

Contribuciones en ciencias del mar

de la Universidad Nacional de Colombia

NÉSTOR HERNANDO CAMPOS
ARTURO ACERO PIZARRO
EDITORES



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Contribuciones
en ciencias del mar**
de la Universidad Nacional de Colombia

Contribuciones en ciencias del mar

de la Universidad Nacional de Colombia

**NÉSTOR HERNANDO CAMPOS CAMPOS
ARTURO ACERO PIZARRO**

EDITORES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE CARIBE
INSTITUTO DE ESTUDIOS EN CIENCIAS DEL MAR - CECIMAR

Bogotá, D. C., 2016

- © Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR
- © Néstor Hernando Campos Campos
Arturo Acero Pizarro
Editores
- © Jenny Consuelo Barrera, Brigitte Gavio y J. Ernesto Mancera-Pineda,
Ana María Alvarado-Laverde y Adriana Santos-Martínez, Paula Pabón Quintero
y Arturo Acero P., y Ana Milena Lagos, Edna Judith Márquez Fernández,
Juan Aicardo Segura Caro y Natalia Restrepo Escobar, Olga María Pérez Carrascal,
Magally Romero-Tabarez, Gloria Ester Cadavid Restrepo, Claudia Ximena Moreno Herrera
Autores varios

Colección Nación

Primera edición, agosto de 2016

ISBN 978-958-775-806-1 (papel)

Impreso:

Centro de Copiado SION

Calle 15 # 3 – 29, Tel: 4230097

Santa Marta

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Campos Campos, Néstor Hernando, 1955-

Contribuciones en ciencias del mar de la Universidad Nacional de Colombia /
Néstor Hernando Campos Campos, Arturo Acero Pizarro, editores. -- Primera
edición. -- Universidad Nacional de Colombia (Sede Caribe). Instituto de
Estudios en Ciencias del Mar (CECIMAR), 2016.

142 páginas : ilustraciones, diagramas, figuras, fotografías, mapas. --
(Colección nación)

Incluye referencias bibliográficas
ISBN 978-958-775-806-1 (papel).

1. Ciencias del mar 2. Ecología marina 3. Fauna marina -- Fisiología
4. Biología marina 5. Biotecnología marina 6. Genética animal 7. Microbiología
marina 8. Invasiones biológicas 9. Mar Caribe -- Colombia I. Acero Pizarro,
Arturo, 1954-, editor II. Título III. Serie

CDD-21 577.7301 / 2016

Citar obra completa como:

Campos, N. H. y A. Acero P. (eds.). 2016. Contribuciones en Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Colombia-2015. CECIMAR, Sede Caribe, Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta, 141 p.

Citar capítulo como:

Nombre de los autores. 2016. Nombre del capítulo. En: Campos, N. H. y A. Acero P. (eds.). 2016. Contribuciones en Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Colombia-2015. CECIMAR, Sede Caribe, Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta, 141 p.

Contenido

Presentación	9
Parte 1	
Aspectos ecológicos	11
Macroalgas asociadas al hábitat del gasterópodo <i>Cittarium pica</i> (Linneaus, 1758), en la isla de San Andrés, Colombia	15
<i>Jenny Consuelo Barrera, Brigitte Gavio y J. Ernesto Mancera-Pineda</i>	
Introducción	15
Materiales y métodos	17
Resultados	19
Discusión	25
Agradecimientos	25
Referencias	25
Cambios espacio-temporales de ensamblajes ícticos en arrecifes de la isla de San Andrés, Caribe colombiano	31
<i>Ana María Alvarado-Laverde y Adriana Santos-Martínez</i>	
Introducción	31
Área de estudio	32
Materiales y métodos	34
Resultados	35
Discusión	39
Conclusiones	43
Agradecimientos	44
Referencias	44
Ecología trófica del invasor pez león <i>Pterois volitans</i> en el Caribe colombiano: impacto sobre familias ícticas de Santa Marta y San Andrés	51
<i>Paula Pabón Quintero y Arturo Acero P.</i>	
Introducción	51
Métodos	52
Resultados	55
Discusión	62
Agradecimientos	66
Referencias	66

Anexo A	71
Teleósteos	71
Crustáceos	73
Moluscos	74
Parte 2	
Aspectos biológicos	75
Estudio comparativo de la fecundidad del cangrejo rey del Caribe <i>Damithrax spinosissimus</i> (Lamarck, 1818) entre poblaciones insulares oceánicas y continentales del Caribe colombiano	79
<i>Jenny Consuelo Barrera, Néstor Hernando Campos y Ana Milena Lagos</i>	
Introducción	79
Materiales y métodos	81
Resultados	84
Discusión	94
Agradecimientos	101
Referencias	101
Evaluación experimental de loci microsatélites en caracol pala <i>Strombus gigas</i> (Linnaeus, 1758) del Caribe colombiano	111
<i>Edna Judith Márquez Fernández, Juan Aicardo Segura Caro y Natalia Restrepo Escobar</i>	
Introducción	111
Materiales y métodos	112
Resultados	113
Discusión	114
Agradecimientos	115
Referencias	116
Detección de actividades enzimáticas extracelulares de bacterias marinas asociadas al caracol <i>Strombus gigas</i> (Linnaeus, 1758) del mar Caribe colombiano	123
<i>Olga María Pérez Carrascal, Magally Romero-Tabarez, Gloria Ester Cadavid Restrepo, Claudia Ximena Moreno Herrera</i>	
Introducción	123
Materiales y métodos	124
Resultados	129
Discusión	134
Referencias	136

Presentación

La Universidad Nacional de Colombia no ha sido ajena a la necesidad nacional de incrementar nuestro conocimiento científico del mar, por eso ha sido partícipe desde hace varias décadas de los adelantos en la generación de conocimiento marino en Colombia. Consciente de la importancia de divulgar el conocimiento sobre el mar que se genera en cada una de las sedes de la Universidad relacionadas con el medio y bajo el liderazgo del instituto CECIMAR de la sede Caribe, se organiza cada dos años un evento en el cual se presentan los avances de las investigaciones en el campo marino.

La primera reunión interna sobre Ciencias del Mar se realizó en diciembre de 2009 (“La Investigación en Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Colombia – 30 Años de la Biología Marina”), en la sede Caribe de la Universidad. Como producto de esta reunión, se publicó el volumen 14 de la serie Cuadernos del Caribe de la sede. A finales de 2014 se realizó en Bogotá el 4° Seminario: Las Ciencias del Mar en la Universidad Nacional de Colombia; se recopilaron varios trabajos presentados durante el desarrollo del mismo, que no han sido aún publicados en otros medios, y se incluyeron en el presente volumen.

Esperamos que esta contribución aumente la difusión del conocimiento sobre el mar, fruto del quehacer académico dentro de la Universidad, y estimule con ello a investigadores en formación a profundizar en el estudio de la aun vasta riqueza ecosistémica marina colombiana. Solo a partir del conocimiento científico se puede llegar a la protección y adecuado uso de los mares.

Néstor Hernando Campos C.

Arturo Acero P.

Editores

Parte 2

Aspectos biológicos

Detección de actividades enzimáticas extracelulares de bacterias marinas asociadas al caracol *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) del mar Caribe colombiano

Olga María Pérez Carrascal, Magally Romero-Tabarez,
Gloria Ester Cadavid Restrepo, Claudia Ximena Moreno Herrera

Resumen

Las enzimas como amilasas y proteasas participan como catalizadores biológicos necesarios para la continuidad de los ciclos biogeoquímicos, éstas constituyen parte de la maquinaria bioquímica de organismos eucariotas y procariotas. El objetivo de este estudio fue seleccionar cepas bacterianas aisladas del caracol pala (*Strombus gigas*) por su capacidad para producir hidrolasas extracelulares. Los resultados indicaron que los aislados bacterianos poseen la capacidad de degradar sustratos como almidón, celulosa, lípidos y proteínas. El 67% de las cepas evaluadas pertenecientes a los géneros *Psychrobacter* sp., *Halomonas* sp., y *Exiguobacterium* sp., exhibieron actividad hidrolasa, donde 49% de las cepas presentaron actividad proteasa y 37% actividad lipasa. En el texto se plantean las posibles implicaciones de la importancia de estas bacterias en los procesos fisiológicos de su hospedero. En nuestro conocimiento este es el primer trabajo reportado sobre la actividad enzimática de cepas bacterianas del caracol pala *S. gigas* del mar Caribe colombiano.

Palabras clave: Bacterias marinas, Caracol pala, Enzimas hidrolasas, *Psychrobacter* sp., *Exiguobacterium* sp.

Screening for extracellular enzyme activities by bacteria isolated of conch *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) from Colombian Caribbean Sea

Abstract

Enzymes like amylases and proteases act as biological catalysts and are essential for the continuity of biogeochemical cycles; they make part of the biochemical machinery in organism eukaryotes and prokaryotes. The aim of this study consisted in to evaluate the extracellular enzymatic activity in bacterial strains isolates from queen conch (*Strombus gigas*). The results showed that the bacterial isolates are able to degrade starch, cellulose, lipids, and proteins. The strains tested belong to the genera *Psychrobacter*, *Halomonas*, and *Exiguobacterium* and the 67% exhibited amylase activity, while a 49% and 37% showed protease and lipase activities respectively. This study raises the question about the possible biological implications and importance of these bacteria in the physiological processes of the host. To our knowledge this is the first work reported on the enzymatic activity of bacterial strains of the queen conch *S. gigas* from Colombian Caribbean Sea.

Keywords: Marine bacteria, Queen conch, Hydrolase enzymes, *Psychrobacter* sp., *Exiguobacterium* sp.

Detección de actividades enzimáticas extracelulares de bacterias marinas asociadas al caracol *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) del mar Caribe colombiano¹

Olga María Pérez Carrascal, Magally Romero-Tabarez,
Gloria Ester Cadavid Restrepo, Claudia Ximena Moreno Herrera²

Introducción

Organismos marinos como algas, cianobacterias, protozoarios e invertebrados marinos mantienen relaciones de simbiosis y cooperación altamente específicas en un delicado equilibrio (Hentschel *et al.*, 2002). Las superficies y los espacios internos de los invertebrados marinos como los moluscos son ricos en nutrientes al igual que el mar y los sedimentos donde habitan, además constituyen un nicho único para el aislamiento de bacterias marinas que son fuentes promisorias para el descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos y enzimas.

El caracol pala es un molusco de gran importancia ecológica y socioeconómica y habita en las aguas de las costas del mar Caribe (Brownell y Stevely, 1981); es una especie amenazada con una microbiota poco explorada. El continuo decline de esta especie y el limitado éxito del cultivo acuícola provocó que fuese clasificada en el apéndice II de la Convención Internacional del Comercio de Especies de Fauna y Flora Silvestre en Peligro (CITES) en 1992, para prevenir su extinción. Se han implementado estrategias para la conservación y la restauración de las poblaciones pero el éxito ha sido limitado. Estudios en ecología microbiana han permitido elucidar algunos aspectos de la composición de la microbiota del caracol en diferentes entornos y son pioneros para empezar a entender las interac-

1 Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia, proyecto DIME 20101007734 y 201010011106.

2 Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Laboratorio de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Calle 59A No 63-20 - Núcleo El Volador Bloque 21-332, Medellín, Colombia. cxmoreno@unal.edu.co.

ciones entre el huésped y sus simbioses, y las propiedades metabólicas de los aislados bacterianos recuperados (Acosta *et al.*, 2009).

El sistema digestivo del caracol pala debe ser eficiente en la degradación de polisacáridos, proteínas y lípidos; se desconoce el acople y la participación de las enzimas extracelulares liberadas por los simbioses en los procesos metabólicos del caracol, a pesar de que estudios previos describen la importancia de las hidrolasas extracelulares en el cultivo acuícola de otros moluscos (Viana, 2002). Las hidrolasas bacterianas también se han vinculado con procesos de nutrición en organismos marinos (Tanu *et al.*, 2012) ciclos biogeoquímicos y transformación de materia orgánica (Sree, 2003; Dang *et al.*, 2009).

En este estudio se evaluó la presencia de hidrolasas extracelulares en aislados bacterianos del caracol por métodos cualitativos y cuantitativos y se discutió sobre las implicaciones de las actividades amilasas, proteasas, celulasas y lipasas, en los procesos fisiológicos y de digestión del caracol pala del Caribe colombiano como han reportado previamente para otros crustáceos y moluscos (Sawabe *et al.*, 1995; Ahmadnia Motlagh *et al.*, 2012). El conocimiento más detallado sobre la actividad enzimática de las bacterias asociadas a *S. gigas* será útil para el desarrollo de estrategias acuícolas y de conservación del caracol.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

En el estudio se seleccionaron 57 aislados bacterianos obtenidos de la microbiota del caracol pala, los cuales fueron mantenidos en medio agar marino (Difco) a temperatura ambiente e identificados por la secuencia del producto amplificado del gen *DNAr 16S* (Carrascal *et al.*, 2014). El estudio comprendió las muestras para la investigación del Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt” IavH-BT 12908-12911. Se obtuvieron todos los permisos necesarios de las autoridades nacionales para el estudio: Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados para Investigación Científica sin Interés Comercial, RGE0073-07 (Resolución No 0430 Feb 25 2015).

Detección de hidrolasas extracelulares

Determinación de amilasas. La presencia de cepas productoras de amilasa fue determinada sobre un medio de cultivo constituido por agar 12 g/L, caldo nutritivo 3 g/L y almidón soluble 10 g/L preparado en agua estéril de mar, con un pH inicial de 7.2. Después de la incubación a temperatura ambiente por 48 h, las placas de hidrólisis se revelaron con una solución de lugol (I2 -0.3% KI-0.6%). Un halo claro alrededor de la colonia indicaba la presencia de actividad amilasa de acuerdo con Rohban *et al.* (2009).

Determinación de celulasas. La actividad celulasa de las bacterias fue determinada sobre un medio de cultivo constituido por extracto de levadura 2 g/L, agar 20g/L y carboximetil celulosa (CMC) 10 g/L, preparado en agua estéril de mar, con un pH inicial de 7.2. Después de una incubación por 48 hr, las placas se revelaron con una solución de lugol (I2 -0.3% KI-0.6%); un halo claro alrededor de la colonia sugería la presencia de CM-Casa (carboximetil celulosa) (Kasana *et al.*, 2008; Rohban *et al.*, 2009).

Determinación de proteasas. La producción de proteasas en las bacterias fue determinada usando dos medios de cultivo: uno con caseína como sustrato y el otro con gelatina, el primer medio de cultivo estaba constituido por agar 15 g/L, caldo nutritivo 5 g/L, leche descremada 100 g/L y NaCl 20 g/L, con un pH inicial de 7.2 preparado en agua destilada. Un halo claro alrededor del sitio de crecimiento después de siete días de incubación a temperatura ambiente indicaba actividad proteolítica de acuerdo con Rohban *et al.* (2009).

El segundo medio de cultivo permitió determinar la actividad gelatinasa y estaba constituido por 120 g/L de gelatina, caldo nutritivo 8 g/L y NaCl 20 g/L, preparado en agua destilada (Lanyi, 1988). La licuefacción de la gelatina después de siete días de incubación a temperatura ambiente indicaba actividad gelatinasa.

Determinación de lipasas. Para determinar la producción de lipasas las cepas fueron cultivadas sobre placas de agar lipasa con una solución de reactivo lipasas. El agar lipasa estaba compuesto por triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 20 g/L, azul de anilina 0.15 g/L; y el reactivo de lipasa con 100 mL de aceite de oliva, 1 mL de polisorbato 80 y 400 mL de agua destilada (Frank *et al.*, 2004). 30 mL del reactivo de lipasas fueron adicionados a un litro de agar lipasas con un pH inicial de 6.8-7.0. Un halo claro alrededor de las colonias después de 72 h de incubación a tempera-

tura ambiente evidenciaba la presencia de cepas productoras de lipasas de acuerdo con Frank *et al.* (1993). Para los ensayos de actividad amilolítica, celulolítica y proteolítica se usó como control positivo una cepa de *Bacillus subtilis*, mientras que para la determinación de la actividad lipolítica se usó como control positivo una cepa *Staphylococcus aureus*.

Evaluación de las actividades enzimáticas

Actividad amilasa. Para los aislados con actividad amilasa se prepararon preinóculos de 1 ml de volumen en medio de cultivo líquido para la producción de amilasas (almidón soluble 20g/l, extracto de carne 10 g/l, extracto de levadura 2 g/l, K_2HPO_4 2 g/l, $CaCl_2$ 0.2 g/l y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/l pH 7.0); los preinóculos fueron incubados durante toda la noche a 30 °C, posteriormente, 0.1 ml de los preinóculo con densidades ópticas cercanas a 0.8, se usaron para inocular por separado 4 ml del mismo medio de cultivo, los cultivos se incubaron a 30 °C, 150 rpm por 48 h. Las células y el material insoluble se removieron por centrifugación a 5000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante libre de células se usó para determinar la actividad amilasa. La actividad amilasa fue evaluada de acuerdo con Bernfeld (1955), se usó almidón soluble como sustrato. La mezcla de la reacción contenía 125 μ l del extracto crudo enzimático y 125 μ l de almidón soluble (10 g/l) disuelto en buffer de fosfato 0.1 M a pH 7. La mezcla de la reacción se incubó por 30 minutos a 30 °C. La reacción fue detenida adicionando 250 μ l de solución de 3.5-ácido dinitrosalicílico (DNS), seguido del calentamiento en baño de agua a 100 °C por 5 min y posterior incubación en un baño con hielo, la absorbancia de cada solución fue medida a 540 nm en un fotómetro para micro placas Multiskan EX (Miller, 1959).

Con el fin de medir la cantidad de azúcares reductores liberados, se hizo una curva estándar de glucosa con diferentes concentraciones (0.01 – 0.05 – 0.1 – 0.2- 0.4- 0.6 – 0.8 – 1.0 – 1.2 – 1.6 -1.8 g/l) que se trataron como se describe previamente con DNS. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Actividad celulasa. El preinóculo correspondiente de las cepas a evaluar fue preparado en medio sólido para la producción de celulasas (carboximetil celulosa (CMC) 10 g/l, extracto de levadura 2 g/l, agar 20 g/l y NaCl 20 g/l. El pH 7.0), una colonia de las placas fue inoculada en un tubo de

ensayo con 5 ml del medio líquido para la producción de celulasas, e incubado a 30 °C, a 150 rpm por 48 hr. Las células y el material insoluble se removieron por centrifugación a 5000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante libre de células se usó para evaluar la actividad celulasa.

La mezcla de la reacción contenía 125 µl del extracto enzimático más 125 del sustrato (CMC 0.5% P/V) solubilizado en buffer de fosfato 100 mM, pH 7.0 (Bailey *et al.*, 1992). Esta mezcla se incubó por 30 min a 30 °C y la reacción se detuvo mediante la adición de 250 µl DNS (Miller, 1959), seguido del calentamiento en baño de agua a 100 °C por 5 min y la posterior incubación en un baño con hielo; la absorbancia de cada solución fue medida a 540 nm en un fotómetro para microplacas (Multiskan ® EX, ThermolabSystem). La curva estándar fue realizada como se describe previamente para amilasas.

Actividad proteasa. Para evaluar la actividad proteasa por los aislados se usó un medio cultivo compuesto de extracto de levadura 5 g/l, peptona 10 g/l, glucosa 0.5 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, MgSO₄ 0.2 g/l y NaCl 20 g/l (Kuddus y Ramteke, 2011). La preparación de los preinóculos se hizo en caldo marino y se incubaron por 18 horas, tubos de ensayo de 20 ml con 5 ml de medio para la producción de proteasas fueron inoculados con 200 µl de los preinóculos e incubados a 30 °C, 150 rpm por 72 hr. Las células y el material insoluble fueron removidos por centrifugación a 10000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante libre de células se usó para probar la actividad.

La actividad proteolítica fue medida por el método de Lowry. La mezcla de la reacción contenía 50 µl del extracto crudo enzimático, 250 µl de caseína 0.65 % (P/V) disuelta en buffer de fosfato (50 mM) a pH 7. La reacción fue incubada durante 30 min en baño maría a 30 °C y terminada por la adición de 250 µl de ácido tricloro acético (TCA) 0.6 N, la reacción fue incubada de nuevo por 20 minutos a 37 °C, y posteriormente se centrifugó a 10000 g por 10 min a 4 °C. 250 µl del sobrenadante más 625 µl de Na₂CO₃ (500 mM) y 125 µl del reactivo Folin fueron mezclados e incubados a 37 °C por 30 minutos. La absorbancia fue medida contra un blanco (muestra no incubada) a 660 nm. Una unidad de actividad proteasa está definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar el equivalente de µmol de tirosina por minuto, bajo las condiciones definidas del ensayo.

Una solución stock de tirosina (1.1 mM) se preparó usando 0.2 mg/ml de L-tirosina en agua destilada estéril calentando suavemente hasta disolver.

A partir de esta solución se prepararon las siguientes diluciones 0.000 – 0.022 – 0.044 – 0.110 – 0.220 – 0.440 – 0.660 mM para crear la curva estándar.

Actividad lipasa. Esta técnica está basada en el protocolo publicado por Hasanuzzaman (2004). De caldos de cultivo crecidos durante toda la noche a 30 °C, se tomaron 0.1 ml para inocular 5 ml de medios para la producción de lipasas (10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, aceite de oliva 10 ml y glucosa 5 gr/l, pH 7.0) que fueron incubados a 30 °C y 150 rpm por 48 hr. Las células y el material insoluble se separaron por centrifugación a 6000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante libre de células fue usado para los ensayos de actividad lipasa,

La lipasa extracelular se evaluó por un método espectrofotométrico usando p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) (Sigma-Aldrich) como sustrato en el que se mide la hidrólisis de p-NPP por las lipasas, para liberar p-nitrofenol. 250 µl de buffer de fosfato 50 mM (pH 7.0) más 200 µl del extracto crudo enzimático fueron mezclados e incubados a 30 °C por 2 minutos. 50 µl de 2.5 mM de p-NP (disuelto en 2-propanol) fue adicionado sobre la mezcla e incubado a 30 °C por 30 minutos. Después de la incubación la mezcla se enfrió en agua con hielo, y la reacción fue terminada con la adición de 100 µl de 0.5 M de KOH. La actividad de lipasa fue determinada en función del incremento de la absorbancia medida a 405 nm.

Una unidad de lipasa está definida como los µmoles de p-NP liberado por minuto. Una unidad de actividad es expresada como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de p-NP por minuto. Una curva estándar fue preparada usando las siguientes concentraciones de p-NP: 2 - 4 - 10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 µM.

Cuantificación de proteínas en los extractos crudos enzimáticos. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo con el método de Bradford (1976). 250 µl del reactivo de Bradford (Amresco) fueron añadidos a 50 µl de la muestra y la absorbancia fue medida después de 5 minutos a 620 nm. Diferentes concentraciones (0.03125 – 0.0625 – 0.125 – 0.25 – 0.5 – 0.75 – 1.0, mg/ml) de BSA fueron usadas para crear la curva estándar. Todos los ensayos de evaluación de actividad enzimática y cuantificación de proteínas se hicieron por triplicado.

Resultados

Actividad enzimática en aislados bacterianos asociados al caracol

Se evaluaron cinco sustratos diferentes en 57 aislados (figura 1). El 66.66% de los aislados evaluados registró actividad enzimática para al menos uno de los sustratos evaluados, los resultados de la actividad se muestran en la tabla 1.

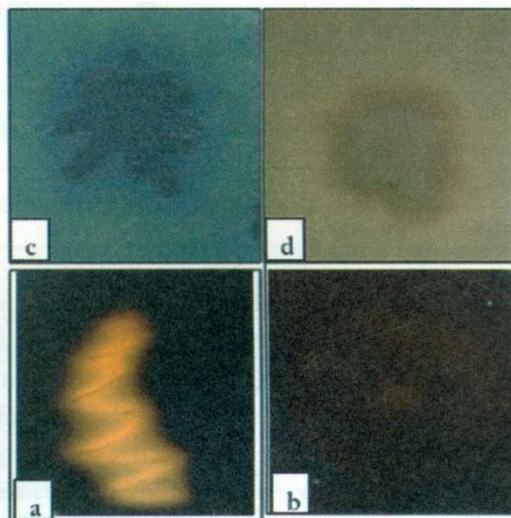


Figura 1. Actividades enzimáticas de aislados bacterianos en placas de agar evidenciadas por formación de halo alrededor de la colonia. a) Hidrólisis de lípidos por cepa 3CpBB10. b) Hidrólisis de caseína por cepa 22CpB4. c) Hidrólisis del almidón por cepa 27CpO117 d) Hidrólisis de la celulosa por cepa 1CpB10.

Tabla 1. Aislados bacterianos y sus correspondientes actividades enzimáticas

Género relacionado*	Aislados	Número de acceso al GenBank	Actividades enzimáticas				
			Amilasa	Proteasas		Celulosa	Lipasa
				Gelatina	Caseína		
<i>Psychrobacter sp.</i>	18CpOB10	JN602247	-	+	-	-	-
	3CpBB10	JN602223	-	-	+	-	+
	10CpBB10	JN602217	-	-	+	-	+
	2CpBB11	JN602214	-	-	-	-	+

Género relacionado*	Aislados	Número de acceso al GenBank	Actividades enzimáticas				
			Amilasa	Proteasas		Celulasa	Lipasa
				Gelatina	Caseína		
<i>Psychrobacter sp.</i>	3CpBB11	JN602220	-	-	+	-	-
	8CpBB11	JN602216	-	-	+	-	-
	1CpBB14	JN602222	-	-	+	-	-
	2CpBB14	JN602232	-	-	+	-	+
	6CpBB14	JN602234	-	-	-	-	+
	8CpBB14	JN602233	-	-	-	-	+
	4CpBB13	JN602215	-	-	-	+	-
	19CpB3	JN602246	+	-	-	-	-
	25CpB1	JN602244	-	-	-	-	+
	3CpB4	JN602226	-	-	+	-	-
	10CpB4	JN602227	-	-	+	-	-
	1CpBA3	JN602235	-	-	+	+	-
	24CpOI15	JN602254	-	-	+	-	+
	28CpOI15	JN602243	-	-	+	-	-
<i>Psychrobacter celer</i>	1CpBB10	JN602224	-	-	+	-	-
<i>Halomonas sp.</i>	22CpB4	JN602238	+	+	+	+	-
	1CpB10	JN602228	-	-	+	+	-
	5CpOI8	JN602239	-	-	+	-	-
	26CpOI8	JN602237	+	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium sp.</i>	3CpB19	JN602229	+	-	+	-	+
	5CpB19	JN602253	+	-	+	-	+
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	27CpOI17	JN602236	+	-	+	-	-
	1CpBB12	Ni	-	-	+	-	+
	2CpBB13	Ni	-	-	+	-	+
	3CpBB12	Ni	-	-	-	-	+
	1CpBB13 1	Ni	-	-	+	-	+
	3CpBB13 2	Ni	-	-	+	-	+
	1CpBA5	Ni	-	-	+	-	+
	4CpBA5	Ni	-	-	+	+	+

Género relacionado*	Aislados	Número de acceso al GenBank	Actividades enzimáticas				
			Amilasa	Proteasas		Celulasa	Lipasa
				Gelatina	Caseína		
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	2CpBI9	Ni	-	-	+	+	+
	2CpBI7	Ni	-	-	+	-	+
	5CpBI8	Ni	-	-	+	-	+
	8CpME9	Ni	-	-	-	-	+
	Cp7	Ni	-	-	+	-	-

(+): Presencia de actividad, (-) ausencia de actividad

Ni: No identificado

*Datos referenciados Carrascal (2014).

El 50% de los aislados registró múltiples actividades hidrolasas (una cepa con cuatro actividades, cuatro cepas con tres y 14 cepas dos actividades hidrolíticas diferentes), mientras que el 50% (19 cepas) solo una actividad hidrolasas. El 49% de los aislados exhibió actividad proteasa y el 37% actividad lipasa, el 14% restante no presentó actividad. El número de cepas identificadas dentro de los géneros *Halomonas* sp. *Psychrobacter* sp. y *Exiguobacterium* sp. que mostraron actividad de hidrolasas extracelulares se muestra en la figura 2.

Evaluación de la actividad de hidrolasas extracelulares

Actividad amilasa. En el experimento previo sobre el análisis cualitativo de la producción de amilasas de 57 aislados que fueron crecidos sobre agar almidón, seis formaron un halo claro alrededor del sitio de crecimiento, los cuatro con el halo de mayor tamaño fueron seleccionados para evaluar la actividad amilasa. Para la evaluación de la cantidad de azúcares reductores liberados por las amilasas se construyó una curva estándar de glucosa tal como se describe previamente en los métodos. El aislado 27CpOI17 caracterizado como *Exiguobacterium arabatum*, y los aislados 3CpBI9 y 5CpBI9 caracterizados como *Exiguobacterium* sp., (tabla 1) después de 48*hr de incubación a 30 °C registraron actividades amilolíticas, sin embargo, la cepa de *E. arabatum* registró una mayor producción (4.2 U) con valores cercanos a los registrados por *B. subtilis* (5.3 U) en las condiciones evaluadas (tabla 2).

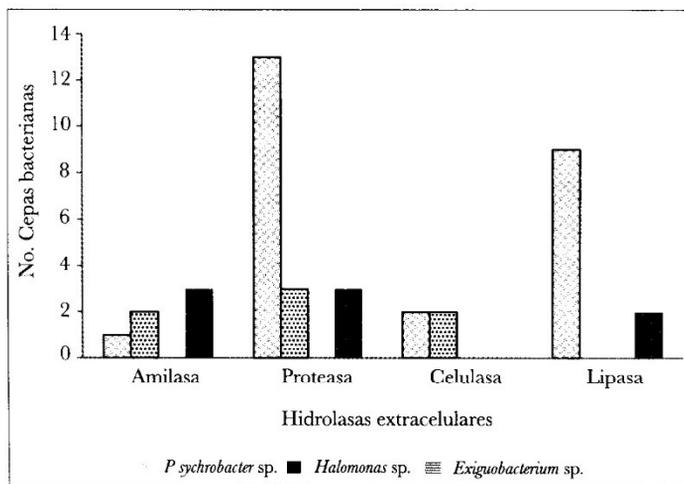


Figura 2. Número de cepas identificadas con actividad de enzimas hidrolíticas.

Tabla 2. Actividad e hidrolasas extracelulares de aislados bacterianos asociados al caracol pala

Actividad	Aislado	*Proteínas totales (mg) ^a	Actividad (U)	^{b/c/d} Actividad específica (U/mg de proteína)
Amilasa	<i>Halomonas</i> sp. Ceba 26CpOI8	0,0897	1,020 ± 0,078	11,376
	<i>Exiguobacterium arabatum</i> . Ceba 27CpOI17	0,0701	4,185 ± 0,754	59,305
	<i>Exiguobacterium</i> sp. Ceba 3CpBI9	0,1043	3,040 ± 0,445	29,148
	<i>Exiguobacterium</i> sp. Ceba 5CpBI9	0,0702	2,144 ± 0,058	30,539
	CBs	0,0785	5,371 ± 0,2278	68,404
Proteasa	<i>Psychrobacter celer</i> Ceba 1CpBB10 Uncultured.	0,0764	1,0146 ± 0,0010	0,1914
	<i>Psychrobacter</i> sp. Ceba 3CpBB11	0,0581	1,0392 ± 0,0163	1,1428
	<i>Exiguobacterium</i> sp. Ceba 5CpBI9	0,0343	1,0204 ± 0,0114	1,0901
	<i>Psychrobacter</i> sp. Ceba 7CpME8	0,0243	1,0425 ± 0,0005	1,7534
	CBs	0,039	1,4331 ± 0,0370	11,1

Actividad	Aislado	^a Proteínas totales (mg) ^a	Actividad (U)	^{b/c/d} Actividad específica (U/mg de proteína)
Lipasa	<i>Psychrobacter</i> sp. Cepa 8CpME9	0,0755	11,20 ± 5,3	148,45
	<i>Psychrobacter</i> sp. Cepa 24CpOI15	0,1169	5,4 ± 2,0	46,54
	<i>Psychrobacter</i> sp. Cepa 25CpB1	0,2065	7,10 ± 3,3	34,4
	<i>Psychrobacter</i> sp. Cepa 10CpBB10	0,191	16,22 ± 8,4	84,92
	<i>Psychrobacter</i> sp. Cepa 3CpBB10	0,0979	15,23 ± 2,7	155,52
	<i>Exiguobacterium</i> sp. Cepa 5CpB19	0,0556	9,28 ± 4,9	166,88
	<i>C.Sa</i>	0,0864	5,05 ± 2,3	58,45

^a Las proteínas fueron medidas por el método de Bradford. ^b Unidades de actividad enzimática μ moles de glucosa/ mg de proteína* minuto. ^c Unidades de actividad enzimática μ moles de tirosina/ mg de proteína* minuto. ^d Unidades de actividad enzimática μ moles de p-nitrofenol / mg de proteína* minuto \pm Error estándar, (N=3).

Actividad proteasa. La formación de un halo claro alrededor de las colonias en medio de cultivo con caseína fue observado en 28 aislados. Las cepas con mayor halo de hidrólisis (siete aislados) fueron seleccionadas para medir la producción y la actividad proteasa. Se elaboró una curva estándar de L-tirosina para hacer la medición de la actividad proteasa en unidades de tirosina liberada. Los resultados presentados en la tabla 2, revelan actividades inferiores a las registrados por el *B. subtilis*. Tres aislados presentaron actividades mayores a 1 U/mg y el aislado 7CpME8 identificado como *Psychrobacter* sp. exhibió la mayor actividad proteasa (1.7 U/mg).

Actividad lipasa. Usando un medio de cultivo para la producción de lipasas, se llevó a cabo la preparación de los extractos crudos enzimáticos para ocho de los 11 aislados bacterianos, que habían evidenciado inicialmente actividad lipolítica cualitativa. Seis extractos enzimáticos presentaron actividad lipolítica extracelular usando el sustrato de para-nitrofenil palmitato (p-NPP) (tabla 2). Para realizar la cuantificación de las lipasas se elaboró una curva estándar de p-nitrofenil como se describe en los métodos. Tres cepas presentaron actividades superiores a 140 U/mg, que corresponden a el aislado 5CPB19 *Exiguobacterium* sp. con 167 U/mg y los aislados 8cpME9 y 3CpBB10 de *Psychrobacter* sp. con 149 y 155 U/mg, respectivamente.

Todas las curvas estándar de actividad amilasa, proteasa, celulasa y lipasa mostraron un $R^2 = 0.99$. Para comparar en este estudio la actividad de las hidrolasas de los aislados con enzimas comerciales se usaron, la α -amilasa y Proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma-Aldrich). En los resultados se muestra que la actividad de estas enzimas es notoriamente superior a las de los extractos enzimáticos evaluados.

La actividad de la enzima comercial evaluada es equivalente a 250 U/g. Cuando concentraciones superiores a 100 U/g fueron evaluadas, los valores de las absorbancias permanecieron iguales, lo cual se puede explicar por el consumo completo de la cantidad de almidón en una solución al 1% (P/V) y por que tan solo una unidad de almidón de la enzima comercial puede degradar 5.26 g de almidón seco por hr.

Discusión

La microbiota bacteriana y sus hospederos interactúan manteniendo un adecuado balance, en algunos casos ocurre complementación metabólica entre el hospedero y su invitado; la microbiota aporta metabolitos de interés para el huésped y viceversa. En el caso del caracol pala, la microbiota podría ser vinculada a su adecuación biológica, tal como se ha descrito en otros organismos marinos y sus endosimbiontes. El estudio de las propiedades enzimáticas de las bacterias asociadas al caracol permite hipotetizar sobre los posibles beneficios de estas enzimas al huésped, así como también dilucidar sobre fuentes potenciales de enzimas hidrolasas no descritas. En este trabajo se evaluaron las actividades hidrolíticas (amilasas, lipasas, proteasas y celulasas) de 57 cepas de la microbiota del caracol pala utilizando cinco sustratos diferentes. Existen estudios que muestran como la microbiota desempeña un papel en la digestión de peces y otros animales marinos lo cual acelera el proceso de digestión mediante la producción de enzimas extracelulares (Stickney y Shumway, 1974; Lesel *et al.*, 1986; Rimmer y Wiebe, 1987; Cahill, 1990; Ringø *et al.*, 1995; Grisez *et al.*, 1997).

La dieta de los moluscos es uno de los requisitos que debe cumplir con una alta digestibilidad a fin de satisfacer sus necesidades energéticas basales y este requisito es uno de los desafíos para la industria de la acuicultura en la actualidad (Silva y Riquelme, 2011). Diferentes estudios en moluscos como el avalon, revelan una dependencia de la actividad de las enzimas digestivas y de bacterias con actividad exoenzimática para la mejora de la digestibi-

lidad de microalgas y macroalgas que aumentan la tasa de crecimiento del molusco (Tomoo Sawabe *et al.*, 2003; Daume, 2006; Macey y Coyne, 2006). La evaluación de la capacidad de las bacterias del caracol para degradar un sustrato es importante en la comprensión de la nutrición y fisiología del organismo huésped y puede ayudar en la formulación del alimento y las enzimas necesarias para el cultivo de la especie. Sin embargo, el papel nutricional desempeñado por estas bacterias todavía no es claro.

En este estudio, bacterias aisladas de la microbiota del caracol pala mostraron habilidades de degradación de sustratos como caseína, gelatina, lípidos y almidón; actividades que no habían sido descritas. De las bacterias caracterizadas como *Psychrobacter* sp., *Halomonas* sp., y *Exiguobacterium* sp., 66.7% registró actividad enzimática (figura 2). El 28.12% de las cepas tipo *Psychrobacter* producen lipasas. La abundancia de bacterias que secretan lipasas puede estar vinculada a la alimentación del caracol pala a través del suministro de ácidos grasos esenciales. El caracol pala se alimenta de una variedad de algas y microalgas, en las cuales la presencia de ácidos grasos puede ser alta; existen reportes en organismos marinos en los que se relaciona la presencia de ácidos grasos con un óptimo crecimiento y la supervivencia del organismo (Chang y Southgate, 2001).

La mayoría de los aislados de la microbiota del caracol pala puede degradar una variedad de sustratos, 40.6% y 3.3% de las cepas caracterizadas como *Psychrobacter* producen proteasas con caseína y gelatina como sustrato respectivamente, estas bacterias tendrían un papel importante en la mejora de la digestibilidad de los alimentos y permitiría que los nutrientes estén disponibles para el caracol.

Las cepas con actividad amilasa caracterizadas como *Halomonas* sp. *Psychrobacter* sp. y *Exiguobacterium* sp., recuperadas de la microbiota de intestinos y de baba, serían de gran importancia fisiológica para el caracol pala (Ahmadnia Motlagh *et al.*, 2012) por su dieta compuesta de algas, las cuales son ricas en polisacáridos (Harris, 1993). Orozco (2009) reportó el aislamiento de cepas de *Exiguobacterium mexicanum* a partir del tracto intestinal de organismos marinos, encontrando que estas bacterias aumentarían la disponibilidad de nutrientes al actuar sobre el alimento. La biomasa de todas las bacterias aisladas del intestino podría ser fuente de proteínas esenciales para el desarrollo del caracol (Gorospe, Nakamura, Abe, and Higashi, 1996; Harris, 1993), además de incrementar su resistencia a patógenos intestinales (Gatesoupe, 1999). Las cepas caracterizadas como *Oceanobaci-*

llus sp. JN602242 y *Micrococcus* sp. JN602241 no evidenciaron actividades hidrolíticas (los datos no se muestran). *Exiguobacterium arabatum* (27CpOI17) y *Exiguobacterium* sp. (5CpBI9), registraron actividad amilolítica. Estas especies no han sido reportadas previamente como productoras de amilasas, sin embargo, algunos miembros de este género expresan amilasas y lipasas en medios alcalinos (Lee *et al.*, 2009). Más específicamente, Las pululanasas (EC 3.2.1.41) que hacen parte de la familia de las 13 glicosil hidrolasas, la cual es llamada también familia de las α -amilasas, han sido aisladas de microorganismos pertenecientes al género *Exiguobacterium* (Salleh *et al.*, 2006). En cuanto a la producción de enzimas proteolíticas, las bacterias del género *Psychrobacter* han sido inusualmente descritas como productoras de proteasas y en el caso de *Exiguobacterium* su actividad proteolítica esta apenas comenzado a ser comprendida (Hinsa-Leasure *et al.*, 2010).

Conocer el funcionamiento y la importancia de la microbiota del caracol y sus derivados, podrían ayudar a mejorar en la formulación de alimentos para la cría o cultivo a gran escala, una de las dificultades relacionadas con este organismo en peligro de extinción. Además, los aislados que mostraron una actividad multienzimática podrían ser una buena fuente para el desarrollo de probióticos.

La composición de la producción de la enzima de la flora bacteriana en el tracto digestivo de peces se correlaciona con sus hábitos de alimentación, algunos autores informan que peces herbívoros no poseen celulasas endógenas y podría tomar la actividad celulasa y amilasa de las bacterias asociadas a su alimentación o de su microbiota (Fish, 1951; Yokoe y Yasumasu, 1964). En conclusión, los resultados del presente estudio tienen importancia en las estrategias que puedan ser tomadas para el cultivo del caracol pala en el Caribe colombiano, respecto al manejo de la alimentación y su preservación. Estos resultados no son específicos para el caracol pala, sin embargo, proporciona la visión inicial del análisis de las capacidades de degradación de los principales grupos de bacterias asociadas al caracol pala.

Referencias

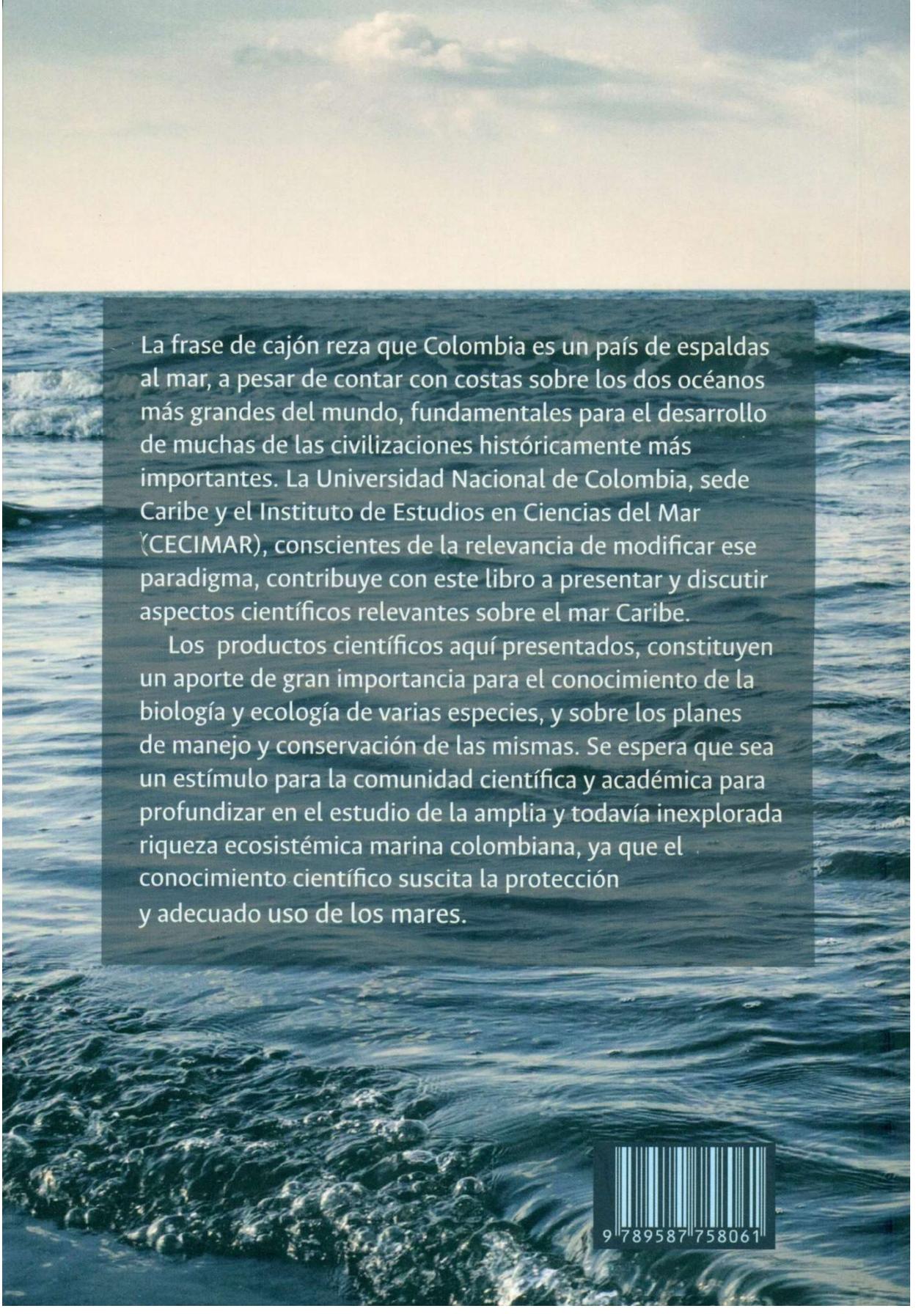
- Acosta, E. A., Gómez, E., Romero Tabarez, M., Cadavid Restrepo, G. E. y Moreno Herrera, C. X. (2009). Identificación molecular de poblaciones bacterianas asociadas al caracol pala (*Strombus gigas*) del Caribe colombiano. *Acta Biol. Colomb.*, 14, 83–96.

- Ahmadnia Modagh, H., Farhangi, M., Rafiee, G. y Noori, F. (2012). Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Aquac Int.*, 20(4), 693–705.
- Bailey, M. J., Biely, P. y Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, 23(3), 257–270.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase, alpha and beta. *Meth. Enzymol.*, 1, 149.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1–2), 248–254.
- Brownell, W. N. y Stevely, J. M. (1981). The biology, fisheries and management of the queen conch, *Strombus gigas*. *Mar Fish Rev.*, 43(7), 1–12.
- Cahill, M. (1990). Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecol.*, 19(1), 21–41.
- Carrascal, O. M. P., Elorza, M. P., Restrepo, G. E. C. y Herrera, C. X. M. (2014). Assessment of the bacterial community diversity associated with the queen conch *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) from the Caribbean coast of Colombia using denaturing gradient gel electrophoresis and culturing. *Aquac Res.*, 45(5), 773–786.
- Chang, M. y Southgate, P. (2001). Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* sp., juveniles. *Aq. Sci. Cons.*, 3(1-3), 205–214.
- Dang, H., Zhu, H., Wang, J. y Li, T. (2009). Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the southern Okinawa Trough. *World J. Microb. Biot.*, 25(1), 71–79.
- Daume, S. (2006). The roles of bacteria and micro and macro algae in abalone aquaculture: A review. *J. Shellfish Res.*, 25(1), 151–157.
- Fish, G. R. (1951). Digestion in *Tilapia esculenta*. *Nature*, 167(4257), 900–901.
- Frank, J., Wehr, M. H. (1993). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1–2), 147–165.
- Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M. y Higashi, S. (1996). Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in artemia culture. *Fisheries Sci.*, 62(6), 914–918.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J. y Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Proc. Fish Shellfish Larvicult. Symp. LARVI '95*, 155(1–4), 387–399.
- Harris, J. M. (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecol.*, 25(3) 195–231.

- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K. M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I. y Okuyama, H. (2004). Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Curr Microbiol.*, 49(2), 108–114.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J. y Moore, B. S. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microb.*, 68(9), 4431–4440.
- Hinsa-Leasure, S. M., Bhavaraju, L., Rodrigues, J. L. M. Bakermans, C. Gilichinsky, D. A. y Tiedje, J. M. (2010). Characterization of a bacterial community from a northeast Siberian seacoast permafrost sample. *FEMS Microbiol Ecol.*, 74(1), 103–113.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbiol.*, 57(5), 503–507.
- Kuddus M. y Ramteke, P. W. (2011). Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5(7), 809–816.
- Lanyi, B. (1988). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol.*, 19, 1–67.
- Lec, S. H., Chung, C.W., Yu, Y.J. y Rhee, Y. H. (2009). Effect of alkaline protease-producing *Exiguobacterium* sp. YS1 inoculation on the solubilization and bacterial community of waste activated sludge. *Bioresource Technol.*, 100(20), 4597–4603.
- Lesel, R., Fromageot, C. y Lesel, M. (1986). Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 54(1–2), 11–17.
- Macey, B. y Coyne, V. (2006). Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Mar Biotechnol.*, 8(3), 246–259.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(3), 426–428.
- Orozco-Medina, C., López-Cortés, A. y Maeda-Martínez, A. (2009). Aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria *Exiguobacterium mexicanum* and *Microbacterium* sp. in the gut lumen of *Artemia franciscana* larvae under gnotobiotic conditions. *Curr. Sci.*, 96, 120–129.
- Rimmer, D. W. y Wiebe, W. J. (1987). Fermentative microbial digestion in herbivorous fishes. *J. Fish Biol.*, 31(2), 229–236.
- Ringø, E., Strøm, E. y Tabachek, J.-A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquac. Res.*, 26(10), 773–789.

- Rohban, R., Amoozegar, M. A. y Ventosa, A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 36(3), 333–340.
- Salleh, M., Osman, H., Rosli, I., Shahab y Neelam. 2006. *Cloning and expression of pullulanase a gene from locally isolated bacillus*. Project Report. Faculty of Science, Skudai, Johor. (sin publicar).
- Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. y Ezura, Y. (1995). Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecol.*, 30(2), 193–202.
- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. y Ezura, Y. (2003). Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture*, 219(1–4), 671–679.
- Silva, A. F. R. y Riquelme, S. C. E. (2011). Food containing macroalgae and probiotic bacteria, useful for the development and survival of abalones. Google Patents. Recuperado de <http://www.google.com/patents/WO2011075862A1?cl=en>
- Sree, A. (2003). Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnol.*, 23(1), 75–84.
- Stickney, R. y Shumway, S. E. (1974). Occurrence of cellulase activity in the stomachs of fishes. *J. Fish Biol.*, 6(6), 779–790.
- Tanu Deobagkar, D. D., Khandeparker, R., Sreepada, R. A., Sanaye, S. V. y Pawar, H. B. (2012). A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. *Aquac Res.* 43(3), 386–394.
- Viana, A. (2002). Avances en la nutrición, fisiología digestiva y metabolismo del abulon. (pp. 293-308) In: Cruz- Suárez, L. E., D. Ricque- Marie, M. Tapia- Salazar, M.G. Gaxiola-Cortes y N. Simoes (Eds). *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Yokoe, Y. y Yasumasu, I. (1964). The distribution of cellulase in invertebrates. *Comp. Biochem. Phys.*, 13(4), 323–338.

La investigación está dentro del contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus productos Derivados para Investigación Científica sin Interés Comercial N° 116 del 18 de febrero de 2015. Resolución 0430 del 25 -febrero -2015, del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia.



La frase de cajón reza que Colombia es un país de espaldas al mar, a pesar de contar con costas sobre los dos océanos más grandes del mundo, fundamentales para el desarrollo de muchas de las civilizaciones históricamente más importantes. La Universidad Nacional de Colombia, sede Caribe y el Instituto de Estudios en Ciencias del Mar (CECIMAR), conscientes de la relevancia de modificar ese paradigma, contribuye con este libro a presentar y discutir aspectos científicos relevantes sobre el mar Caribe.

Los productos científicos aquí presentados, constituyen un aporte de gran importancia para el conocimiento de la biología y ecología de varias especies, y sobre los planes de manejo y conservación de las mismas. Se espera que sea un estímulo para la comunidad científica y académica para profundizar en el estudio de la amplia y todavía inexplorada riqueza ecosistémica marina colombiana, ya que el conocimiento científico suscita la protección y adecuado uso de los mares.



9 789587 758061