

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**SUBPRODUCTOS PESQUEROS COMO MATERIA
PRIMA EN DESARROLLOS BIOTECNOLOGICOS**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

CARLOS LEZAMA CERVANTES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, AGOSTO DE 1992.

RESUMEN de la tesis de Carlos Lezama Cervantes, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** en **OCEANOLOGIA** con opción en **ECOLOGIA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 1992.

SUBPRODUCTOS PESQUEROS COMO MATERIA PRIMA EN DESARROLLOS BIOTECNOLOGICOS

Resumen aprobado por:

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida

Se aislaron bacterias de la microflora intestinal de jurel (*Seriola dorsalis*) en un medio preparado con solubles de pescado al 1% (SP 1%), diluidos con agua de mar: agua destilada (3:1). Quince cepas seleccionadas en base al crecimiento y producción de vitamina B₁₂ en medio SP 1%, fueron cultivadas a 30 °C en medio SP 1% adicionando por cada 100 ml; 1.0, 1.0, 10.0 y 25.0 mg de ácido p-aminobenzóico, Biotina, Glicina y Treonina, como catalizadores. De estos cultivos se analizó la producción de vitamina B₁₂, metionina y lisina, con las bacterias auxotróficas *Escherichia coli* (ATCC14169) y *Pediococcus acidilactici* (ATCC8042). Los resultados revelaron que la producción microbiana de B₁₂ fue máxima en cultivos con las cepas *Bacillus megaterium* (ATCC10778), C2050 (aislada de camarón) y J109 (aislada de jurel), la síntesis de Metionina se observó superior con *B. megaterium*, C2050 y J109; y la producción de Lisina fue máxima en las cepas J108, J116 (aisladas de jurel) y *B. megaterium*. Medio SP 1% catalizado con Glicina, alcanzó en cultivos de 24 horas los mayores promedios de producción de los tres metabolitos mencionados. Las cepas I-2, *B. megaterium* y J109, se cultivaron a 30 °C por 36 horas, en medio ZoBell y solubles de pescado al 1%, obteniendo respectivamente una biomasa en peso seco de 0.11, 0.85 y 0.39 g/l de cultivo en ZoBell y 0.59, 0.5 y 0.56g/l de cultivo en solubles. Los cultivos realizados en solubles de pescado registraron una biomasa comparable al medio peptonado ZoBell.

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION
SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA MARINA

"SUBPRODUCTOS PESQUEROS COMO MATERIA PRIMA EN
DESARROLLOS BIOTECNOLOGICOS"

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado
de MAESTRÍA en CIENCIAS presenta

CARLOS LEZAMA CERVANTES.

Ensenada, B.C. Agosto de 1992.

DEDICATORIA

A mis queridos hermanos; Yolanda, Esthela, Alicia, Patricia, Nicolas, Eduardo, a mis cuñados y sobrinos.

A mi abuela María y muy especialmente a mi madre, quien me ha apoyado en todo momento.

A la memoria de mi padre.

A Angélica.

A mi gran maestro el GADU.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leonardo Lizárraga Partida por sus consejos y dirección en este trabajo.

A los miembros del comite de tesis por sus acertados comentarios.

A todos mis maestros, compañeros y amigos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Al CICESE por su apoyo incondicional.

Y muy especialmente, a la Universidad de Colima por su interés en la superación académica de sus integrantes.

CONTENIDO

		<u>Página</u>
I	INTRODUCCION	1
I.1	Objetivos.	3
I.2	Antecedentes.	4
I.2	Alcances	7
II	MATERIALES Y METODOS	9
II.1	Cepas Bacterianas.	9
II.1.1	Aislamiento y selección de microorganismos.	9
II.1.2	Preservación de las cepas bacterianas.	11
II.2	Caracterización de los solubles de pescado.	11
II.2.1	Estimación de la densidad y solubilidad del concentrado proteico.	12
II.2.2	Efecto del pH y clarificación.	12
II.3	Producción de vitamina B ₁₂ , metionina y lisina en solubles de pescado al 1% (SP 1%).	13
II.3.1	Evaluación de vitamina B ₁₂ .	14
II.3.2	Evaluación de la síntesis lisina y metionina	14
II.3.3	Análisis de los resultados de la producción B ₁₂ , metionina y lisina.	15
II.4	Solubles de pescado como medio de cultivo	15
II.4.1	Proporción ideal de solubles para cultivo.	15
II.4.2	Concentración bacteriana en cultivos líquidos con solubles de pescado.	16
III	RESULTADOS	17
III.1	Selección de cepas bacterianas.	17
III.2	Caracterización de los solubles de pescado.	18
III.2.1	Densidad y solubilidad del concentrado protéico.	18
III.2.2	Efecto pH y clarificación	19

CONTENIDO (Continuación)

		<u>Página</u>
III.3	Evaluación de la producción de metabolitos.	20
III.3.1	Producción de vitamina B ₁₂ en medio SP 1% adicionado de catalizadores.	20
III.3.2	Producción de metionina	23
III.3.3	Producción de lisina	25
III.4	Concentrado protéico como medio de cultivo	27
III.4.1	Determinación de la concentración óptima de solubles como cultivo.	27
III.4.2	Biomasa de cultivos bacterianos en medio SP 1%.	27
IV	DISCUSION	29
V	CONCLUSIONES	34
VI	RECOMEDACIONES	36
	LITERATURA CITADA	37
	ANEXO	41

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Esquema general del proceso para la elaboración de la harina de pescado (cantidades aproximadas en kilogramos, Ac = aceites, Ag = agua y Sol = sólidos).	2
2	Materia seca promedio y desviación estandar del precipitado de solubles de pescado al 1% en diferentes pH.	20
3	Producción promedio de vitamina B ₁₂ , en 15 diferentes cepas bacterianas cultivadas en medio SP 1% con Treonina (A), Glicina (B) y Treonina+Glicina+PABA (C).	21
4	Producción promedio de vitamina B ₁₂ en cultivos bacterianos en SP 1% catalizados con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E) en función del tiempo.	22
5	Producción de metionina en 15 cepas bacterianas cultivadas por 24 horas en medio SP 1% con Treonina (A), Glicina (B) y Treonina+Glicina+PABA (C).	23
6	Síntesis de metionina en cinco especies bacterianas en cultivos de solubles con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E), a las 24, 48 y 72 horas.	24
7	Producción de lisina en 15 cepas bacterianas cultivadas por 24 horas, en medio SP 1% con los catalizadores Treonina (A), Glicina (B) y Glicina+Treonina+PABA (C).	25
8	Variación de la síntesis de lisina, en cultivos bacterianos con solubles de pescado adicionados de Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E) en función del tiempo.	26
9	Cultivo de <i>B. megaterium</i> , I-2 y J109 en medio ZoBell y Solubles de pescado al 1%.	28

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Tratamientos empleados para promover la síntesis de B ₁₂ , lisina y metionina, en cultivos con solubles de pescado.	13
II	Cepas bacterianas seleccionadas en base al crecimiento y síntesis de vitamina B ₁₂ en solubles de pescado.	18
III	Solubilidad porcentual de los concentrados proteicos de pescado a pH de disolución ¹ y 7.0.	19
VI	Materia precipitada y características del sobrenadante en solubles de pescado al 1%.	19
V	Concentración bacteriana de nueve especies, obtenida en cultivos de medio marino ZoBell y en Solubles de pescado al 1, 2 y 5%.	27

SUBPRODUCTOS PESQUEROS COMO MATERIA PRIMA EN DESARROLLOS BIOTECNOLOGICOS

I INTRODUCCION

Las labores de descarga y procesamiento de productos pesqueros implican la generación de sólidos y líquidos residuales que en la mayoría de los casos representan un porcentaje elevado de la materia prima procesada. De acuerdo a las diferentes empresas, estos residuos pueden representar un factor altamente contaminante o pueden integrarse a la producción.

En el puerto de Ensenada, B. C. México, los residuos líquidos generados por la industria pesquera constituyen una de las fuentes de contaminación de mayor impacto en la Bahía de Todos Santos, B. C. Peña (1987) estimó que estos efluentes en 1982 representaron 20,000 toneladas de materia orgánica, medida como demanda química y bioquímica de oxígeno y sólidos totales volátiles (DBO, DQO y STV).

Una proporción importante del material orgánico vertido a la Bahía de Todos Santos hasta 1990, estaba constituido por los residuos derivados de la fabricación de harina de pescado; sanguaza y agua de cola. La sanguaza, llega a representar hasta el 10% de la materia prima (Civit *et al.* 1982) y el agua de cola entre el 50 y 60% (Fig. 1), ésta, al ser evaporada para la obtención de solubles de pescado representa el 10-13% del peso inicial (Windsor y Barlow, 1981; Castillo *et al.* 1987).

A causa del volumen del agua de cola producido en la fabricación de harina de pescado, se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de reducir su potencial impacto ambiental; se ha propuesto el tratamiento químico (Clagget, 1970; Schaffeld *et al.* 1989), la concentración y/o reciclaje (Windsor y Barlow, 1981) y el uso en desarrollos biotecnológicos (Diaz *et al.* 1983; Fujii, 1989).

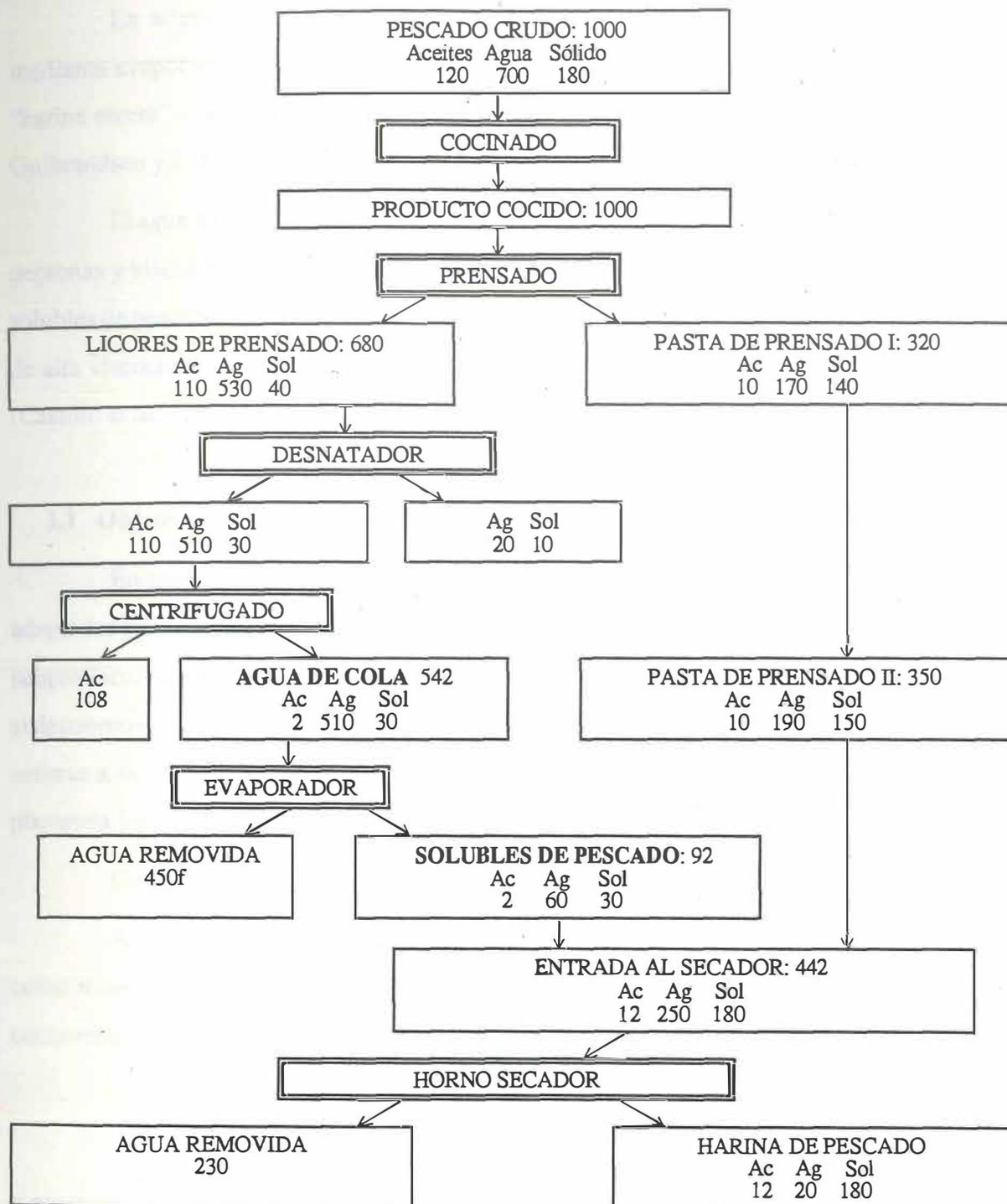


FIGURA 1. Esquema general del proceso para la elaboración de la harina de pescado (cantidades aproximadas en kilogramos, Ac = aceites, Ag = agua y Sol = sólidos), Tomada de Windsor y Barlow (1981).

La alternativa ecológica y económicamente más redituable, es la concentración mediante evaporación a solubles de pescado. Estos generalmente son reciclados para elaborar "harina entera" o se utilizan como suplemento en dietas para aves y peces (Soares *et al.* 1973; Gulbrandsen y Utne, 1981).

El agua de cola contiene una gran cantidad de elementos nutritivos, como aminoácidos, peptonas y vitaminas (Castillo *et al.* 1987; Soares, *et al.* 1973). Al concentrar el agua de cola a solubles de pescado, las características se magnifican, formando una emulsión de aceite en agua de alta viscosidad y una proporción de compuestos disueltos y particulados seis veces mayor (Castillo *et al.* 1987; del Valle y Aguilera, 1991).

I.1 Objetivos

En base a lo anterior, se consideró de utilidad el explorar alternativas biotecnológicas, adaptadas a las condiciones de Baja California y que contribuyeran a la utilización industrial de subproductos pesqueros. Con tal propósito, se planeó acondicionar solubles de pescado para el aislamiento y cultivo de bacterias marinas, disolviendo los solubles, en agua de mar diluída y estimar a su vez, la producción de algunos metabolitos de interés comercial, para lo cual se planteron los siguientes objetivos:

General;

Analizar la factibilidad de utilizar subproductos derivados de la industria pesquera, como materia prima en procesos biotecnológicos, como una alternativa para la reducción de contaminantes en la Bahía de Todos Santos, B. C.

Específicos;

1) Aislar bacterias marinas con capacidad de desarrollarse en el concentrado proteico y producir vitamina B₁₂.

2) Conocer la solubilidad y efecto del pH en la materia prima, a fin de establecer condiciones estandar que permitan su uso como medio de cultivo.

3) Estimar de los cultivos obtenidos, la concentración de metabolitos: vitamina B₁₂, Metionina y Lisina.

4) Evaluar el crecimiento de diferentes cepas bacterianas marinas, utilizando los solubles de pescado como medio de cultivo.

I.2 Antecedentes

Sindelar (1984) determinó que el 31% de la pesca mundial de pelágicos, se emplea en la elaboración de harina de pescado, volumen que genera 10 millones de toneladas de agua de cola o 2 millones de toneladas de solubles de pescado. En Ensenada, B. C. en 1989 en la elaboración de harina de pescado se procesaron 100,000 toneladas métricas (TM) de pescado (García *et al.* 1990), que generaron 50,000 TM de agua cola, lo que equivale a 10,000 TM de solubles de pescado.

La empresa Pesquera Zapata S. A. de C. V. hasta su cierre en 1990, era la única en la localidad que colectaba sistemáticamente el agua de cola, para producir solubles de pescado, constituyendo este proceso, el único esfuerzo realizado en la región para revalorizarlos. Este subproducto era comercializado en los Estados Unidos de Norteamérica durante 1989, a un precio de 0.39 dólares/litro (Pesquera Zapata, comunicación personal).

En la actualidad la Bahía de Todos Santos, B. C. sigue afectada por los afluentes antes mencionados, a pesar de la desaparición de la Pesquera Zapata, puesto que las plantas harineras que continúan trabajando, no cuentan en su mayoría con evaporadores de agua de cola.

Los solubles de pescado son una fuente importante de B₁₂ y comunmente son usados como suplemento en dietas balanceadas (Soares *et al.* 1973), aunque el efecto no es satisfactorio (Gulbransen y Utne, 1981). La variabilidad bromatológica que tienen en función de la época de pesca, así como también por el tipo de especie (Soares *et al.* 1973) son algunos de los factores que dificultan su utilización con fines biotecnológicos. Sin embargo, tanto el volumen de producción, el valor nutritivo del agua de cola y solubles (4 y 30% de proteínas respectivamente),

así como su bajo precio de comercialización, posibilitan la utilización de estos subproductos como fuentes de carbono y energía para el desarrollo de biotécnicas con bacterias marinas y generar productos bioactivos de alto valor, como vitamina B₁₂ y los aminoácidos esenciales metionina y lisina.

El interés por estos metabolitos radica en que son químicos que México generalmente importa en grandes volúmenes, para satisfacer las necesidades de la industria farmacéutica y en la elaboración de dietas balanceadas.

La vitamina B₁₂ es indispensable en la dieta humana como factor hematopoyético (Lehninger, 1983, Spalla *et al.* 1989) y es proporcionado por una dieta normal, la deficiencia provoca la anemia perniciosa. En muchos organismos cultivados para consumo humano, la carencia de B₁₂ provoca enfermedades y pérdida de peso, en peces disminuye el crecimiento (Aoe, 1980), por esta razón en áreas de intensiva producción animal o vegetal frecuentemente se adiciona al nutrimento.

La síntesis de B₁₂ se lleva a cabo únicamente en bacterias y no existen evidencias de ser producida por organismos superiores (Maugh, 1973; Lehninger 1983). En los años 60's se hicieron innumerables esfuerzos por sintetizarla "in vitro", tarea que no fue alcanzada hasta 1973, la síntesis consistió en casi 70 etapas, proceso que por razones económicas quedó para la historia (Maugh, 1973).

Debido a que la síntesis microbiana representa la alternativa económicamente más viable, los laboratorios farmacéuticos utilizan en su elaboración a bacterias seleccionadas y mejoradas con ingeniería genética. Actualmente la producción mundial de B₁₂ se estima en más de tres toneladas al año a un costo de \$ 3-4 dólares el gramo (Spalla *et al.* 1989). El precio de química Sigma (Missouri, USA) es superior a 25 dólares/g de cianocobalamina.

Igualmente importantes son la metionina y lisina, éstos son dos de los diez aminoácidos esenciales para el hombre y muchas especies de vertebrados (Lehninger, 1983) y forman parte de los veinte aminoácidos denominados proteicos. La carencia de cualesquiera de ellos puede

desencadenar problemas funcionales en algunos seres vivos, ya que además de ser formadores de proteínas son también precursores de alcaloides, antibióticos, coenzimas, hormonas, neurotransmisores, porfirinas y vitaminas entre otros, (Lehninger, 1983).

La síntesis de estos aminoácidos se realiza principalmente en plantas verdes y en algunas bacterias y hongos. La vía de síntesis puede variar de especie a especie y de manera general entre cinco y quince reacciones son necesarias para la producción.

A nivel industrial, estos metabolitos se elaboran sintética y semisintéticamente, las reacciones químicas comunmente usadas son de; Fisher, Radiónov y Zelinski (Potatov y Tatarinchik, 1983). En la URSS, la lisina se sintetiza a partir de caprolactama (Potatov y Tatarinchik, 1983).

Hochhauser (1983) estableció que el mercado mundial de lisina en 1982 alcanzó 64,500 toneladas, de las cuales una fracción elevada es sintetizada por bacterias corineformes (*Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*). El precio de química Sigma (Missouri, USA) es aproximadamente de 15 y 1.5 dólares por gramo de D-lisina y D-metionina respectivamente.

Las fermentaciones bacterianas representan para la industria, una excelente vía para la producción a gran escala de metabolitos tanto primarios como secundarios, empleando en todos los casos especies de organismos mejoradas genéticamente, como en el caso de la producción microbiana de B₁₂ usando a *Pseudomonas denitrificans*, especie que en forma natural produce 4.0 µg-B₁₂/ml y alterada genéticamente produce hasta 150 µg-B₁₂/ml, usando el mismo sustrato (Spalla, *et al.* 1989).

La vitamina B₁₂, metionina y lisina, no son los únicos sustratos que pueden ser producidos en cultivos bacterianos. Existen laboratorios que comercializan especies de microorganismos caracterizados por una excelente auxotrofia, producción o degradación de algún metabolito en particular. Como ejemplo se podría citar a la NCIB ("National Collection of Industrial Bacteria", Aberdeen, Scotland.), NCMB ("National Collection of Marine Bacteria",

Aberdeen, Scotland.) y ATCC ("American Type Culture Collection", Maryland, USA.). El catálogo de esta última, en su 18ª edición (1992), compila a bacterias patentadas que sintetizan aproximadamente 1000 compuestos químicos de valor comercial, entre ellos B₁₂, metionina y lisina.

Sin embargo, el tracto intestinal de organismos marinos puede ser una fuente importante de microorganismos productores de sustancias bioactivas. Se ha reportado, que en la microflora intestinal de algunos peces se realiza la síntesis de diversos metabolitos. Limuswan y Lovell (1981) evaluaron la síntesis intestinal y absorción de vitamina B₁₂ en bagre (*Ictalurus punctatus*). Recientemente Sugita *et al.* (1991), examinaron en teleóstos de agua dulce una gran variedad de bacterias intestinales con habilidad para sintetizar la B₁₂. Austin (1989), Ballester *et al.* (1977) y Burkholder *et al.* (1966), consideraron que el ambiente marino es una fuente potencial de bacterias con importancia farmacológica.

I.3 Alcances

Considerando el potencial que representan los solubles de pescado en desarrollos biotecnológicos se pronostican los siguientes alcances.

La utilización de solubles de pescado como sustrato para el aislamiento y cultivo de bacterias marinas, aumentaría la capacidad de desarrollar estudios microbiológicos del ambiente marino, particularmente los relacionados con bacterias intestinales de organismos marinos.

Se Obtendría información a nivel laboratorio sobre la posibilidad de utilizar subproductos pesqueros en fermentaciones bacterianas, en base a la cual se evaluaría la factibilidad de continuar en esta línea con estudios de escalamiento.

El establecimiento de una técnica para la utilización de solubles de pescado en cultivos bacterianos, podría revalorizar este recurso, ya que la producción de proteína unicelular y de

metabolitos como B₁₂, metionina y lisina, a partir de solubles podría ser una fuente importante de recursos adicionales, reduciendo como consecuencia, su potencial contaminante en lugares donde el agua de cola se vierte directamente al ambiente marino.

11.1.1 Abastecimiento y agua

En base a los resultados

del estudio realizado en la zona de
estudios del Canal de Panamá,
del municipio municipal de
Panamá, se realizó la

El medio de

una base nutritiva del 1%
1% azúcar, y agua 1%

Para el cultivo

usando el medio con
(10%) en el cultivo,
por el cultivo (10%)

La

según, por el
Pantano de
comunidad
Pantano de
según, por el
según, por el
según, por el

II MATERIALES Y METODOS

II.1 Cepas bacterianas

II.1.1 Aislamiento y selección de microorganismos.

En base a los antecedentes sobre la importancia farmacológica de algunas bacterias del tracto intestinal de peces, el aislamiento de cepas bacterianas silvestres se enfocó en la flora intestinal del jurel (*Seriola dorsalis*). El estómago e intestino de un organismo fresco, obtenido del mercado municipal de mariscos de Ensenada, B. C. fue colectado asépticamente. En el laboratorio se realizó la homogenización y sembrado.

El medio de cultivo para los aislamientos, fue elaborado para el método en placa con una base nutritiva del 1% de solubles de pescado disueltos en agua de mar diluida (medio SP 1%, anexo), y agar bacteriológico (Difco).

Para evaluar la concentración bacteriana, se empleó el recuento indirecto en placa, usando el medio marino ZoBell (anexo), descrito por Oppenheimer y ZoBell (1952) y ZoBell (1941), así como el medio SP 1% , reportando los resultados en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

La sistemática de aislamiento se llevó a cabo a partir de muestras diluidas en medio mineral, por duplicado y sembradas en medio SP1% , incubando a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, de las placas con una concentración bacteriana menor de 100 colonias, fueron recuperadas, aleatoriamente, las colonias que concidieran con los vértices de la cuadrícula de la pantalla del contador de colonias.

Veinticuatro cepas bacterianas con capacidad para crecer en medio SP 1% fueron aisladas. Estas cepas se resembraron en medio SP 1% , a fin de purificar la cepa por estrías y estimar la afinidad por el sustrato, afinidad medida en razón del crecimiento observado a 30 °C por 24 horas. Este crecimiento fue evaluado desde negativo (-) hasta muy abundante (4+).

Las 24 cepas silvestres fueron incorporadas a la colección de siete cepas aisladas del tracto digestivo de camarón (*Penaeus* sp) colectadas por Porras (1984) y la cepa *Bacillus megaterium* (ATCC10778 o NCIB8508). Estas ocho cepas, habían sido clasificadas como productoras de vitamina B₁₂, al ser cultivadas en petróleo crudo (Aldana, 1989).

Con la colección de 32 especies, se procedió a una segunda selección en base a la capacidad de producir vitamina B₁₂ en solubles de pescado al 1% diluidos en agua de mar a 26‰ de salinidad (SP1%). Cinco medios de cultivo se prepararon con solubles de pescado al 1% y pH neutro, esterilizado a 121 °C por 15 minutos y se agregó por filtración (0.1 µm) los catalizadores; Biotina, Acido para aminobenzóico (PABA), Treonina, Cloruro de cobalto y Glicina, en una proporción de 100 mg por litro de solubles. Estos compuestos fueron adicionados por ser considerados como promotores del crecimiento y síntesis de proteínas (Demain *et al.* 1968; Boeckx y Dakshinamurti, 1974 y 1975; Spalla *et al.* 1989).

Los medios preparados y solubles al 1% como control, fueron repartidos en viales, conteniendo 15 ml de cada uno de los sustratos, a los cuales se les agregó 0.1 ml de cada una de las 32 cepas bacterianas en solución, con aproximadamente 10⁴ UFC/ml, incubando por 48 horas a 30 ± 0.5 °C en agitación constante a 200 rpm. Al final de este período, el cultivo fue detenido por esterilización a 121 °C por 15 minutos.

La producción de vitamina B₁₂ en estos cultivos se analizó en placa a través de la cepa auxotrófica *Escherichia coli* (ATCC 14169), cuyo crecimiento en el medio glucosa (libre de B₁₂, anexo 3) es proporcional a la concentración de vitamina. Sobre el medio de glucosa sembrado con la cepa *E. coli* le fueron inoculadas alicuotas de cada cultivo. La respuesta de esta cepa fue evaluada por el tamaño y elevación de su halo de crecimiento alrededor de las muestras de cultivo, desde negativo (-) hasta muy abundante (4+).

En este análisis se usó como control positivo una solución de 0.075 µgB₁₂/ml, y también se evaluó el crecimiento de la cepa *E. coli* con cada catalizador.

Finalmente, 15 cepas integraron la colección de bacterias con capacidad de crecer y sintetizar vitamina B₁₂ en solubles de pescado al 1% con la adición de catalizadores.

II.1.2 Preservación de las cepas bacterianas

Para el mantenimiento de la colección, cada especie fue cultivada en medio ZoBell en placa, por 24 horas a 30 °C y conservadas en refrigeración entre 2 y 8 °C. Quincenalmente se sembraron a fin de mantener la viabilidad de las mismas. Las cepas bacterianas utilizadas en las biodigestiones, fueron previamente cultivadas en solubles al 1% en placa, por 24 horas a 30 °C, para asegurar un crecimiento exponencial.

Similarmente, la especie auxotrófica *E. coli* (ATCC 14169) fue cultivada en el medio "B12 Culture Agar USP" (Difco medio 0541-15-9) y la cepa *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042) para el ensayo de metionina y lisina fue mantenida en medio "Lactobacilli Agar AOAC" (Difco, clave 0900-15-4); estos medios se prepararon de acuerdo a Laboratorios Difco (Difco Manual, 1985).

Previo a la evaluación metabólica, las cepas auxotróficas fueron cultivadas en; "B₁₂ Inoculum Broth USP" (Difco medio 0542-15-8) para *E. coli* incubada a 30 °C por 24 horas y "Lactobacilli Broth AOAC" (Difco 0901-15-3) para *Pediococcus acidilactici* incubadas a 35 °C por 24 horas. Al final, estos cultivos fueron centrifugados cuatro veces y lavados esterilmente con 20 ml de solución salina, para obtener una suspensión bacteriana libre de cualquier traza de B₁₂, metionina o lisina.

II.2 Caracterización de los solubles de pescado.

Los solubles de pescado fueron recolectadas directamente de la planta, donde se tomaron alicuotas de aproximadamente 4.0 l, además de recopilar para cada muestra el tiempo

de almacenamiento y el mecanismo empleado para la conservación. En el laboratorio, la materia prima se preservó a una temperatura de 2-8 °C. En las pruebas de caracterización, los solubles de pescado fueron diluidos en agua de mar a 26/- de salinidad.

II.2.1 Estimación de la densidad y solubilidad del concentrado proteico.

La densidad fue estimada entre 4 y 6°C, en dos muestras por quintuplicado, pesando en una balanza analítica pipetas con un volumen exacto de solubles. Por diferencia gravimétrica se determinó el peso de la muestra y la densidad (en gramos-cm⁻³).

Las pruebas de solubilidad se realizaron por triplicado, diluyendo los solubles al 0.1, 1, 2, 5, 10 y 20% en medio mineral, a un potencial hidrógeno de 7.0 y el que resultara de la disolución solubles-medio mineral, el pH fue ajustado con H₂SO₄ 1.0 N (JT Baker) y NaOH 1.0 N (Sigma), con la ayuda de un potenciómetro Chemcadet (Cole Parmer). El parámetro evaluado fue el volumen de precipitado y se estimó por sedimentación en 60 minutos (solubilidad aparente) y por centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos. El volúmen de precipitado en relación a la muestra, representó la solubilidad (%) aparente y por centrifugación.

II.2.2 Efecto del pH y Clarificación.

Por las características de los solubles de pescado observadas en laboratorio y las reportadas en la bibliografía (exceso de sólidos suspendidos, transparencia reducida y difícil manejo por su alta viscosidad), se preparó una serie de pruebas para clarificar y aumentar la filtrabilidad de los solubles, manipulando el potencial de hidrógeno a pH 6, 7, 8 y 9, con el 1% de la materia prima.

La clarificación de los solubles fue estimada por la absorbancia, para ello, las soluciones preparadas se dejaron reposar por seis horas en una probeta, posteriormente se estimó la absorbancia del sobrenadante a una longitud óptica de 600 nm, también se evaluó el volumen de sedimento precipitado.

La filtrabilidad se determinó filtrando 250 ml de cada solución a una presión de vacío de 250 mm de Hg y usando filtros (Millipore y Nucleopore) con una malla de 8, 3 y 0.45 μm . Previamente las soluciones de solubles fueron prefiltrados en filtros Whatman no. 4, para retener las partículas mayores a 20 μm .

II.3 Producción de vitamina B₁₂, metionina y lisina en solubles de pescado al 1% (SP 1%).

El medio de cultivo utilizado en el experimento de producción, se elaboró con solubles de pescado (1%) de manera similar al usado en la selección de microorganismos. Sin embargo, se efectuaron mezclas entre los catalizadores (Tabla I) y se agregó 1.0 g de cloruro de cobalto por litro de solubles de pescado al 1%.

TABLA I. Tratamientos empleados para promover la síntesis de B₁₂, lisina y metionina, en cultivos con solubles de pescado.

Tratamiento	Catalizador	Formulación (mg/100ml) ¹	Cepas cultivadas
A	Treonina	25	15
B	Glicina	10	15
C	Treonina/Glicina /PABA	25/10/1	15
D	Glicina/Biotina	10/1	5
E	Glicina/PABA	10/1	5

¹ Peso del catalizador en medio SP 1% como solvente.

La colección bacteriana completa se cultivó por 24 horas en los tratamientos A, B y C por duplicado, y solamente cinco cepas elegidas aleatoriamente fueron cultivadas en los tratamientos D y E por sextuplicado, a fin de muestrear a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. Además, una alícuota esteril fue usada como de control para cada tratamiento. Para este experimento las condiciones de cultivo fueron idénticas a las desarrolladas en el cultivo de selección (II.1.1).

Al final de la incubación, por esterilización a 121 °C por 15 minutos, fue liberado el material intracelular, denominado lisado bacteriano. Representando un total de 2x5x15 muestras y 12 controles, de las cuales 5x15 muestras y seis controles fueron inmediatamente analizadas para evaluar la producción metabólica. La muestra sobrante fue mezclada con la segunda y almacenadas en refrigeración para análisis posteriores.

II.3.1 Evaluación de vitamina B₁₂

El ensayo para la vitamina B₁₂ se realizó en placa, en el medio glucosado (anexo), sembrando 0.1 ml de la cepa auxotrófica *E. coli* (ATCC 14169) en toda la superficie de la placa e incubando a 30 °C por 1 hora.

Para la inoculación y lectura de las muestras se identificó en cada placa la posición de norte (arbitrariamente) y se estableció en papel una matriz simétrica con nueve puntos. Posteriormente, tomando como guía la matriz de papel, se sembró en cada caja de cultivo por triplicado tres muestras de lisado bacteriano, inoculando 6 µl cada vez, la curva patrón se obtuvo inoculando por quintuplicado cada estandar, finalmente se incubó a 30 °C por 12 horas.

Al término de la incubación, con un vernier se midió el diametro del halo de crecimiento y la concentración de vitamina B₁₂ fue determinada por interpolación a la curva estandar. De la misma manera, se analizó el control de cada tratamiento, cuya magnitud fue sustraída a cada muestra de la serie respectiva.

II.3.2 Evaluación de la síntesis de metionina y lisina

Tubos de ensayo con 10.0 ml de los medios de bioensayo, preparados de acuerdo a los laboratorios Difco; "Lysine Assay Medium" y "Methionine Assay Medium" para lisina y metionina, se les adicionó 0.5 ml del producto de la lisis bacteriana y fueron esterilizados a 121 °C por 10 minutos.

Al término de este proceso los tubos fueron enfriados en baño frío y una vez alcanzada la temperatura ambiental, los tubos fueron inoculados con la cepa auxotrófica *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042) e incubados a 35 °C por 20 horas. Al término de este, los cultivos fueron analizados por turbidimetría en un espectrofotómetro "Bausch and Lomb" modelo 20 a una longitud de onda de 600 nm.

Las curvas de referencia para cada metabolito, se obtuvieron adicionando soluciones de concentración conocida. Por interpolación a la curva estandar específica, se determinó la producción metabólica en los cultivos. Similarmente, los controles de cada tratamiento fueron analizados para evaluar el posible aporte directo del sustrato y sustraerlo de los cultivos bacterianos.

II.3.3 Análisis de los resultados de la producción de B₁₂, metionina y lisina.

Debido a que los datos originales del experimento final no resultaron normales ni homoscedásticos, fueron transformados a logaritmos. La prueba χ^2 de normalidad para los datos transformados fue en los tres casos $\chi^2 > 0.17$ ($p > 0.05$).

De esta forma los datos fueron analizados parametricamente por análisis de varianza (ANVA) de dos factores (especie y catalizador), para establecer la existencia o no, de un catalizador óptimo. Asimismo, identificar qué especies desarrollan una mayor preferencia para producir vitamina B₁₂, metionina o lisina. Este análisis fue desarrollado a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

II.4 Solubles de pescados como medio de cultivo

II.4.1 Proporción ideal de solubles de pescado para cultivo

La dilución óptima del sustrato, fue examinada por la concentración bacteriana menos variable y más cercana a la obtenida en el medio marino ZoBell. Solubles al 1, 2 y 5% en placa por triplicado, fueron inoculados con 0.1 ml de una suspensión bacteriana, para cuantificar la

variabilidad del recuento bacteriano y estimar la concentración de sustrato más favorable en cuanto a la recuperación de bacterias (UFC/ml). Debido a que los datos tanto originales como transformados no resultaron normales ni homoscedásticos, se probó a través de un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) a un $\alpha = 0.05$ que el recuento bacteriano es similar entre los medios de cultivo.

II.4.2 Concentración bacteriana en cultivos líquidos con solubles de pescado.

Solubles al 1% y medio ZoBell se prepararon en base al punto II.2.2, tratandolos a pH 9.0 por seis horas, posteriormente el sobrenadante se neutralizó, esterilizó y filtró a 20 y 4 μm . Con esta suspensión, se procedió a cultivar algunas bacterias de interés biológico como la cepa fungicida I-2 (Crisostomo, 1992), *B. megaterium* (ATCC10778) y la cepa J109, en un matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 150 ml de medio, en duplicado. Los medios de cultivo fueron dispuestos aleatoriamente en un agitador orbital (Lab-line Instruments) a 200 rpm, e incubados por 36 horas a 30 °C.

En alicuotas tomadas al inicio y a las 12, 24 y 36 horas de cultivo se estimó la densidad óptica a 600 nm. Al término del cultivo se estimó la biomasa, filtrando alicuotas de 10 ml de cultivo y deshidratando a 60 °C por seis horas, por diferencia gravimétrica entre el filtro de cultivo bacteriano y un filtro con medio esteril, se obtuvo la biomasa en peso seco/alicuota de cultivo.

III RESULTADOS

III.1 Selección de cepas bacterianas.

Empleando solubles de pescado al 1% (SP 1%) como medio de aislamiento, se recuperaron 24 especies bacterianas del tracto digestivo de jurel (*Seriola dorsalis*), 14 del intestino y 10 del estómago. En estos tejidos se estimó respectivamente, una concentración bacteriana en medio ZoBell de 2.9 y 3.3 10^6 UFC/g y en solubles de pescado de 2.6 y 2.2 10^6 UFC/g. Esta densidad correspondió a la concentración bacteriana reportada para peces marinos (Horsley, 1977). Las especies aisladas representaron entre el 7 y 13% de la microflora estimada en solubles de pescado.

En base a la capacidad para crecer en solubles y producir vitamina B₁₂ con la adición de un catalizador, se seleccionaron 15 especies (Tabla II), *Bacillus megaterium* (ATCC10778) (B.m.) especie registrada como productora de B₁₂, seis aisladas del intestino de camarón (C) y ocho bacterias aisladas del tracto digestivo de jurel (J).

Las especies aisladas del tracto digestivo de jurel (J), tuvieron en general un crecimiento abundante (3+) en medio sólido SP 1%, con la excepción de la cepa J109, en cambio, las cepas aisladas de camarón tuvieron un crecimiento bueno (2+).

En los cultivos de solubles adicionado con cloruro de cobalto, ácido para-aminobenzóico (PABA) y Biotina indujeron la producción de vitamina B₁₂ en cuatro especies o menos, en el medio SP 1% sin catalizador se observó la producción de esta cobalamina en siete cepas, en cambio, solubles de pescado al 1% catalizados con Glicina promovieron la producción de B₁₂ en ocho cepas bacterianas, con Treonina 12 produjeron B₁₂. En este análisis se observa que los catalizadores que indujeron con eficiencia la síntesis de B₁₂ fueron Treonina y en menor grado Glicina (Tabla II).

TABLA II. Cepas bacterianas seleccionadas en base al crecimiento y síntesis de vitamina B₁₂ en solubles de pescado.

Especie	Crecimiento	Catalizador					
		Cloruro de Cobalto	PABA	Biotina	SP 1%	Glicina	Treonina
B.m.	+	-	-	+	-	-	+
C2044	2+	-	-	-	-	2+	-
C2050	2+	-	-	-	-	2+	-
C3070	2+	-	-	-	-	2+	+
C2123	+	4+	-	-	2+	2+	4+
C3022	+	-	-	-	-	+	3+
C3030	+	+	-	-	-	-	2+
J107	3+	-	-	-	2+	-	+
J108	2+	-	+	+	+	+	+
J109	+	-	-	-	+	2+	2+
J112	2+	-	-	+	2+	-	-
J116	4+	-	2+	-	+	-	2+
J121	4+	-	-	-	-	-	4+
J125	4+	-	+	-	-	+	2+
J127	3+	-	-	+	2+	-	+
Cat. ¹	-	-	-	-	-	-	-
B ₁₂ ²	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+

¹ Efecto del catalizador en los bioensayos.

² Solución de vitamina B₁₂, 0.075 µg/ml.

III.2 Caracterización de los solubles de pescado.

Los solubles recolectados estaban compuestos por 35% de proteínas, 2.9% de grasa, 6.7% de cenizas y 52.3% de humedad. Además, se estableció un período de almacenamiento entre 2 y 90 días y fueron preservados a un pH menor a 4.5 (datos proporcionados por Pesquera Zapata, S. A. de C. V). Esta proporción, correspondió a la composición promedio de solubles de pescado parcialmente desnatados, obtenidos en la empresa antes mencionada. La composición arriba señalada también es similar a la reportada por Soares *et al.* (1973) en solubles de arenque (*Brevoortia tyrannus*), con 31.8% de proteína, 11.2% de grasa, 7.8% de cenizas y 48.7% de humedad.

III.2.1 Densidad y solubilidad del concentrado proteico.

La densidad promedio de los solubles de pescado analizados en 10 alícuotas fue de $\rho = 1.18 \pm 0.008 \text{ g/cm}^3$. la densidad obtenida es similar a la reportada por Soares *et al.*, (1973) evaluada en $1.19 \pm 0.03 \text{ g/cm}^3$.

La solubilidad de los solubles de pescado varió en proporción inversa a la concentración de soluto y al pH. Sin embargo, la solubilidad por centrifugación en los dos potenciales de hidrógeno indicó una disolución mayor al 90% en soluciones hasta del 5% de solubles (Tabla II).

TABLA III. Solubilidad porcentual del concentrado proteico de pescado a pH de disolución y 7.0.

Muestra ml SP/100ml	pH de disolución ¹		pH 7.0	
	Aparente	Centrifugado	Aparente	Centrifugado
0.1	100	98.6	98	97.5
1.0	98	96.8	95	96.2
2.0	95	95.0	90	94.6
5.0	88	92.7	80	91.3
10.0	70	88.9	65	86.4
20.0	60	82.5	40	80.7

¹ El pH de las disoluciones fue disminuyendo conforme la proporción de soluto aumentó, registrándose un pH 6.0 para la solución al 0.1% y un pH 4.2 para el 20%.

III.2.2 Efecto del pH y clarificación de los solubles de pescado.

En el tratamiento de los solubles de pescado al 1% a diferente pH, se observó que el volumen de precipitado aumentó en proporción directa al pH (Tabla IV). La clarificación (evaluada por la absorbancia) del sobrenadante aumentó con el incremento del pH, además, en las soluciones con pH superior a 7.0, se obtuvo una buena filtrabilidad en membranas con una luz de malla de 0.45 μm (Tabla IV).

TABLA IV. Materia precipitada y características del sobrenadante en solubles de pescado al 1%.

pH	Volumen Precipitado	Materia seca (g)	Volumen Sobrenadante	Absorbancia 600 nm	Filtrado (micras)
6	8.93	0.71	497.41	0.40	3.0
7	14.33	1.12	493.97	0.28	0.45
8	27.93	1.77	481.06	0.14	0.45
9	34.00	1.78	477.16	0.10	0.45

El volumen de precipitado se incrementó en relación directa al pH (Tabla IV) ($r^2 = 0.89$). Relación similar se obtuvo con el peso seco del precipitado y el pH ($r^2 = 0.86$), sin embargo, la diferencia de precipitado en peso seco a pH 8.0 y 9.0 fue mínima (Fig. 2).

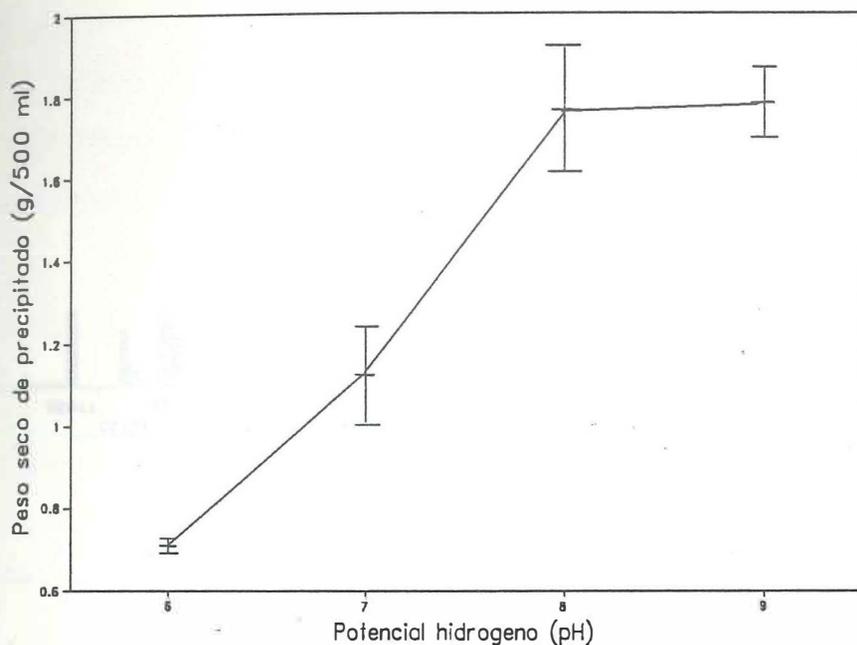


FIGURA 2. Materia seca promedio y desviación estandar del precipitado de solubles de pescado al 1% en diferentes pH.

III.3. Evaluación de la producción de metabolitos.

III.3.1 Producción de vitamina B₁₂ en medio SP 1% adicionado de catalizadores.

De las 15 cepas analizadas en cultivos de 24 horas con tres tratamientos, sólo las cepas C2050, *B. megaterium* (B.m.) y J109 presentaron una producción igual o superior a 10 ngB₁₂/ml empleando Glicina (B) como catalizador. Cuando se utiliza Treonina (A) o el tratamiento C, sólo la cepa *B. megaterium* supera este nivel (Fig. 3); esta última cepa alcanzó una concentración de 37 ng/ml de vitamina B₁₂. El análisis de varianza (ANVA) detectó diferencias significativas entre las 15 cepas bacterianas y entre catalizadores ($p < 0.05$). Estos resultados indican que el uso de catalizadores debe estar adaptado a la cepa con que se trabaje, porque no se distingue un tratamiento que mejore la producción de todas las cepas estudiadas.

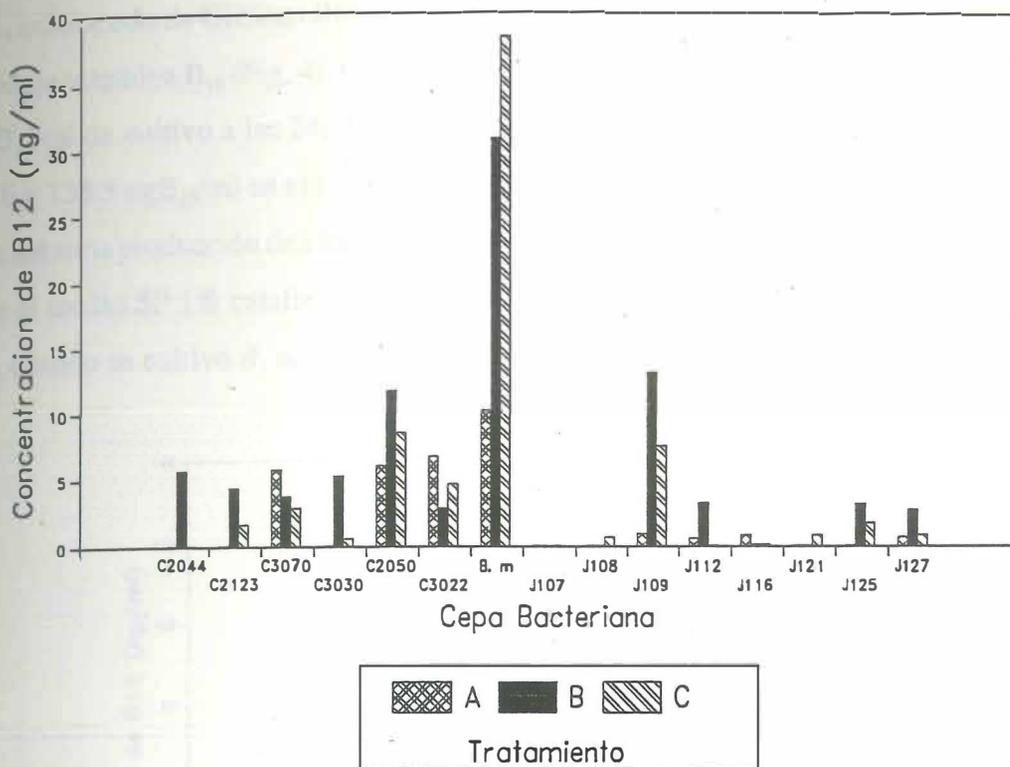


FIGURA 3. Producción promedio de vitamina B₁₂, en 15 diferentes cepas bacterianas cultivadas en medio SP 1% con Treonina (A), Glicina (B) y Treonina+Glicina+PABA (C).

Para los tratamiento A, B y C, la prueba de rango múltiple estableció cuatro niveles diferentes de producción de B₁₂ entre las 15 cepas;

Nivel 1, cepas que producen menos de 0.5 ngB₁₂/ml, J107, J108, J121 y J116.

Nivel 2 (producción entre 0.5 y 3.0 ngB₁₂/ml) J112, C2044, C3030, J125, J127 y C2123

Nivel 3 (cepas con una producción entre 3.0 y 7.5 ngB₁₂/ml) C3070, C3022 y J109

Nivel 4, cepas con una producción mayor a 7.5 ngB₁₂/ml, C2050 y *Bacillus megaterium*.

Esta misma prueba, detectó que el efecto de los catalizadores Glicina (B) y Treonina (A) es diferente, pero no hay diferencias entre estos y el tratamiento Glicina+Treonina+PABA (C).

De las especies C2044, C2123, *B. megaterium*, J116 y J121 cultivadas en medio SP 1%, adicionado de Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E), solamente la cepa *B. megaterium* produjo vitamina B₁₂ (Fig. 4). En el tratamiento D se estimó una producción de 34.1, 25.6 y 23.1 ngB₁₂/ml de cultivo a las 24, 48 y 72 horas respectivamente y en Glicina+PABA (E) de 44.9, 27.6 y 135.5 ngB₁₂/ml en el mismo período. Lo anterior indica, que el tiempo en que se alcanza una máxima producción de vitamina varía con la cepa y con el tipo de catalizador. Debe destacarse que el medio SP 1% catalizado con Glicina+PABA, promuevió la producción mas elevada de B₁₂ cuando se cultivó *B. megaterium*.

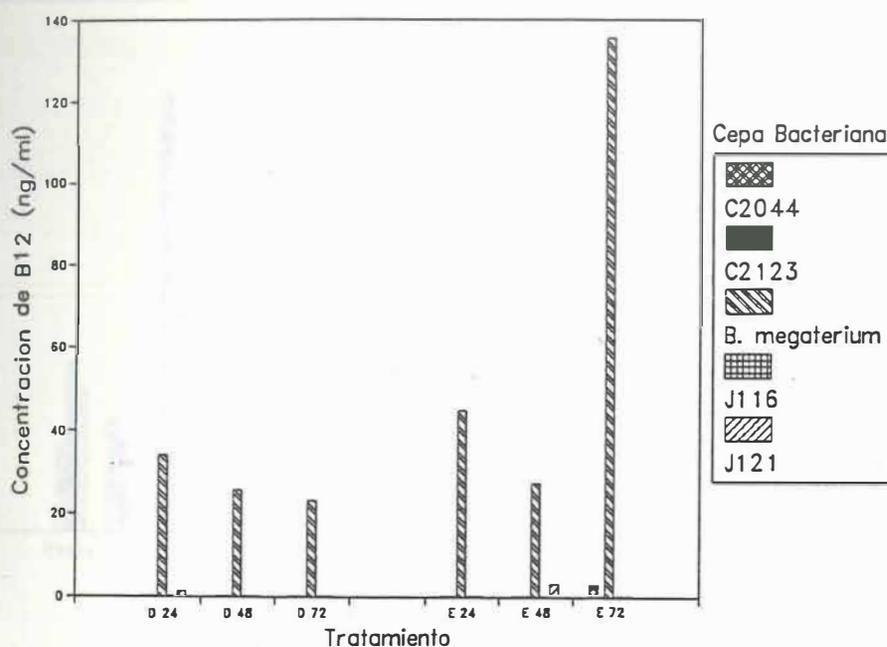


FIGURA 4. Producción promedio de vitamina B₁₂ en cultivos bacterianos en SP 1% catalizados con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E) en función del tiempo.

III.3.2 Producción de metionina.

De las 15 cepas cultivadas en medio SP 1% por 24 horas, en los tratamientos A, B, y C, sólo trece de ellas produjeron más de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de metionina (Fig. 5). Las cepas C3070, *B. megaterium* y J109 registraron concentraciones máximas que oscilaron entre 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$. La prueba estadística ANVA fue significativa entre las cepas ($p < 0.05$), pero el efecto entre los tratamientos fue similar ($p > 0.05$). Es decir, cada cepa respondió en forma diferente, pero ningún catalizador emergió como el más apropiado para todas las cepas.

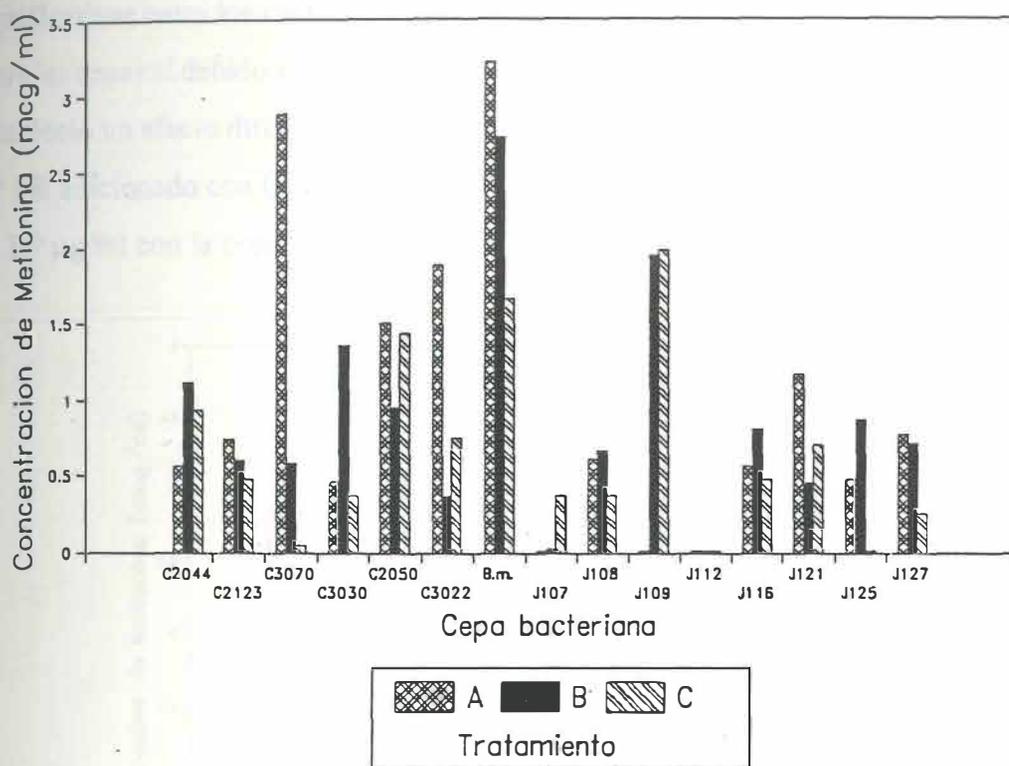


FIGURA 5. Producción de metionina en 15 cepas bacterianas cultivadas por 24 horas en SP 1% con Treonina (A), Glicina (B) y Treonina+Glicina+PABA (C).

La prueba de rango múltiple registró para estos tratamientos, diferencias solamente a tres niveles de producción entre las especies estudiadas;

Nivel 1, producción menor a 0.1 $\mu\text{g/ml}$; J112

Nivel 2 (cepas con una producción entre 0.1 y 0.75 $\mu\text{g/ml}$) C3030, J116, C2123, J127, J108, J125 y J107

Nivel 3, producción mayor a 0.75 $\mu\text{g/ml}$; *Bacillus megaterium*, C2050, J109, C3022, C3070, C2044 y J121.

En los cultivos bacterianos en medio SP 1% catalizados con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E), en períodos de 24, 48 y 72 horas de incubación, se observó producción de metionina en las cinco especies cultivadas (Fig. 6), registrándose una diferencia sustancial entre los tratamientos. Esto se comprobó por el análisis de varianza, el cual registró diferencias significativas entre los catalizadores ($p < 0.05$), pero no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) entre las cepas ni debido al tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas). La prueba de rango múltiple estableció un efecto diferente entre los catalizadores, registrando un mayor promedio el medio SP 1% adicionado con Glicina+Biotina (D). Con este tratamiento se obtuvo una concentración de 3.9 $\mu\text{g/ml}$ con la cepa C2044 a las 48 horas de cultivo.

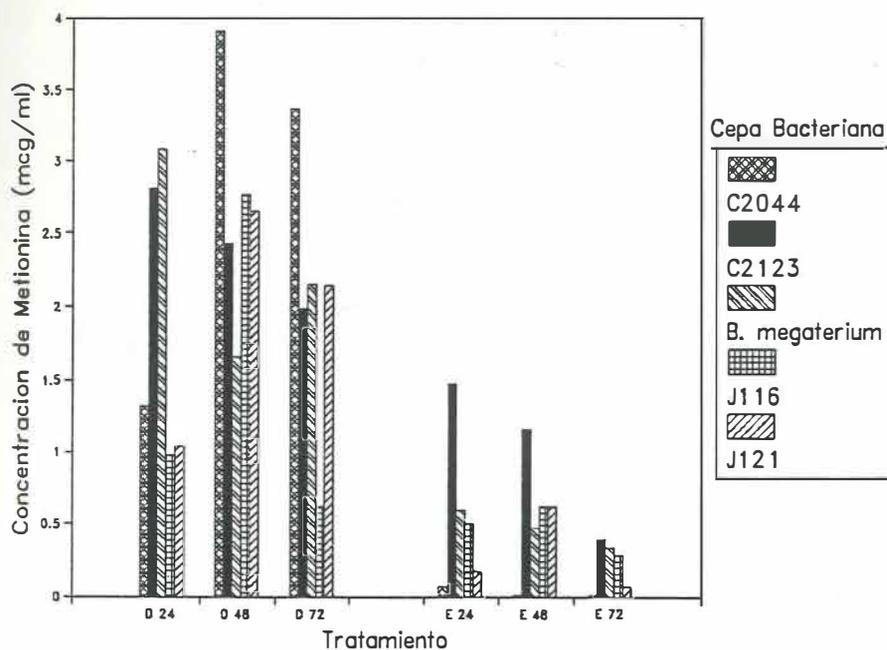


FIGURA 6. Síntesis de metionina en cinco especies bacterianas en cultivos de solubles con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E), a las 24, 48 y 72 horas.

III.3.3 Producción de lisina.

En la figura 7 se muestra que todas las cepas estudiadas produjeron lisina en medio SP 1% adicionado con Treonina (A), Glicina (B) y Glicina+Treonina+PABA (C), en un período de incubación de 24 horas, aunque se observan diferencias de producción entre las cepas ensayadas. La cepa J108 presentó la mayor producción de lisina, llegando a 2.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cuando se adicionó Glicina como catalizador. El análisis de varianza confirmó estas diferencias de producción entre cepas ($p < 0.05$) pero no entre catalizadores ($0.17 > p > 0.05$). Esta información indica que cada cepa reaccionó diferentemente a los catalizadores empleados, siendo imposible determinar que catalizador aumenta de manera general la producción de lisina.

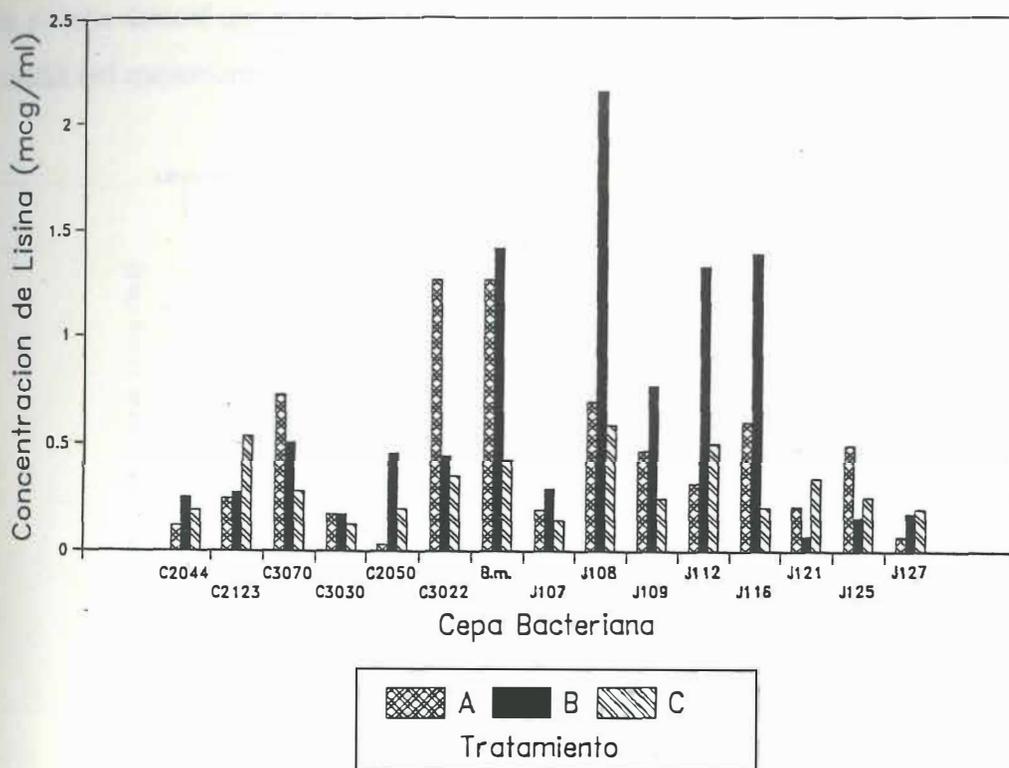


FIGURA 7. Producción de lisina en 15 cepas bacterianas cultivadas por 24 horas, en medio SP 1% con los catalizadores Treonina (A), Glicina (B) y Glicina+Treonina+PABA (C).

La prueba de rango múltiple entre cepas registró dos diferentes niveles de producción de lisina;

Nivel 1, con una producción menor a $0.2 \mu\text{g/ml}$; J127, C2050, C3030, J121 y C2044

Nivel 2, cepas con una producción mayor a $0.2 \mu\text{g/ml}$; J107, J125, C2123, J109, C3070, J116, C3022, J112, *B. megaterium* y J108.

Las especies C2044, C2123, *B. megaterium*, J116 y J121 produjeron lisina cuando se cultivaron por 24, 48 y 72 horas en medio SP 1% adicionado con Glicina+Biotina (D) y Glicina+PABA (E). Sin embargo, se observaron diferencias entre en las cinco especies y entre los dos tratamientos (Fig. 8), (ANVA $p < 0.05$), sin embargo, no hubo diferencias debido al período de incubación ($p > 0.05$).

La prueba de rango múltiple detectó diferente la producción entre las cepas C2044 y C2123 con *B. megaterium* y J116 pero entre estas cuatro y J121 no hubo diferencias significativas. Esta prueba detectó que las medias entre los los catalizadores fueron homogéneas, sin embargo, la media del tratamiento D fue mayor.

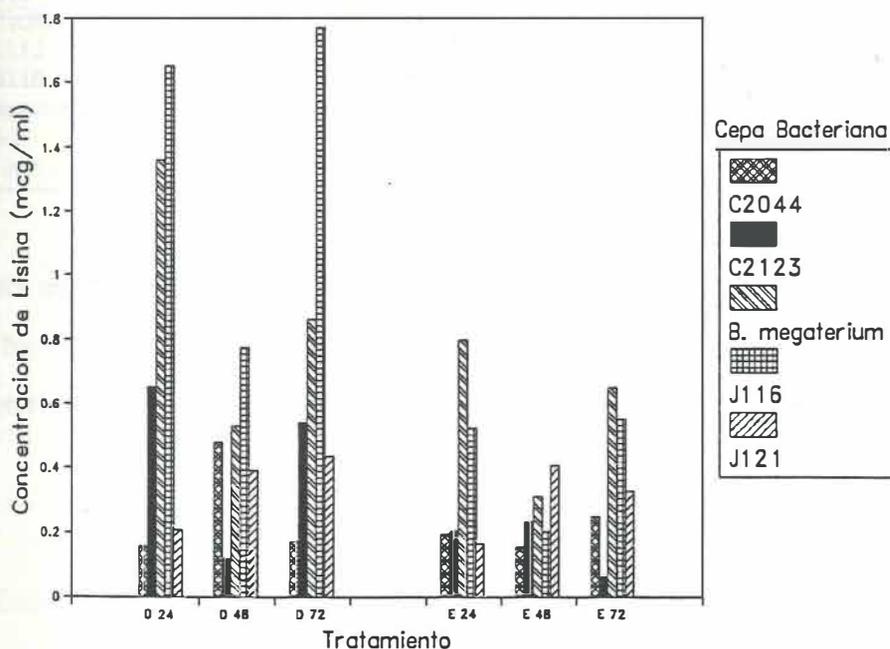


FIGURA 8. Variación de la síntesis de lisina, en cultivos bacterianos con solubles de pescado adicionados de Glicina-Biotina (D) y Glicina+PABA (E) en función del tiempo.

III.4 Concentrado proteico como medio de cultivo

III.4.1 Determinación de la concentración óptima de solubles de pescado.

Los resultados de los cultivos de nueve cepas de bacterias en medio SP al 1, 2 y 5 %, se presentan en la Tabla V. En dicha tabla, para una misma cepa no se observaron diferencias del orden de magnitud entre los diferentes medios de cultivo. Sin embargo, en las cepas C3030, C3070, *B. megaterium* e I-2, hubo una marcada diferencia en el tamaño de la colonia, resultando mayor en el medio marino ZoBell que en los solubles de pescado.

TABLA V. Concentración bacteriana de nueve especies, obtenida en cultivos de medio marino ZoBell y en Solubles de pescado al 1, 2 y 5%.

Cepa Bacteriana	10 ³ UFC/ml			
	ZoBell	SP 1%	SP 2%	SP 5%
C3030	175	160	150	155
C3070	213	198	174	189
J107	210	188	177	205
J108	448	407	380	360
J112	170	150	168	155
J116	260	220	209	235
<i>B. megaterium</i>	31	22	20	21
I-2	202	180	176	n.d.
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3350	2950	n.d.	n.d.

A través del análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis), se determinó que la densidad bacteriana es similar entre los cuatro medios de cultivo ($p > 0.05$). Con esto se establece, que el medio SP 1% provee suficientes nutrientes para el cultivo y recuento de bacterias marinas.

III.4.2 Estimación de la biomasa en cultivos con medio SP 1%.

En el cultivo de *B. megaterium*, I-2 y J109 en medio ZoBell y Solubles de Pescado al 1%, se obtuvo una biomasa en peso seco respectivamente de 110, 858 y 395 mg/l de cultivo en ZoBell y de 595, 500 y 565mg/l de solubles (Fig. 9).

La biomasa bacteriana alcanzada en el medio SP 1%, es similar a la obtenida en medio ZoBell, lo que significa que el medio SP 1%, alcalinizado a pH 9.0 para aumentar la precipitación del material suspendido y ulterior neutralización, tiene una proporción adecuada de nutrientes para el cultivo masivo de algunos microorganismos.

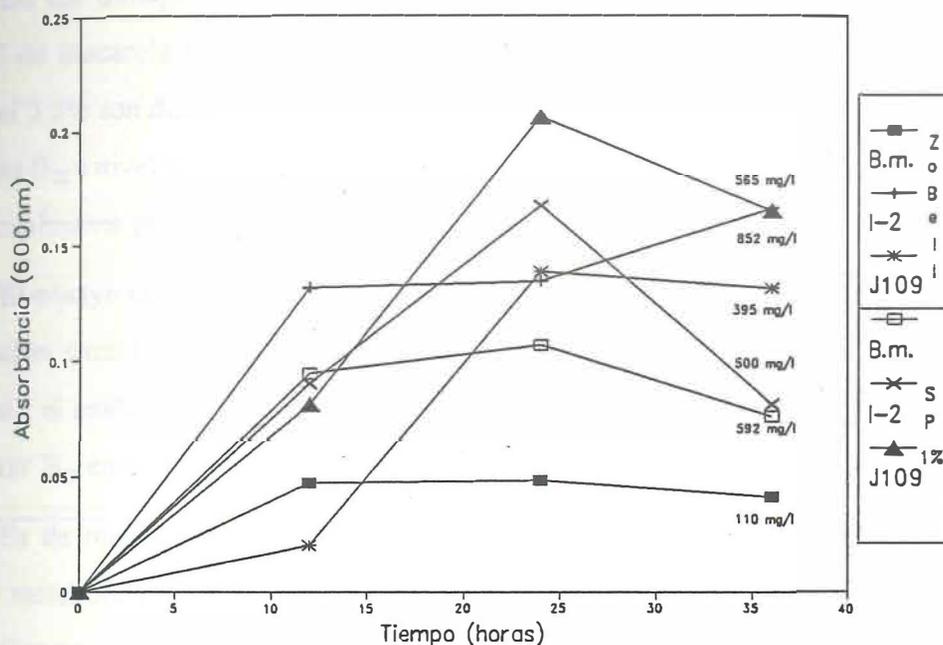


FIGURA 9. Cultivo de *B. megaterium*, I-2 y J109 en medio ZoBell y Solubles de pescado al 1%.

Por observaciones al microscopio se detectó, que el tamaño celular de las cepas I-2 y *B. megaterium* fue menor en el cultivo de solubles de pescado en contraposición al medio ZoBell. Condición similar fue detectada al determinar la concentración bacteriana, observándose que el tamaño de la colonia en el medio ZoBell fue mayor que en el medio SP 1%, sin embargo, esto no se observó con la cepa J109.

IV DISCUSION

El aislamiento de cepas bacterianas de la flora intestinal de peces, resultó ser una fuente excelente de microorganismos con capacidad de crecer en los solubles de pescado.

De los trabajos de Aiso *et al.* (1968), quienes determinaron que de la microflora estomacal de macarela (*Trachurus spp*) el 10% son bacterias coryneformes (productoras de Lisina) y el 3.3% son *Bacillus sp.* y Sugita *et al.* (1991) que estimaron la producción microbiana de vitamina B₁₂ a nivel intestinal en bagre, se desprende que las cepas bacterianas en estos tejidos son potencialmente productoras de vitamina B₁₂ y lisina.

El ensayo de selección bacteriana, se basó en la producción de vitamina B₁₂ y aunque una selección similar no se hizo para los aminoácidos por el volumen de muestras (200 por metabolito), el análisis practicado (Tabla II) detectó a 15 cepas bacterianas con habilidad para de sintetizar B₁₂ en cultivos de medio SP 1%.

Es de mencionarse que, industrialmente la esperanza matemática para mejorar la expresión metabólica de una especie a través de mutaciones es de 10⁻⁵ (Spalla *et al.* 1989). Lo cual significa un esfuerzo económico considerable, sin embargo redituable, como es el caso de la producción de vitamina B₁₂, con un mercado de 3000 kilogramos/año.

El concentrado de pescado, tiene en general una aceptable solubilidad en agua de mar diluida (medio mineral) y decrece con el aumento del pH y ligeramente por saturación de soluto (ver tabla V). A bajas concentraciones no se observan partículas de aceite, pero, una solución al 1 o 2% (semejante al agua de cola) a pH 7.0 absorbe toda la luz a 600 nm y presenta una gran cantidad de material en suspensión, lo cual limita su uso como medio de cultivo.

Por observaciones de laboratorio, se detectó que el aumento en el pH de solubles al 1% en medio mineral, incrementaba la floculación y precipitación del material suspendido. Por esta razón se ensayaron disoluciones de solubles a pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, como pretratamiento para su uso. En este ensayo, a pH 9.0 se desarrolló la solución más transparente y filtrable a una luz de malla de 0.45 µm, además, el volumen y peso seco del material precipitado (ver Tabla

IV) demuestran que en el intervalo de pH entre 6.0 y 9.0 la solubilidad de los solubles decreció con el aumento del pH. Sin embargo, Castillo *et al.* (1987) y del Valle y Aguilera (1991) determinaron que la coagulación del material proteico en el agua de cola alcanzó su máximo entre un pH de 4.0 y 5.0, igualmente sucedió con las grasas y sólidos totales.

La divergencia encontrada, en relación al punto de máxima precipitación puede estar originada por el vehiculo de dilución. Castillo *et al.* (1987) y del Valle y Aguilera (1990 y 1991) utilizaron agua corriente en todos las pruebas de laboratorio, en contraste a este trabajo, en que se usó agua de mar diluida 3:1 con agua destilada, en este caso el agua de mar puede funcionar como una solución buffer y modificar el punto isoeléctrico de la suspensión.

Además, al esterilizar los solubles de pescado al 1% por 15 minutos a 121 °C, se observó una precipitación adicional, esto coincide con del Valle y Aguilera (1991), mientras que Castillo *et al.* (1987) establecieron que la solubilidad de proteínas en el agua de cola se incrementa con el aumento de la temperatura (de 25 a 80 °C) a pH entre 3.0 y 10.0. Debido a que es normal que algunos compuestos peptídicos coagulen a temperatura de esterilización, se establece que la floculación del medio SP 1% también aumenta en proporción directa con la temperatura.

Debe mencionarse, que a un pH entre 8.0 y 9.0 se detectó un punto de inflexión en la curva de pH vs. precipitación, esto se deduce por la varianza registrada a pH 8.0 (Fig. 2). En teoría, esto permite la utilización del medio SP 1% por medio de un pretratamiento a un pH 8.0 o 9.0 con resultados similares.

Para el experimento final, se eliminó el cultivo de solubles de pescado sin catalizador debido a que, en este medio no se observó en general una respuesta positiva (ver Tabla II). Además para magnificar la producción microbiana de vitamina B₁₂, lisina y metionina, se prefirió experimentar en medio SP 1% con cuatro catalizadores combinados en cinco tratamientos (A, B, C, D y E, ver Tabla I) a fin de determinar si algún catalizador tenía un efecto superlativo. Estas combinaciones contenían Treonina o Glicina, ya que estos aminoácidos promovieron la síntesis de B₁₂ más que otros catalizadores (ver Tabla II).

De la producción microbiana de vitamina B₁₂, se establece que las cepas *B. megaterium*, C2050 y J109, sintetizaron una mayor concentración de vitamina en los tratamientos A, B y C. En los tratamientos D y E solo la cepa *B. megaterium* produjo B₁₂. No es posible establecer en general un catalizador ideal, ni tampoco un período óptimo de incubación. Sin embargo, la cepa antes mencionada alcanza una producción máxima de 135.49 ngB₁₂/ml a las 72 horas de cultivo en el tratamiento D.

La síntesis observada, resulta comparable a la obtenida por Starr *et al.* (1957) quienes encontraron algunas bacterias marinas con capacidad de producir hasta 18 ng-vitamina B₁₂/ml de cultivo. Burkholder y Burkholder (1956) ensayando con *E. coli*, encontraron una productividad en bacterias terrestres y marinas de 130 ng-B₁₂/ml de cultivo, en medios de cultivo químicamente definidos. La cepa *E. coli* (113-3) usada en estos trabajos, es una especie que no se recomienda para este ensayo (ATCC, 1980).

La síntesis de B₁₂ es realizada por diversas especies, que cultivadas extensivamente llegan a producir hasta 25 µg-B₁₂/ml. Sin embargo en la industria, el nivel de producción es mayor, por mejoramiento genético como ejemplo, *Propionibacterium shermanii* y *Pseudomonas denitrificans* sintetizan 25 y 140 µg-B₁₂/ml respectivamente, cultivadas en condiciones fisicoquímicas sofisticadas, incluyendo reactivos como 5,6-dimetil benzimidazole, producto intermedio en la síntesis de esta vitamina.

Las cepas bacterianas con mayor habilidad de sintetizar metionina en los tratamientos A, B y C fueron *B. megaterium*, C2050 y J109, pero no se observó en especial un catalizador que promoviera la síntesis de metionina en las 15 cepas analizadas. Similarmente, se registró que los períodos de incubación tienen un efecto indiferente a 24, 48 y 72 horas, además, en base al promedio de producción el tratamiento D (Glicina+Biotina) superó al tratamiento E.

La síntesis de Lisina se detectó principalmente en las cepas J108 y *B. megaterium* en los tratamientos A, B y C. Las cepas J116 y *B. megaterium* alcanzaron los mayores promedios en los tratamientos D y E. No obstante, no se observó un tratamiento específico ni un período de incubación que mejore significativamente la producción de lisina en toda la colección.

Debe señalarse, que los medios de cultivo utilizados en desarrollos industriales son complejos y se utiliza en general agua dulce, a diferencia del proceso aquí establecido, en el cual se cultiva en un medio con una salinidad de 26‰, lo cual puede ser un factor adverso para el desarrollo de ciertos microorganismos, pero acorde a nuestros objetivos.

Los niveles de producción de las muestras tomadas a períodos de 24 horas en los cultivos D y E, determinaron que la existencia de un período de incubación óptimo, fue prácticamente imposible de identificar (ver Figuras 4, 6 y 8). Autores como Spalla *et al.* (1989) y Sugita *et al.* (1991) sugieren períodos de incubación mayores a 5 días. Sin embargo, como la síntesis de metabolitos primarios (moléculas esenciales de bajo peso molecular) ocurre en la fase de crecimiento exponencial (Stanley y Stanley, 1986) y están regulados por autoinhibición (Meyer *et al.* 1985), se estima que bajo las condiciones aquí desarrolladas, períodos menores a 72 horas permiten una producción metabólica aceptable.

Meyer *et al.* 1985 y Nisbet, 1982, establecieron que la expresión bacteriana de cualquier metabolito, está en función del genoma, el cual depende en cierto grado de las condiciones ambientales. Por esta razón, en base a la producción de B₁₂, Metionina o Lisina obtenida en algunos tratamientos, se considera que los solubles de pescado son adecuados para el crecimiento y expresión metabólica para las bacterias marinas estudiadas.

Esto resulta particularmente importante porque la cepa *Bacillus megaterium*, es un microorganismo de origen terrestre, aislado del suelo y es eficiente para sintetizar B₁₂ y aminoácidos en una alta concentración, en medio SP 1% (26‰ de salinidad), por ello, se puede extrapolar que los solubles de pescado representan también, una fuente potencial de materia y energía para el cultivo y expresión de algunas bacterias terrestres.

La concentración bacteriana de diversos cultivos, estimada en medio ZoBell y en SP 1% (Tabla V) resultó estadísticamente similar, y la biomasa en peso seco alcanzada con las cepas *B. megaterium*, J109 e I-2 de 592, 565 y 500 mg/l de medio SP 1%, en medio ZoBell la cosecha respectiva fue de 110, 395 y 852 mg/l. Tomando lo anterior se infiere que el medio SP 1% presenta una proporción de nutrientes suficiente para permitir el desarrollo de altas concentraciones de bacterias y comparable a las obtenidas con peptonas (medio marino ZoBell).

Fujii (1989) en cultivos de *Aspergillus tamari* en un medio con agua de cola (30%) y adición periódica del 3% de glucosa, cosechó a los 5, 10, 15 y 20 días una biomasa en peso húmedo de 1015, 743, 826 y 558mg/100 ml respectivamente, si consideramos que esta biomasa equivale al 10% en peso seco, el rendimiento por litro es similar a nuestro estudio, no obstante la adición periódica de glucosa en este trabajo.

Conversión idéntica obtuvieron Miller y Srinivasen (1983) al cultivar *Aspergillus terreus* (ATCC 20514) en Solka-Floc (Brown Paper Company, USA) (subproducto celuloide en la fabricación de papel), levadura y minerales, obteniendo una biomasa en peso seco de 870 mg/l de cultivo y un contenido de proteína cruda de aproximadamente 300 mg/l.

Preparando peptonas de subproductos pesqueros, Almås y Sandsdalen (1989) y Clausen *et al.* (1985) para cultivar *Vibrio anguillarum* (NCBN 2129), *E. coli* B y *Proteus* sp (NTHC 153) encontraron que el hidrolizado de subproductos duplicó la biomasa obtenida en triptona comercial.

En base a estos trabajos se establece que algunos subproductos pesqueros, como los solubles de pescado aún sin tratamiento enzimático, resultan eficaces como medio de cultivo y economicamente factibles para la producción de proteína unicelular.

V CONCLUSIONES

1. Para el acondicionamiento de los solubles de pescado como medio de cultivo, una suspensión al 1% en medio mineral, ajustada a pH 9.0, esterilizada y transferida a un embudo de separación para eliminar el sedimento, permite que los nutrientes disueltos permanezcan en una proporción tal, que el cultivo de microorganismos heterotróficos resulte comparable al medio ZoBell.

2. El medio SP 1% pretratado a pH 9.0, resulta apropiado para el cultivo y concentración de bacterias -por centrifugación o sedimentación. Gelificado con el 1.5% de agar bacteriológico, su transparencia facilita la enumeración bacteriana, de una manera comparable a los medios tradicionales.

3. El empleo de agua de mar (medio mineral) en cultivos bacterianos, constituye una alternativa factible y exitosa para la región, porque el agua dulce puede constituir un factor limitante en Baja California.

4. En términos de producción metabólica, no fue posible identificar significativamente un tratamiento que elevara la producción de vitamina B₁₂, metionina o lisina en las 15 cepas ensayadas. Asimismo, dentro de 72 horas no se registró un período óptimo de cultivo.

5. El medio SP 1% catalizado con Glicina (Tratamiento B) alcanzó los más altos promedios de producción en cultivos de 24 horas. La síntesis de metionina y lisina obtenida en el tratamiento D (Glicina+Biotina) superó en cultivos de 24, 48 y 72 al tratamiento E, en cambio la mayor producción de vitamina B₁₂ en este período se obtuvo en el medio SP 1% catalizado con Glicina+PABA.

6. Bajo las condiciones de cultivo desarrolladas en este trabajo, un período de incubación de 24 o 72 horas es satisfactorio para obtener una producción metabólica significativa.

7. Las bacterias de mayor rendimiento metabólico fueron: *B. megaterium*, C2050 y J109 para producir B₁₂; *B. megaterium*, C2123 y C2050 para la síntesis de Metionina y J116, *B. megaterium* y J108 en la producción de Lisina.

8. En cultivos de bacterias marinas y terrestres en solubles de pescado al 1% (26‰ de salinidad), se obtiene una biomasa bacteriana comparable a la obtenida en medio estandar ZoBell, por lo cual se determina que, los solubles de pescado (y agua de cola) son una fuente de materia y energía potencial y alternativa para el crecimiento de microorganismos así como para la enumeración de bacterias.

9. El potencial de los solubles de pescado observado en este trabajo, hace factible y promisoría su utilización en procesos biotecnológicos con escalamiento industrial.

10. Es vital, que la industria pesquera participe con centros de investigación en el manejo y control de la contaminación, asimismo, implantar nuevas estrategias para la utilización integral de nuestros recursos pesqueros.

VI RECOMENDACIONES

1. Para mejorar alguna expresión metabólica en cultivos bacterianos con subproductos proteicos, realizar sistemáticamente muestreos y aislamientos del medio marino y terrestre, así como implantar condiciones de cultivo con variables como: pH (ajuste periódico 6.0 - 8.0), temperatura (entre 20 y 30 °C), tensión de oxígeno (0, 25, 50 y 100% de saturación), salinidad (entre 0 y 100‰), luz, adición de otros catalizadores y de carbohidratos.
2. Desarrollar los cultivos realizando análisis periódicos, tratando de establecer un período de incubación óptimo, al menos para pequeños grupos de bacterias.
3. Para evaluar extensivamente la producción de vitamina B₁₂, metionina o lisina es preferible realizar el análisis con técnicas mecanizadas y más precisas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por mencionar a una.

LITERATURA CITADA:

- Aiso, K., U. Simidu y K. Hasuo. 1968. Microflora in the digestive tract of inshores fish in Japan. *J. gen. Microbiol.* 52: 361s-364.
- Aldana, G. A. 1989. Producción de vitamina B₁₂ por bacterias marinas degradadoras de petróleo crudo. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 88 pp.
- Almås, K. A y E. Sandsdalen. 1989. Utilization of by-products from fishing industry for production of media for microbial growth. *Current Topics in Marine Biotechnology. Proceeding of the First International Marine Biotechnology Conference.* Tokyo, Japan. p. 365-368
- Aoe, H. 1980. Vitamins. En: C. Ogino (editor), *Nutrient and Feed of Fish.* Koseisha Koseikaku, Tokyo. p. 186-232.
- ATCC (American Type Culture Collection). 1980. *Catalogue of strains I.* 14th edition. Rockville, Maryland. USA. 648 pp.
- ATCC (American Type Culture Collection). 1992. *Catalogue of Bacteria and Bacteriophages.* 18th edition. Rockville, Maryland. USA. 694 pp.
- Austin, B. 1989. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 461-470
- Ballester, M., Ballester, J. M. y Belaick, J. P. 1977. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by marine bacterium. *Microbial Ecology* 3: 289- 303.
- Boeckx, R. L. and K. D. Dakshinamurti. 1974. Biotin-metidedated protein biosynthesis. *Biochem. J.* 140: 549-556.
- Boeckx, R. L. and K. D. Dakshinamurti. 1975. Effect of biotin on ribonucleic acid synthesis. *Biochimica et biophysica acta.* 383: 282-289.
- Burkholder, P. R., Pfister, R. M. y Leitz, F. H. 1966. Production of pyrrole antibiotic by marine bacterium. *Applied Microbiology* 14: 649-653.

- Burkholder, P.R. y L. M. Burkholder. 1956. Vitamin B₁₂ in suspended solids and marsh muds collected along the coast of Georgia. *Limnol. & Oceanogr.* 1: 202-208.
- Castillo, P. F., R. M. Rao y J. A. Liuzzo. 1987. Potential of activated clays in the clarification of menhaden stickwater. *J. Environ. Sci. Health*, B22(4): 471-489.
- Civit, E. M., M. A. Parín y H. M. Lupín. 1982. Recovery of protein and oil from fishery bloodwater waste. *Water Res.* 16: 809-814.
- Clagget, F. G. 1970. A proposed demonstration plan for treating fish processing plant waste water. Fisheries Research Board of Canada. Vancouver, B. C.
- Clausen, E., A. Gildberg and J. Raa. 1985. Preparation and Testing of an Autolysate of Fish Viscera as Growth Substrate for Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(3): 1556-1557.
- Crisostomo, V. L. 1992. Liofilización de la bacteria marina I-2 y su posible utilización en el control del hongo *Lagenidium callinectes*. Tesis de Maestría. CICESE, Ensenada, México. 44 pp.
- del Valle, J. M. y J. M. Aguilera. 1990. Recovery of liquid effluents from fish meal factories - a review. *Process. Biochem. Int.* 25: 122-131
- del Valle, J. M. y J. M. Aguilera. 1991. Physicochemical characterisation of raw fish and stickwater from fish meal production. *J. Sci. Food Agric.* 54: 429-441.
- Demain, A. L., H. J. Daniels, L. Schnable y R. F. White. 1968. Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B₁₂ fermentation. *Nature, London.* 220: 1324-1325
- Diaz, L., P. Monzano, D. Romo y M. Rutman. 1983. Bases para el diseño de un reactor enzimático para la hidrólisis de agua de cola. *Annals X Interamerican Congress of Chemical Engineering, Universidad de Santiago. Santiago de Chile.* 357-362.
- Difco Manual. 1985. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories. 10th edición. Detroit, Michigan. USA. 1155 pp.
- Fujii, T. 1989. Production of single cell protein from stickwater. *Journal of the Tokyo University of Fisheries. Japan.* 76(1-2): 1-6

- García, W., A. Barrera y J. Luna. 1990. Boletín Anual Temporada 1989. Centro Regional de Investigación Pesquera. Secretaría de Pesca, El Sauzal de Rodríguez, B. C. México. 19 pp.
- Gulbrandsen, K. E. y F. Utne. 1981. The effect of fish meal containing different levels of fish solubles on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. World Maricult. Soc. 12(2): 88-95.
- Hochhauser, S. J. 1983. Bringing biotechnology to market. High Technol. 3(2): 55-60.
- Horsley, R. W. 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for analysis. J. Fish. Biol. 10: 539-553.
- Lehninger, A. 1983. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1117 pp.
- Limuswan, T. y R. T. Lovell. 1981. Intestinal synthesis and absorption of vitamin B₁₂ in channel catfish. J. Nutr. 111: 2125-2132.
- Maugh, T. H. 1973. Vitamin B₁₂: after 25 years, the first synthesis. Science 170: 266-267.
- Meyer, H. P., O. Käppeli and A. Fiechter. 1985. Growth control in microbial cultures. Annual Reviews Microbiology 39: 299-319.
- Miller, T. F. y V. R. Srinivasan. 1983. Production of Single Cell Protein from Cellulose by *Aspergillus Terreus*. Biotechnology and Bioengineering. 25: 1509-1519.
- Nisbet, L. J. 1982. Current strategies in the search of bioactive microbial metabolites. J. Chem. Biotechnology. 32: 251-270.
- Oppenheimer, C. H. and C. E. ZoBell. 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Mar. res. 11: 10-18.
- Peña, J. 1987. Evaluación de los principales factores de contaminación orgánica en la Bahía de Todos Santos, B. C. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Oceanología Química. Escuela Superior de Ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B. C. México.
- Porras, A. J. 1984. Bacterias hidrocarbonoclasticas del tracto intestinal de los Peneidos *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum* y *Penaeus setiferus*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 85 pp.
- Potatov, V. M. y S. N. Tatarinchik. 1983. Química Orgánica. Editorial MIR. Moscú. 528 pp.

- Schaffeld, G. P., P. Bruzzone, A. Illanes, M. Curotto y otros. 1989. Enzymatic treatment of stickwater from fishmeal industry with the protease from *Cucurbita ficifolia*. *Biotechnology Letters*. 11(7): 521-522
- Sindelar, S. 1984. Potentials in Aquaculture. p .105-113. En: *Biotechnology in the Marine Sciences. Proceedings of the First Annual MIT Sea Grant Lecture and Seminar* (R.R. Colwell, E. R. Pariser y A. J. Sinskey ed.). John Willey and Sons. New York. 293 pp.
- Soares, F. Jr., D. Miller, S. Cupett y P. Bauersfeld, Jr. 1972. A review of the chemical and nutritive properties of condensed fish solubles. *Fishery Bull.* 17(1): 255-265.
- Spalla, C., A. Grein, L. Garofano y G. Ferni. 1989. Microbial Production of Vitamin B₁₂. p.257-284. En: Vandame. E. J. 1989. *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Elsevier. Amsterdam. 439 pp.
- Stanley, J. T. and Stanley, P. M. 1986. Potential commercial applications in aquatic microbiology. *Microbial Ecology*, 12: 79-100.
- Starr, T. J., M. E. Jones y D. Martinez. 1957. The Production of Vitamin B₁₂ -Actives Substances by Marine Bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 2(2): 114-119.
- Sugita, H., C. Miyajima e Y. Deguchi. 1991. The vitamin B₁₂-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92: 267- 276.
- Windsord, M. y S. Barlow. 1981. *Introduction to fishery by-products*. Fishing News Books Pub. England. 187 pp.
- ZoBell, C. E. 1941. Studies on marine bacteria: 1. The cultural requeriments of heterotrophic aerobes. *J. Mar. res.* 4: 42-75.

ANEXO 1

Medio Solubles de Pescado 1%

Solubles de pescado	10 ml
Agar bacteriológico ^a	15 g
Agua de mar envejecida	750 ml
Agua destilada	250 ml

^a Solamente para medio sólido.

Ajusta el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C , calentar para disolver y esterilizar por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio ZoBell.

Bacto peptona	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agar bacteriológico ^a	13 g
Cloruro férrico sol 1%	1 ml
Agua de mar envejecida	750 ml
Agua destilada	250 ml

^a Solamente para medio sólido.

Ajusta el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C , calentar para disolver y esterilizar por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio glucosado.

Fosfato dibásico de potasio	7.0 g
Fosfato monobásico de potasio	3.0 g
Citrato de sodio	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de amonio	1.0 g
Cloruro de sodio	0.1 g
D-glucosa	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1 l

Disolver por separado todos los componentes, finalmente mezclarlos y ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 , esterilizar a 121°C por 15 minutos.