformis* de líquido ruminal de búfalo con un potente efecto bactericida contra *S. bovis* y *Eubacterium ruminantium*, y una actividad enzimática sobre varios polisacáridos.

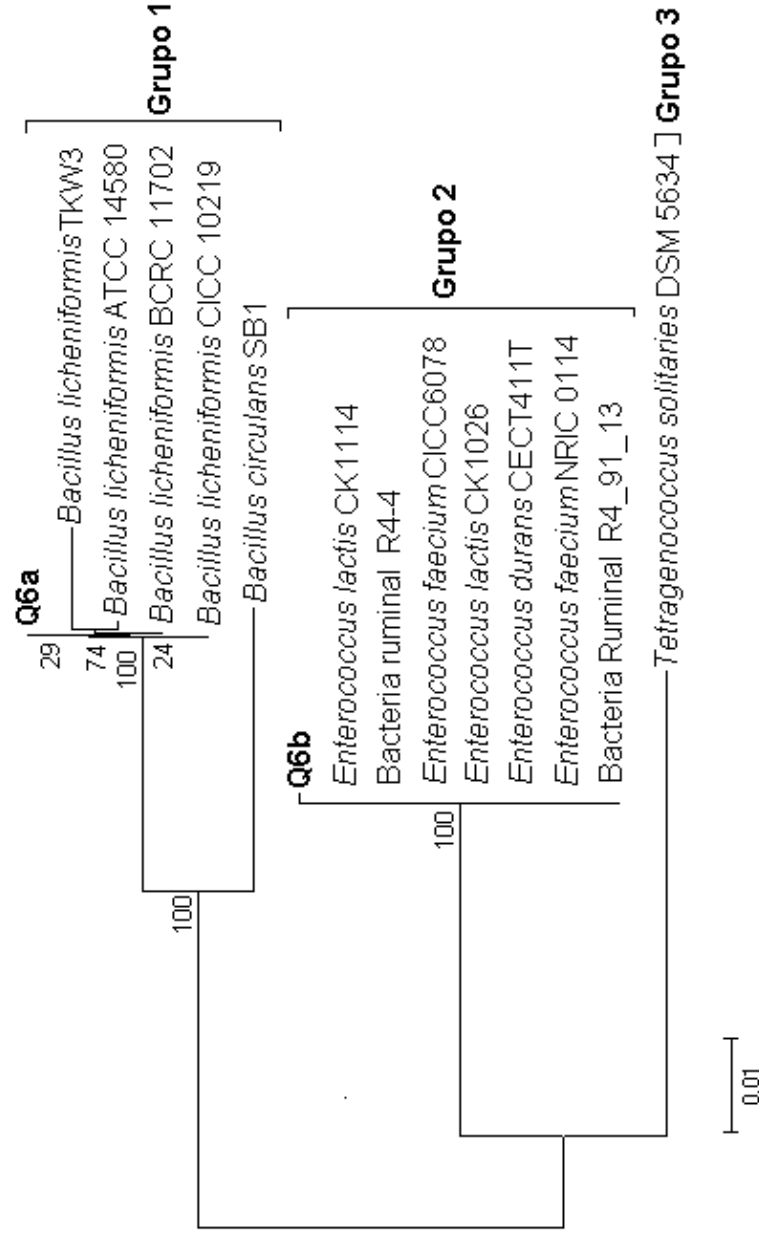


Figura 5. Árbol filogenético de las bacterias Q6a y Q6b con base en NJ con soporte de ramas con analisis bootstrap. El árbol filogenético muestra tres grupos bien definidos que corresponden a la identificación morfológica y fisiológica.

El género *Enterococcus* se caracteriza por presentar células esféricas u ovoides de 0.6 - 2.0 x 0.6 - 2.5 µm, que crecen en pares o cadenas, son Gram positivas, algunas veces móviles, anaerobias facultativas, catalasa negativo y su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Este género se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ambientes como desagües de aguas negras, heces fecales, agua, alimentos fermentados y no fermentados (Holt *et al.*, 1994; Mareková *et al.*, 2003; Lauková *et al.*, 2007). En particular, se ha reportado la presencia de *Enterococcus faecium* en heces de conejo (Simonová *et al.* 2005) y en ensilados de maíz (Cai, 1999; Marcináková *et al.* 2004).

Queda pendiente un análisis del parentesco entre Q6b y el grupo identificado como bacterias ruminales localizadas en el Gen-Bank. Este grupo no tiene una clara identificación y solo se señalan como bacterias ruminales aisladas de renos (*Rangifer tarandus tarandus*) semi-domesticados en Noruega obteniendo ≈1500 pb de cada bacteria aislada (Sundset *et al.*, 2007). De acuerdo con la información disponible, es un grupo de bacterias que tiene como característica común que fueron aisladas de rumen y que pueden estar clasificadas dentro de la familia Firmicutes donde se encuentran los géneros *Clostridium*, *Actinomyces* y *Butyrivibrio*. Al respecto cabe señalar que se ha reportado el aislamiento de al menos dos especies de clostridios: *C. paraputrificum* (Cobos y Yokoyama, 1995) y *C. tertium* (Kopečný *et al.*, 1996). Ambos clostridios pueden degradar quitina. Sin embargo, la identificación de dichas bacterias fue por métodos fenotípicos (morfología colonial, tinción Gram y perfil metabólico); por tanto, no se puede establecer, su pertenencia al grupo genético denominado bacterias ruminales.

La comparación de las secuencias de los 16S rARN (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Esto ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la

identificación rápida y precisa de las bacterias (Eisen *et al.*, 1992). No obstante, se debe considerar que la tecnología está en cambio constante, donde la tendencia para la caracterización de las especies es hacia la comparación de genomas completos y no sólo de un gene.

Aunque el estudio de las secuencias del gen 16S rARN se ha considerado una herramienta estándar para la identificación de bacterias, los resultados del presente estudio permiten suponer que el fragmento seleccionado del 16S rARN (Miyajima *et al.*, 2002; Janda and Abbott, 2007) no es lo suficientemente discriminante para asegurar a que especie pertenece la bacteria Q6b. Debido, quizá a que a nivel 16S se tienen secuencias nucleotídicas poco polimórficas para realizar una identificación más precisa; por tanto, en este momento sólo se puede asegurar que las bacterias aisladas corresponden a los géneros *Bacillus* y *Enterococcus*. Se requiere la amplificación del gen completo, así como realizar otros estudios que incluyan la secuenciación de otros genes.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que las dos bacterias quitinolíticas identificadas como Q6a y Q6b son diferentes en la forma de crecimiento, elevación, luz reflejada, tipo de tinción Gram. Además se confirmó con el análisis filogenético que estas bacterias pertenecen a dos géneros diferentes (*Bacillus* y *Enterococcus*), aunque comparten un gran número de nucleótidos (634 pb).

Cuadro 24. Características fisiológicas y genéticas de las bacterias Q6a y Q6b.

Morfología colonial	Bacterias	
	Q6a	Q6b
Tamaño (mm)	Irregular	1
Color	Blanca	Blanca
Forma	Irregular	Circular
Elevación	Plana	Elevada
Aspecto	Seca	Húmeda
Borde	Irregular	Enteros
Luz reflejada	Mate	Brillante
Fisiología celular		
Catalasa	+	-
Tinción Gram	Bacilos +	Cocos +
Secuenciación del gen 16S rARN		
Género	<i>Bacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
Número de bases	780	739
Sitios conservados	719	736
Sitios variables	61	2
Sitios de información parsimonia	en 0.0	1
Sitios de mutaciones únicas	60	1

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- 1)** En el primer aislamiento a partir del liofilizado CMBQ se obtuvieron seis consorcios bacterianos marcados BQT1 – BQT2, donde se selecciono el consorcio BQT1 por presentar el mayor porcentaje de degradación de quitina pura (62.69%).
- 2)** En el segundo aislamiento se obtuvieron 16 bacterias y dos consorcios bacteriano (Q5 y Q6), donde se selecciono el consorcio bacteriano Q6 ya que presentó el mayor porcentaje de degradación de quitina pura y caparazón de camarón (37.76% y 23.10%).
- 3)** En el tercer aislamiento se obtuvieron dos bacterias puras Q6a y Q6b que forman parte del consorcio bacteriano Q6.
- 4.** Las bacterias Q6a y Q6b presentaron por si solas un menor porcentaje de degradación *in vitro* de caparazón de camarón (17.64 y 12.60%) en comparación Q6 (36.37%). Por tanto, estas dos bacterias estarían formando un consorcio mutualista donde las dos bacterias se ven beneficiadas en cuanto a la degradación *in vitro*.
- 5)** Comparando la producción de ácidos grasos volátiles totales en tres medios de cultivos (quitina pura, caparazón de camarón y glucosa) a las 72 h de fermentación, el consorcio Q6 presentó la mayor producción (28.14, 55.69 y 40.90 nM L⁻¹) en comparación con las bacterias por separado (Q6a y Q6b). Para nitrógeno amoniacal el consorcio Q6 presentó la mayor producción sólo en medios de cultivo con quitina pura (22.11 mg dL⁻¹) en comparación con las bacterias por separado Q6a (5.93 mg dL⁻¹) y Q6b (8.53 mg dL⁻¹), mientras que

para los medios de cultivo con glucosa y caparazón de camarón no se encontraron diferencias significativas en los tres inóculos (Q6, Q6a y Q6b).

6) En cuanto a la identificación de las bacterias Q6a y Q6b se logró un porcentaje de similitud de 99% lo que hace muy confiable la identificación obtenida. La Q6a fue clasificada dentro del género *Bacillus* mientras que para la bacteria Q6b fue *Enterococcus*. Sin embargo, se recomienda repetir la extracción del gen 16S rRNA hasta obtener 1500 pb para confirmar su identificación en el banco de genes.

7) La comparación de las secuencias de los 16S rARN (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas.

8. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las bacterias quitinolíticas Q6a y Q6b son totalmente diferentes, aunque compartan una gran cantidad de nucleótidos (634 pb).

8. LITERATURA CITADA

- Abazinge, M. D. A., J. P. Fontenot, and V. G. Allen. 1994. Digestibility, nitrogen utilization, and voluntary intake of ensiled crab waste-wheat straw mixtures fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 72:565-571.
- Abdoun, K., F. Stumpff, and H. Martens. (2007). Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim. Health Res. Reviews* 7:(1-2): 43-59.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.
- Arcos, M. L., F. Ossa, y T. E. Díaz. 2004. Criopreservaci3n de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogene*. *Rev. Corpoica.* 5(1): 60-63.
- Behr, T., C. Koob, M. Schedl, A. Mehlen, H. Meier, D. Knopp, E. Frahm, U. Obst, K. Schleifer, R. Niessner, and W. Ludwig. 2000. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:563-572.
- Bochi-Brum, O., M. D. Carro, C. Vald3s, J. S. González, and S. L3pez. 1999. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: effect of the diet of donor animals. *Arch. Zootec.* 48: 51-61.
- Boller, T., A. Gehri, F. Mauch, and U. V3gel. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157:22-31.
- Borrego, S., M.E. Espinosa, M.E. Carballo, T. Moreira, E. Martí, A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilizaci3n durante 10 años. *Biotecnología Aplicada* 18 (2): 85-87.
- Botina, S. G., and V. V. Sukhodolets. 2005. Species formation in bacteria: a comparison of 16S rRNA genes in closely related species of enterococci. *Genetics*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=82501665> (5 Dic. 2007).
- Boyer, J. N. 1986. End products of anaerobic chitin degradation by salt marsh bacteria as substrates for dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(6):1415-1418.

- Brundage, A. L., F. M. Husby, G. L. Beardsley, and V. L. Burton. 1981. King crab meal in concentrates for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 64(3):433-440.
- Brundage, A. L., F. M. Husby, M. L. Herlugson, W. L. Simpson, and V. L. Burton. 1984. Acceptability of tanner crab meal in concentrates for lactation. *J. Dairy Sci.* 67(9):1965-1970.
- Brundage, A. L., F. M. Husby, V. L. Burton, and J. L. Franklin. 1979. Drymatter and nitrogen solubility of Alaska marine waste. *J. Dairy Sci.* 62(1):135-142.
- Bryant, M. P., and L. A. Burkey. 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. *J. Dairy Sci.* 36(3):218-224.
- Burmølle, M., L. H. Hansen, and S. J. Sørensen. 2007. Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria. *Microb. Ecol.* 54(2):352-362.
- Cai, Y. 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 82:2466-2471.
- Casas, E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 14(1):24-31.
- Chen, H. M., S. P. Meyers, R. W. Hardy, and S. L. Biede. 1984. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *J. Food Sci.* 49(5):1337-1340.
- Cheng, C., G. Liu, and S. Yao. 2004. The studies on taxonomy and phylogenesis of *Bacillus licheniformis* by 16S rRNA sequence mensuration. Submitted (19-OCT-2004) CICC, China National Institute of Food and Fermentation Industries, Xiao Yun Road 32#, Chaoyang District, Beijing 100027, China. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=55584352> (5 Dic. 2007).
- Clarke, P. H, and M. V. Tracey. 1956. The occurrence of chitinase in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 14(1):188-96.
- Cobos, M. A., L. E. García, S. S. González, J. R. Barcena, D. S. Hernández, and M. Pérez-Sato. 2002. The effect of shrimp shell waste on ruminal bacteria and performance of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 95(3):179-187.

- Cobos, M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 132(3-4):324-330.
- Cobos, M. A., C. G. Olvera, D. H. Sánchez, S. S. González, and G. D. M. Martínez. 2004. Isolation and characterization of two rabbit cecum bacteria with potential use for rabbit feeding. Rev. Vet. Mex. 35(2):109-120.
- Cobos, P. M. A. 1994. Isolation and characterization of ruminal microorganisms able to degrade chitinous waste. Thesis (Ph. D.) Department Animal Science. Michigan State University. 154 p.
- Cobos, P. M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: Colonisation and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Rumen Ecology Research Planning. R. J. Wallace and A. Lahlou-Kassi (eds). International Livestock Research Institute (ILRI). pp:151-161.
- Cobos, P. M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Microbiología Agrícola. R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcon (ed). Trillas. México, D. F. pp: 498-515.
- Colombo, C. C., B. M. Sosa, y J. Scorza. 2004. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 24(1-2):1-7.
- Corral Á. R. 2004. Promueven en Estados Unidos camarón mexicano como el mejor del mundo. CONAPESCA. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2004/marzo/13_conapesca.pdf(25 Sep 2007).
- Eisen, J. A., S. W. Smith, and C. M. Cavanaugh. 1992. Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. J. Bacteriol. 174(10):3416-3421.
- Fadel EL-Seed, A. N. M. A., H. E. M. Kamel, J. Sekine, M. Hishinuma, and K. Hamana. 2003. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 83(1):161-163.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39(4):783-791.

- García-González, L. E. 2000. Comportamiento productivo en ovinos alimentados con caparazón de camarón y su efecto en la fermentación ruminal y concentración de microorganismos. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Ganadería. Colegio de Posgraduados. Montecillo. Edo. de México. 73 p.
- García, L. M. D. y F. U. Fernández. (1997). La conservación de cepas microbianas. Actualidad. SEM. 30:12-16.
- García-Vallejo, F. 2004 La genómica nutricional: un nuevo paradigma de la investigación de la nutrición humana. Colomb. Med. 35(3):150-160.
- Gay, Lucien, M. Hébraud, V. Girard, and M. Fèvre. 1989. Chitin synthase activity from *Neocallimastix frontalis*, an anaerobic rumen fungus. J. General Microbiol. 135:279-283.
- González, A. V., C. A. Guerrero y U. O. Méndez. 2001. Estructura y compatibilidad de mezclas de poliamidas con quitina y quitosán. Ingenierías 6(13):9-19.
- Gooday, G. W. 1990a. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation 1(2-3):177-190.
- Gooday, G. W. 1990b. The ecology of chitin degradation. Adv. Microb. Ecol. 11:387-430.
- Hamlin, L. J., and R. E. Hungate. 1956. Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. J. Bacteriol. 72:548-554.
- Harrigan, W. F., y E. M. McCance. 1979. Métodos de Laboratorio en Microbiología de los Alimentos y Productos Lácteos. Ed. Academia. León, España. pp:32-35, 361-366.
- Hobson, P. N., and C. S. Stewart. 1998. The Rumen Microbial Ecosystem. Blackie Academic & Professional, New York. 719 p.
- Holt, G. J., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Editora Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, USA. pp:301-562, 787.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In*: Norris J.R. and Ribbons D.W. (ed). Methods in Microbiology. Academic Press Inc., New York, USA. pp:117-132.

- Hungate, R. E. 1947. Studies on cellulose fermentation III. The culture and isolation for cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. *J. Bacteriol.* 53(5):631-645.
- Hungate, R. E. 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Can. J. Microbiol.* 3(2):289-311.
- Iwashita, S., T. P. Callahan, J. Haydu, and T. K. Wood. 2004. Mesophilic aerobic degradation of a metal lubricant by a biological consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(5):620-626.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01228-07.
- Johnson, R. y Kuby. 1999. Estadística Elemental. 2^a. edición. International Thomson Editores. México. D. F. pp:193-255.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Sci.* 89(1):124-135.
- Kato, Y., H. Onishi, and Y. Machida 2003. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Current Pharmaceutical. Biotechnol.* 4(5):303-309.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.* 45(1):114-122.
- Kobayashi, Y., R. J. Foster, and R. M. Teather. 2000. Development of a competitive polymerase chain reaction assay for the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156 and its use for tracking an OB156-derived recombinant. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:185-190.
- Kopečný J., and B. Hobrova. 1998. Chitinolytic enzymes in the rumen microbial ecosystem. *Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika.* 72:85-93.
- Kopečný, J., B. Hodrova, and C. S. Stewart. 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Let. Appl. Microbiol.* 23(3):195-198.
- Krause, D. O., and J. B. Russell. 1996. How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* 79(8):1467-1475.
- Lárez-Velásquez, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuáticos. *Rev. Iberoamericana. Polím.* 4(2):91-109.

- Lauková, A., P. Svec, V. Stropfova, V. Stetina, and I. Sedláček. 2007. Properties of the strains *Enterococcus* haemoperoxidos and *E. moraviensis*, new species among Enterococci. *Folia Microbiol.* 53(3):273-279.
- Long, A. M., and N. F. Haard. 1988. The effect of carotenoid-protein association on pigmentation and growth rates of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Bull. Aquacult. Assoc. Can. 88(4):98-100.
- Madigan, T. M., J. M. Martinco, y J. Parker. 2004. Brock Microbiología de los Microorganismos. 10^a ed. PEARSON, Prentice Hall. España. pp:167-230.
- Manero, A., and A. R. Blanch 2002. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *J. Microbiol. Meth.* 50(2):115-121.
- Mantilla, C. L. and G. C. Álvarez. (2002). New culture medium for isolation of ruminal microorganisms. *Arch. Zootec.* 51:401-404.
- Marcináková, M., M. Simonova, and A. Laukova. 2004. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. *Acta Vet. Brno.* 73:513-519.
- Mareková, M., A. Lauková, L. DeVuyst, M. Skaugen, and I. F. Nes. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.* (94):523-530.
- Mármol, Z., E. Gutiérrez, G. Páez, J. Ferrer, y M Rincón. 2006. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias* 4(2):1-10.
- Marti, A., M. J. Moreno-Aliaga, M. A. Zulet, y J. A. Martínez. 2005. Avances en nutrición molecular: nutrigénómica y/o nutrigénética. *Nutr. Hosp.* XX(3):157-164.
- Mateo-Sánchez, J. M., M. A. Cobos-Peralta, A. Trinidad-Santos, V. Cetina-Alcalá, and J. Vargas-Hernández. 2002. Isolation of ruminal sawdust-degrading bacteria. *Agrociencia* 36(5):523-530.
- Mathews, K. C., y K. E. Van Holde. 1998. *Bioquímica* 2^a ed. Mc Graw Hill-Interamericana. España. 1283 p.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim.* 17:297-304.
- Miura, H., H. Masaaki, and T. Matsumoto. 1980. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Magasphaera elsdenii* and *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:294-300.

- Miyajima, M., M. Matsuda, S. Haga, S. Kagawa, B. C. Millar, and J. E. Moore. 2002. Cloning and sequencing of 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) from urease-positive thermophilic Campylobacter (UPTC). Lett. Appl. Microbiol. 34:287-289.
- Mohammad, H. B. Z., R. G. Cuevas, V. G. Almanza, y J. L. Flores. 2005. Los indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en ecosistemas acuáticos y asociad. CULCyT. 2(6):4-17.
- Montgomery, M. T., and D. L. Kirchman. 1993. Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. Appl. Environ. Microbiol. 59(2):373-379.
- Morley, K. L., G. Chauve, R. Kazlauskas, C. Dupont, F. Shareck, and R. H. Marchessault. 2006. Acetyl xylan esterase-catalyzed deacetylation of chitin and chitosan. Carbohydrate Polymers 63:310-315.
- Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. 1999. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1774 p.
- Mutch, M. D. W. Wahli, and G. Williamson. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. The FASEB J. 19:1602-1616.
- Muzzarelli, R. A. A. 1973. Natural Chelating Polymers; Alginic Acid, Chitin, and Chitosan. International Series of Monographs in Analytical Chemistry, v. 55. Oxford: Pergamon Press. 83 p.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2007. National Library of Medicine National Institutes of Health Building 38A, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov. (25 Sep. 2007).
- Nicholson, J. W. G., R. E. McQueen, J. G. Allen, and R. S. Bush. 1996. Effect of mash of pelleted supplements containing crab meal on intake and weight gains of beef cattle. Can. J. Anim Sci. 76(1):95-103.
- No, H. K., S. P. Meyers, W. Prinyawiwatkul, and Z. Xu. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. J. Food Sci. 72(5):87-100.
- NRC. 1996. Nutrient Requirements of Domestic Animals, Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. National Academia of Science-National Research Council, Washington, D. C. 242 p.

- Olsen, M. A., A. S. Blix, T. Utsi, W. Sørmo, and S. D. Mathiesen. 2000. Chitinolytic bacteria in the minke whale forestomach. *Can. J. Microbiol.* 46(1):85-94.
- Orskov, E. R., D. A. Grubb, J. S. Smith, A. J. F. Websterand, and W. Corrigan. 1979. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep. *Brit. J. Nutr.* 41:451-551.
- Pace, N. R., G. J. Olsen, and C. R. Woese. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45(3):325-326.
- Parada, G. L., G. D. Crespín, R. Miranda, e I. Katime. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev. Iberoamericana de Polímeros* 5(1):1-16.
- Pattnaik, P., J. K. Kaushik, S. Grover, and V. K. Batish. 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *J Appl Microbiol.*:91(4):636-645.
- Patton, R. S., P. T. Chandler, and O. G. Gonzalez. 1975. Nutritive value of crab meal for young ruminating calves. *J. Dairy Sci.* 58(3):404-409.
- Pel, R. 1986. Mesophilic chitin-degrading anaerobes isolated from an estuarine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 38(1):39-49.
- Pel, R., G. Hessels, Han Aalfs, and J. C. Gottschal. 1989. Chitin degradation by *Clostridium* sp. strain 9.1 in mixed cultures with saccharolytic and sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 62(3):191-200.
- Pel, R., and J. C. Gottschal. 1989. Interspecies interaction based on transfer of a thioedoxin-like compound in anaerobic chitin-degrading mixed cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 62(6):349-358.
- Pel, R., and J. C. Gottschal. 1987. The effect of oxygen and sulfhydryl reagents on the hydrolysis and the fermentation of chitin by *Clostridium* 9.1. *FEMS Microbiol. Lett.* 44(1):59-62.
- Pérez, C. E., G. M. Mier, y A. Z. Rivera. 2005. Genómica nutricional: Perspectivas para el futuro. *Rev. Endocri. Nutr.* 13(4):190-196.
- Pérez-Sato, M. 2001. Elaboración de un inóculo de bacterias ruminales degradadoras de quitina en ovinos alimentados con caparazón de camarón. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Ganadería. Colegio de Posgraduados. Montecillo. Edo. de México. 57 p.

- Ponce-Palafox, J. T., O. R. Cruz, S. C. Vargasmachuca, P. A. Nochebuena, M. Ulloa-García, R. G. Sala, I. F. Toussaint, and H. E. Lea. 2006. The sustainable development of the acuicultura in Latin America. *Rev. Electro. Vet.* 7(7):1-16.
- Ravi-Kumar, M. N. V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46(1):1-27.
- Revah-Moiseev, S., and A. Carroad. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1067-1078.
- Rey, M. W., P. Ramaiya, B. A. Nelson, S. D. Brody-Karpin, E. J. Zaretsky, M. Tang, A. Lopez de Leon, H. Xiang, V. Gusti, I. G. Clausen, P. B. Olsen, M. D. Rasmussen, J. T. Andersen, P. L. Jørgensen, T. S. Larsen, A. Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Galleron, S. D. Ehrlich, and R. M. Berka. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5(10):1-12.
- Rezaeiana, M., G. W. Beakes, and A. S. Chaudhry. 2006. Effect of feeding chopped and pelleted lucerne on rumen fungal mass, fermentation profiles and *in sacco* degradation of barley straw in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128(3-4):292-306.
- Rodríguez, A., M. A. Esteban, A. Cuesta, J. Ortuño, J. Polaina, y J. Meseguer. 2002. Enriquecimiento del pienso de dorada con quitina y paredes de levaduras con fines preventivos. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4):119-125.
- Rojo-Rubio, R., G. D. Mendoza-Martínez, and M. M. Crosby-Galván. 2001. Use of thermostable amylase from *Bacillus licheniformis* on *in vitro* starch digestion of sorghum and corn. *Agrociencia* 35:423-427.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79(8):1503-1509.
- Sabry, S. A. 1992. Microbial degradation of shrimp-shell waste. *J. Basic. Microbiol.* 32(2):107-111.
- Saito, A., and L. W. Regier. 1971. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. *J. Fish Res. Can.* 28(4):509-512.
- Saito, Y., and H. Kumagai, M. Wada, and S. Kuga. 2002. Thermally reversible hydration of β -chitin. *Biomacromol.* 3(3):407-410.
- Sakurada, M, D. P. Morgavi, K. Komatani, Y. Tomita, and R. Onodera. 1996. Purification and characteristics of cytosolic chitinase from *Piromyces communis* OTS1. *FEMS. Microbiol. Lett.* 137(1):75-78.

- Sánchez, B. A., M. B. Sibaja, J. Vega-Baudrit, y S. C. Madrigal. 2007. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. Rev. Iberoam. Polim. 8(4):241-267.
- SAS System for Windows. 1998. User's Guide Statistics, SAS Inst. Inc. Cary North Carolina USA. 542 p.
- Sastoque-Cala, L., M. Mercado-Reyes, M. M. Martínez-Salgado, B. Quevedo-Hidalgo, and R. M. Pedraza-Rodríguez. 2007. Production of extracellular chitinases from alkalophilic moderately halophilic *Streptomyces* sp. isolated of shrimp waste. Rev. Mex. Ing. Quim. 6(2):137-146.
- Scandolo, D., M. Noro, H. Böhmwald, P. A. Contreras, and F. Wittwer. 2007. Diurnal variations of ruminal fluid pH and magnesium and potassium concentrations in grazing dairy cows. Arch. Med. Vet. 39(2):141-146.
- Seki, H., and N. Toga. 1963. Microbiological studies on the decomposition of chitin in marine environment-V chitinoclastic bacteria as symbionts. J. Oceanogr. Soc. Japan. 19(3):158-161.
- Seki, H., and N. Toga. 1965. Microbiological studies on the decomposition of chitin in marine environment-VI chitinoclastic bacteria in the digestive tracts of whales from the Atlantic Ocean. J. Oceanogr. Soc. Japan 20:272-277.
- Shahidi, F., and J. Synowiecki. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. J. Agric. Food Chem. 39:1527-1532.
- Shao, F., G. Liu, and J. Wen. 2006. Molecular Taxonomic Study on *Enterococcus faecium*. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=110293125 (5 Dic. 2007).
- Simonová, M., A. Lauková, and I. Štyriak. 2005. Enterococci from rabbits – potential feed additive. Czech J. Anim. Sci. 50(9):416–421.
- Spinelli, J., L. Lehman, and D. Wieg. 1974. Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. J. Fish. Res. Board Can. 31:1025-1029.
- Sugita, H., J. Kumazawa, and Y. Deguchi. 1996. Production of chitinase and β -N-acetylglucosaminidase by intestinal bacteria of Pinnipedian animals. Lett. Appl. Microbiol. 23(5):275-278.

- Sundset, M. A., K. E. Praesteng, I. K. Cann, S. D. Mathiesen, and R. I. Mackie. 2007. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microb Ecol.* 54(3):424-438.
- Svitil, L., A. and D. L. Kirchman. 1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glycanases. *Microbiology* 144:1299-1308.
- Swiontek, B. M., and D. Wojciech. 2006. Chitinolytic bacteria in two lakes of different trophic status. *Pol. J. Ecol.* 54(2):295-301.
- Tajima, F. and M. Nei. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1:269-285.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.1. *Mol. Biol. Evol.* 10.1093/molbev/msm092.
- Tanaka, N., M. Nakano, and S. Okada. 2007. 16S rRNA gene sequences of NRIC lactic acid bacteria strains. Published only in database. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=157907335 (25 Dic. 2007).
- Teather, R. M. 1982. Maintenance of laboratory stains of obligately anaerobic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2):499-501.
- Valadez, M. E. y G. Kahl. 2005. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. México D. F. 147 p.
- Velez, S. A., J. C. Allen, C. M. Keery, and R. W. Adkinson. 1991. Evaluation of crab and crawfish waste meals as protein sources for growing dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 74(1):234-242.
- Wang, L. T., F. L. Lee, C. J. Tai, and H. Kasai. 2007. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(8):1846-1850.
- Watkins, B. E., J. Adair, and J. E. Oldfield. 1982. Evaluation of shrimp and king crab processing by products as feed supplements for mink. *J. Anim Sci.* 55(3):578-589.
- Wolin, M. J., E. A. Wolin, and N. J. Jacobs. 1961. Cytochrome-producing anaerobic vibrio, *Vibrio succinogenes*, sp. n. *J. Bacteriol.* 81:911-917.

Yanagita, K., Y. Kamagata, M. Kawaharasaki, T. Suzuki, Y. Nakamura, and H. Minato. 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence *in situ* hybridization. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64:1737-1742.

Zikakis, J. P. 1984. Chitin, Chitosan and Related Enzymes. Academic Press, New York. pp: 7.