

# Aislamiento de bacterias productoras de carragenasas asociadas a *Halymenia floresii*

Montero Galaviz Galilea, González Burgos Araceli, Rojas Herrera Rafael, Cabañas Vargas Diana, Sánchez González Mónica

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte, Kilómetro 33.5 Tablaje Catastral 13615 Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, 97203.

Fecha de recepción: 28 de noviembre de 2023 - Fecha de aceptación: 28 de agosto de 2024

## Resumen

El microbioma asociado al alga roja *Halymenia floresii* fue investigado para evaluar su capacidad carragenolítica. Se identificaron y caracterizaron seis bacterias asociadas con *H. floresii*, demostrando su capacidad para degradar la carragenina. La diversidad morfológica y fisiológica de estos aislados, que incluyen bacterias grampositivas, gramnegativas y filamentosas, sugiere adaptaciones específicas para la descomposición de la carragenina. El análisis del consumo de carragenina reveló una significativa disminución de azúcares reductores, indicando el potencial carragenolítico del consorcio microbiano. Estos hallazgos poseen relevantes implicaciones tanto biotecnológicas como ecológicas, destacando su posible influencia en la dinámica del ecosistema marino y en las aplicaciones industriales de las carragenasas. La capacidad de estas bacterias para degradar la carragenina sugiere aplicaciones potenciales en la industria alimentaria y farmacéutica. Además, la comprensión de la microbiota asociada a *H. floresii* contribuye al conocimiento de las interacciones microbianas en el ambiente marino, subrayando la importancia de estos microorganismos en la salud y la sostenibilidad de los ecosistemas marinos.

## Palabras Claves

*Halymenia floresii*, carragenina, carragenasas, bacterias marinas, ecosistema marino

## Isolation of the marine microbiota from *Halymenia floresii* with potential carragenase production

### Abstract

The microbiome associated with *Halymenia floresii* was investigated to assess the carrageenolytic activity. Six marine bacteria associated with *H. floresii* were identified and characterized, demonstrating their ability to degrade carrageenan. The morphological and physiological diversity of these isolates, including gram-positive, gram-negative, and filamentous bacteria, suggest specific adaptations for carrageenan decomposition. Analysis of carrageenan consumption

---

\* [monica.sanchez@correo.uady.mx](mailto:monica.sanchez@correo.uady.mx)

revealed a significant decrease in reducing sugars, indicating the carrageenolytic potential of the microbial consortium. These findings have significant biotechnological and ecological implications, highlighting their potential influence on the dynamics of the marine ecosystem and the industrial applications of carrageenases. The ability of these bacteria to degrade carrageenan suggests potential applications in the food and pharmaceutical industries, where carrageenases are commonly used. Furthermore, understanding the microbiota associated with *H. floresii* contributes to the knowledge of microbial interactions in the marine environment, emphasizing the importance of these microorganisms in the health and sustainability of marine ecosystems.

## Keywords

*Halymenia floresii*, carrageenan, carrageenases, marine bacteria, marine ecosystem.

## 1. Introducción

Las macroalgas, constituyentes esenciales de los ecosistemas marinos, desempeñan un papel crucial para diferentes industrias al ofrecer una amplia gama de polisacáridos complejos, entre los que destacan el agar, carragenanos, alginatos y fucoidanos. Estos compuestos constituyen valiosas fuentes de carbono para diversas bacterias marinas, desencadenando una serie de interacciones biológicas fundamentales. Los carragenanos, presentes en algas rojas, han capturado la atención no solo por su presencia en la naturaleza, sino también por su utilidad industrial, donde se emplean como agentes espesantes y estabilizantes en la producción alimentaria. La estructura de los carragenanos revela una complejidad fascinante ya que son polímeros formados por unidades de galactosa o anhidrogalactosa unidas por enlaces  $\alpha(1-3)$  y  $\beta(1-4)$  de manera alternada y en algunos casos se encuentran sustituidos con grupos sulfato (Li *et al.*, 2014). Existen diferentes tipos de carragenina, la  $\kappa$ ,  $\iota$  y  $\lambda$ . La  $\kappa$ -carragenina se obtiene principalmente de algas tropicales, específicamente *Kappaphycus alvarezii*. Su estructura cuenta con un grupo sulfato por cada unidad de disacárido, en presencia de sales de potasio, forma geles robustos y rígidos. Por otro lado, la  $\lambda$ -carragenina, extraída de diversas especies de los géneros *Gigartina* y *Chondrus*, se distingue por su alta sulfatación, presentando tres grupos sulfato por unidad de disacárido y careciendo

del puente 3,6-anhidro. A diferencia de la  $\kappa$ -carragenina, la  $\lambda$ -carragenina no forma geles, pero genera soluciones de elevada viscosidad. Finalmente, la  $\iota$ -carragenina, obtenida principalmente de *Eucheuma denticulatum*, exhibe dos grupos sulfato por unidad de disacárido y en contraste con la  $\kappa$ -carragenina, forma geles elásticos en presencia de sales de calcio (Akbar & Ahmed, 2019)

Las carrageninas no pueden ser absorbidas y utilizadas por los humanos; sin embargo, los carragenooligosacáridos producidos por la hidrólisis de estos polímeros, son solubles en agua y biodisponibles (Zilong *et al.* 2022). Las carrageninas se pueden hidrolizar utilizando métodos químicos, físico-químicos y biológicos (Chengcheng *et al.*, 2024). Las  $\kappa$ -carrageninas,  $\iota$ -carrageninas y  $\lambda$ -carrageninas son glicosil hidrolasas (GH) de la familia 16 que catalizan la hidrólisis de enlaces  $\beta(1-4)$  internos presentes en la estructura. Los oligosacáridos producidos por acción enzimática poseen estructuras específicas y potencial actividad, prebiótica antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral y antiviral, entre otras (Yao *et al.*, 2014, Zilong *et al.*, 2022, Kravchenko *et al.*, 2023, Wang *et al.*, 2024).

Las bacterias marinas heterotróficas asociadas a la superficie de macroalgas han desarrollado la capacidad de producir enzimas que les permiten metabolizar aeróbicamente polisacáridos algales, como las carrageninas,

produciendo CO<sub>2</sub> (Chauhan y Saxena 2016, Jiang *et al.*, 2022). Adicionalmente a las GH16, la sacarificación de carrageninas involucra otras enzimas que incluyen sulfatasas, exo- $\alpha$ -3,6-anhidro-D-galactosidasas (D-ADAGasa) y exo- $\beta$ -galactosidasa (BGasa), las cuales fueron descubiertas en organismos marinos (Chengcheng *et al.*, 2024). La bioprospección de enzimas carragenolíticas en organismos marinos, genera la posibilidad de obtener oligosacáridos con nuevas estructuras y por lo tanto nuevas actividades biológicas

La microbiota asociada a *H. floresii* (recolectada de costas de Yucatán) fue enriquecida y aislada en un trabajo previo. Esta investigación, tuvo como objetivo la búsqueda y caracterización de microorganismos capaces de producir carrageninas, centrándose específicamente en microorganismos asociados a *H. floresii*, alga roja elegida por su composición y prevalencia en las costas de Yucatán.

## 2. Metodología

### 2.1. Activación y aislamiento

Muestras de *H. floresii* fueron recolectadas en la playa de Sisal, Yucatán. En un trabajo previo se enriqueció la microbiota presente en el alga en medio marino (Sigma Aldrich 2018). Este consorcio fue mantenido en congelación y para su recuperación se realizaron resiembra continuas en caldo marino, con 40 g/L de *H. floresii* previamente secada en un horno de convección a 40°C. Para determinar el efecto del pH en la reactivación, el pH de los medios se ajustó a  $5.6 \pm 0.2$  y  $7.6 \pm 0.2$ . Los cultivos se iniciaron inoculando 2 mL del consorcio en 25 mL de medio. Para las resiembra, el tamaño del inóculo correspondió al 10% del volumen total del medio de cultivo (v/v). Los cultivos fueron incubados a 37°C por 7 días. El consorcio se consideró reactivado al determinar visualmente la degradación del alga.

Una vez activado el consorcio, se procedió al aislamiento de los microorganismos presentes.

El medio marino se preparó mediante la adición de 0.1% (p/v) de k-carragenina (Molecular Cuisine Supplies) y 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. Esta proporción de peso por volumen indica la cantidad de soluto (k-carragenina o agar) en relación al volumen total de la solución. Posteriormente, el medio fue vertido en placas Petri e inoculado con 200  $\mu$ L del consorcio microbiano que se dispersó en el agar con un asa de Digralsky. Las diferentes colonias bacterianas aisladas fueron purificadas con la técnica de estría en tres campos. Se realizaron resiembra consecutivas a partir de los aislamientos con diversas variables morfológicas.

La morfología de las colonias obtenidas en cada resiembra fue observada y registrada en una tabla hasta obtener colonias con la misma morfología durante 3 resiembra consecutivas. Las variables morfológicas estudiadas incluyeron tamaño, forma, tipo de borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia. Los aislados obtenidos fueron teñidos con el método de Gram y observados al microscopio.

### 2.2. Análisis de consumo de carragenina

Para evaluar la capacidad carragenolítica de los microorganismos aislados, se empleó un método indirecto basado en la medición del consumo de azúcares reductores, utilizando a la galactosa como estándar, debido a que es el componente mayoritario de la  $\kappa$ -carragenina. Para ello, se realizaron inoculaciones de 50  $\mu$ L de cada aislado en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio marino y 0.1% (p/v) de k-carragenina e incubados durante 48 horas. Posteriormente, se extrajo 1 mL de cada tubo cultivo y se transfirió a viales de 1.5 mL para ser centrifugados a  $10,000 \times g$  durante 15 minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante para determinar el contenido de azúcares reductores consumidos.

Los azúcares reductores se determinaron a través de método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). A cada tubo se añadieron

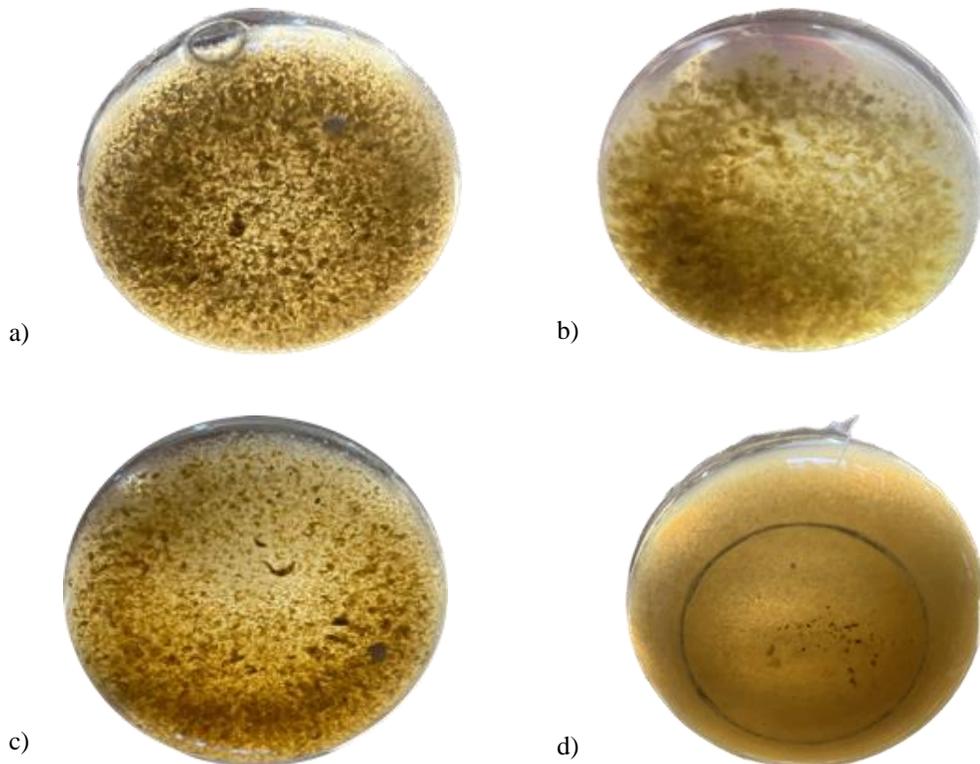
100  $\mu$ L de muestra y el mismo volumen del reactivo DNS, seguido de un tratamiento en un baño térmico a 94°C por 5 minutos. Después de la incubación, las muestras se enfriaron en agua a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez enfriadas, se añadió a cada tubo 1 mL de agua destilada y se midieron las absorbancias a 540 nm. La curva de calibración se generó utilizando D-galactosa de 0 a 0.6 g/L, siguiendo el procedimiento descrito previamente. El control utilizado fue medio marino con carragenina sin inoculación. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos, fueron sometidos a un

análisis de varianza de una vía y comparación de medias, mediante el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%, para ello se utilizó el paquete estadístico R.

### 3. Resultados

#### 3.1. Activación y aislamiento

El cultivo que presentó mayor degradación de alga fue el consorcio microbiano cultivado a un pH ligeramente ácido de  $5.6 \pm 0.2$  (Figura 1d). Este cultivo se utilizó para el aislamiento y purificación de los microorganismos.



**Fig. 1.** Activación del consorcio microbiano. a) Control sin inocular a pH 7.4; b) Cultivo incubado 7 días a pH 7.4; c) Control sin inocular a pH 5.6; d) Cultivo incubado 7 días a pH 5.6.

3.2 Morfología macroscópica y microscópica

El registro de la morfología colonial mostró que seis aislados mantuvieron la misma morfología durante tres resiembras consecutivas. Estas seis

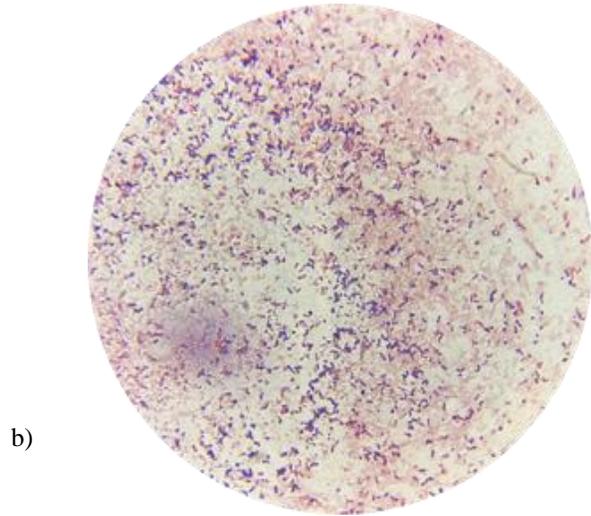
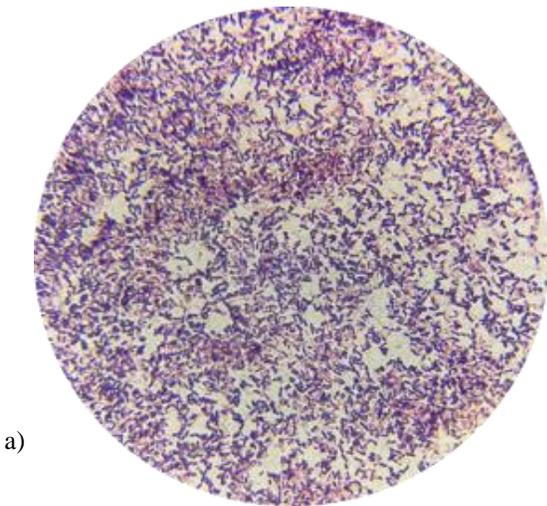
colonias presentaron diversidad en términos de tamaño, transparencia, brillo, color y elevación, pero comparten la forma circular y la textura lisa. La consistencia también varía entre las colonias, algunas fueron mucoides y otras duras (Tabla 1).

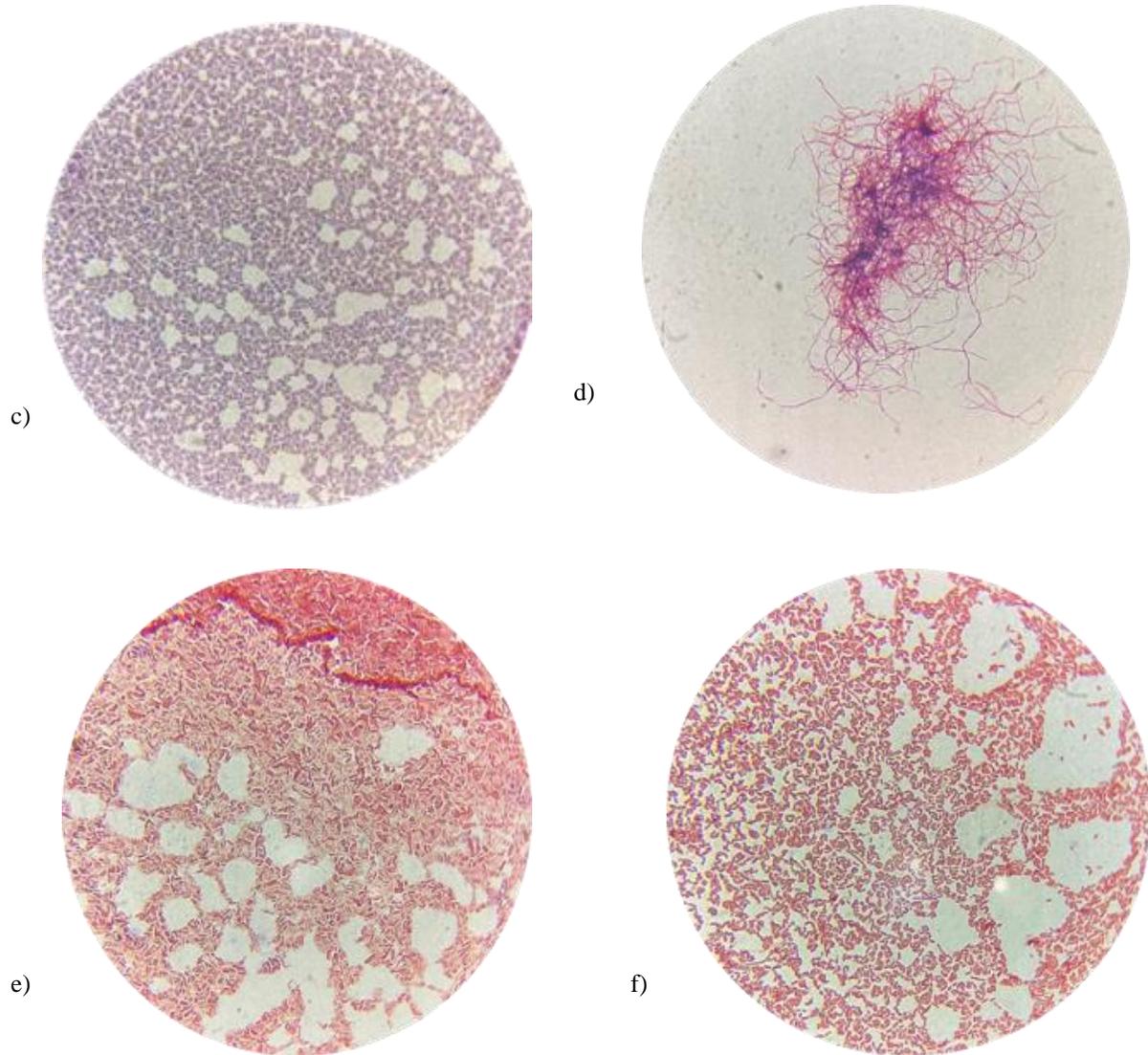
**Tabla 1.** Morfología colonial de aislados de la microbiota de *Halymenia floresii*

| Aislado | Tamaño  | Forma    | Borde  | Transparencia | Brillo    | Color               | Textura | Elevación | Consistencia |
|---------|---------|----------|--------|---------------|-----------|---------------------|---------|-----------|--------------|
| 1       | Mediano | Circular | Entero | Opaco         | Opaco     | Pigmentado blanco   | Lisa    | Convexa   | Mucoide      |
| 2       | Pequeña | Circular | Entero | Transparente  | Brillante | Pigmentado blanco   | Lisa    | Elevado   | Mucoide      |
| 3       | Pequeño | Circular | Entero | Opaco         | Opaco     | Pigmentado blanco   | Lisa    | Convexa   | Mucoide      |
| 4       | Mediano | Circular | Entero | Transparente  | Opaco     | Pigmentado amarillo | Lisa    | Convexa   | Dura         |
| 5       | Mediano | Circular | Entero | Transparente  | Brillante | Pigmentado blanco   | Lisa    | Convexa   | Mucoide      |
| 6       | Pequeño | Circular | Entero | Opaco         | Opaco     | Pigmentado blanco   | Lisa    | Convexa   | Mucoide      |

El análisis microscópico de preparaciones teñidas con la técnica de Gram, mostró la presencia de bacterias con morfología de bacilos grampositivos esporulados,

gramnegativos, cocos grampositivos, y microorganismos filamentosos grampositivos (Figura 2).



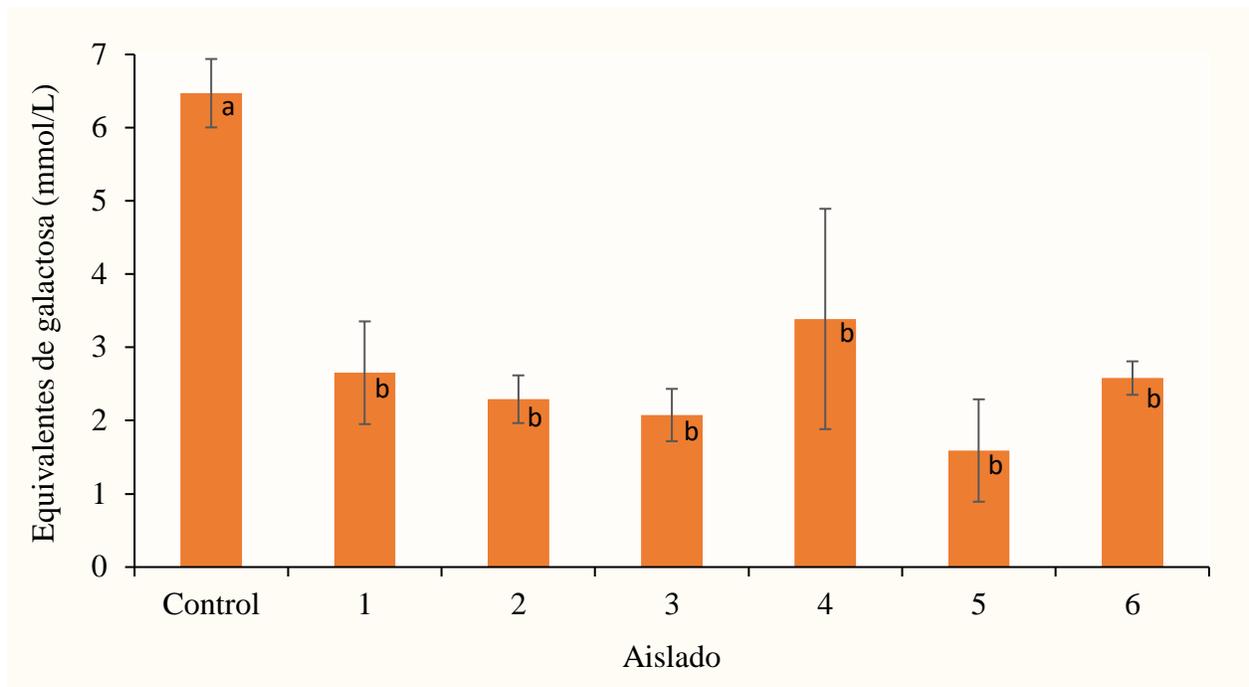


**Fig. 2.** Análisis microscópico (100X) de las bacterias aisladas teñidas por la técnica de Gram. a) Bacilos grampositivos (aislado 1); b) bacilos grampositivos esporulados (aislado 2); c) cocos grampositivos (aislado 3); d) bacteria grampositiva filamentosa (aislado 4); e) y f), bacilos gramnegativos (aislados 5 y 6).

### 3.3 Análisis de consumo de carragenina

El consumo de carragenina fue analizado indirectamente con la cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS. El control después del tratamiento con DNS,

mostró una concentración de equivalentes de galactosa de 6.47 mmol/L, mientras que los aislados mostraron una reducción de más del 50% de equivalentes de galactosa con respecto al control, indicando la hidrólisis y consumo de la carragenina (Figura 3).



**Figura 3.** Determinación de azúcares reductores mediante el método DNS para la cuantificación del consumo de carragenina (n=3). <sup>a-b</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ )

El análisis estadístico indicó diferencia significativa entre el control y los aislados, mientras que entre los microorganismos no hay diferencias significativas en el consumo de carragenina.

#### 4. Discusión

Los microorganismos marinos asociados a algas juegan un papel ecológicamente importante. Entre las funciones que desempeñan se encuentra en el recambio de nutrientes, defensa, reproducción y asentamiento (Malik, *et al.* 2020, Jiang *et al.*, 2022). Estos microorganismos difieren sustancialmente de los presentes en el agua de mar en estado libre debido a la interacción con su huésped, por lo que son considerados una fuente poco explorada de compuestos bioactivos con potencial biotecnológico, tales como dehalogenasas, antimicrobianos y enzimas específicas para la degradación de los componentes de las algas, incluyendo

agarasas, carragenasas y alginato liasas (Martin *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2022).

De particular interés son los microorganismos capaces de producir carragenasas, enzimas que descomponen la carragenina, un polisacárido abundante en las algas rojas. Estas enzimas presentan aplicaciones prometedoras en diversas industrias, desde la alimentaria hasta la farmacéutica y la biomédica (Yao *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2022). *H. floresii*, identificada como una fuente rica en carrageninas, revela la presencia de la familia lambda, altamente sulfatadas y con propiedades de espesamiento adecuadas para su implementación en la industria alimentaria (Freile-Pelegrín *et al.*, 2011).

En el marco de esta investigación, se ha observado que bacterias aisladas obtenidas del alga *H. floresii* exhiben potencial carragenolítico. La reducción significativa de azúcares reductores en más del 50% en un medio cuya única fuente de carbono era  $\kappa$ -carragenina, denota la producción de

carragenasas por los aislados y el consumo de los productos obtenidos.

Los análisis microscópicos confirman que bacterias gramnegativas como grampositivas tiene potencial para degradar carragenina (Chauhan y Saxena 2016, Hettle *et al.*, 2019). Aunque en algas pardas se ha documentado la existencia de bacterias filamentosas, posiblemente actinobacterias, con actividad polisacarolítica (Martin *et al.*, 2015), hasta la fecha no se han realizado estudios que confirmen este fenómeno en algas rojas, como *H. floresii*.

La actividad carragenolítica observada en la microbiota asociada a *H. floresii* plantea implicaciones significativas tanto para la dinámica del ecosistema marino como para las posibles aplicaciones biotecnológicas. La producción de carragenasas puede influir en la ciclación de nutrientes y en la estructura de la comunidad microbiana en los hábitats de algas rojas, lo que sugiere un posible impacto en la salud y sostenibilidad del ecosistema marino. Este hallazgo encuentra respaldo en el estudio de Gu *et al.* (2023), el cual reveló diferencias significativas en la diversidad y composición de las comunidades bacterianas asociadas a

macroalgas rojas en diferentes regiones geográficas. Además, se observó una variabilidad considerable en la abundancia de enzimas degradadoras de polisacáridos entre las regiones estudiadas y su relación con diferentes parámetros ambientales. Los resultados obtenidos generan conocimiento acerca del potencial biotecnológico de microorganismos presentes en *H. floresii*.

## 5. Conclusiones

La caracterización de seis bacterias marinas aisladas de *H. floresii* demostró su capacidad para degradar la carragenina, un polisacárido complejo que constituye una parte fundamental de las paredes celulares de las algas rojas. Este hallazgo resalta el potencial biotecnológico de estas bacterias y sugiere su utilidad en la degradación controlada de carragenina en aplicaciones industriales. Además, al evidenciar la actividad carragenolítica de la microbiota asociada a *H. floresii*, se subraya la importancia de comprender las interacciones microbianas en los ecosistemas marinos, así como su posible impacto en la salud y sostenibilidad de dichos ecosistemas.

## Referencias

- Akbar, A., & Ahmed, S. (2019). Carrageenans: Structure, Properties and Applications. En S. Ahmed & A. Soundararajan (Eds.) *Marine polysaccharides* (pp. 29-52). Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/9780429058929-3>
- Chauhan, P., & Saxena, A. (2016). Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech.* 6(2):146. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0461-3>
- Chengcheng Jiang, Yuqi Ma, Wei Wang, Jingjing Sun, Jianhua Hao, Xiangzhao Mao. (2024). Systematic review on carrageenolytic enzymes: From metabolic pathways to applications in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 73: 108351. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108351>.
- Freile-Pelegrián, Y., Azamar, J. A., & Robledo, D. (2011). Preliminary Characterization of Carrageenan from the Red Seaweed *Halymenia floresii*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 20(1), 73–83. <https://doi.org/10.1080/10498850.2010.541590>

- Gu, X., Cao, Z., Zhao, L., Seswita-Zilda, D., Zhang, Q., Fu, L., & Li, J. (2023). Metagenomic Insights Reveal the Microbial Diversity and Associated Algal-Polysaccharide-Degrading Enzymes on the Surface of Red Algae among Remote Regions. *Int. J. Mol. Sci.* 24(13), 11019. <https://doi.org/10.3390/ijms241311019>
- Hettle, G., Hobbs, JK., Pluvinage, B., Vickers, C., Abe, KT., Salama-Alber, O., McGuire, BE., Hehemann, JH., Hui, JPM., Berrue, F., Banskota, A., Zhang, J., Bottos, EM., Van Hamme, J., Boraston, AB. (2019). Insights into the  $\kappa$ -carrageenan metabolism pathway of some marine *Pseudoalteromonas* species. *Commun Biol.* Dec 19;2:474. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0721-y>.
- Jiang C, Jiang H, Zhang T, Lu Z, Mao X. (2022). Enzymatic Verification and Comparative Analysis of Carrageenan Metabolism Pathways in Marine Bacterium *Flavobacterium algicola*. *Appl Environ Microbiol.* 12:88(7):e0025622. <https://doi.org/10.1128/aem.00256-22..>
- Kravchenko, A.O, Menchinskaya, E.S, Isakov, VV, Glazunov, VP, Yermak, IM. (2023) Carrageenans and Their Oligosaccharides from Red Seaweeds *Ahnfeltiopsis flabelliformis* and *Mastocarpus pacificus* (Phylloporaceae) and Their Antiproliferative Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 24:7657. <https://doi.org/10.3390/ijms24087657>
- Li J, Gu X, Zhang Q, Fu L, Tan J, Zhao L. (2022). Biochemical Characterization of a Carrageenase, Car1383, Derived From Associated Bacteria of Antarctic Macroalgae. *Front Microbiol.* 31(13):851182. doi: 10.3389/fmicb.2022.851182.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., y Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym.* 103:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.008>
- Malik, A, Bazire, SA, Gamboa-Muñoz, A., Bedoux, GA., Robledo, D. García-Maldonado, JQ., Bourgougnon, N. (2020). Screening of Surface-associated Bacteria from the mexican red alga *Halymenia floresii* for quorum sensing activity. *Microbiology.* 89:778–788. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060132>
- Martin, M., Barbeyron, T., Martin, R., Portetelle, D., Michel, G., & Vandenberg, M. (2015). The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria. *Frontiers Microbiol.* 6:1487. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01487>
- Martin, M., Portetelle, D., Michel, G., & Vandenberg, M. (2014). Microorganisms living on macroalgae: Diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotech.* 98(7), 2917-2935. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5557-2>
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *J Anal Chem.* 31, 426-428.
- Wang L, Zhang G, Li Q, Lu F, Yang K, Dai X. (2024). Carrageenan oligosaccharide alleviates intestinal damage via gut microflora through activating IMD/relish pathway in female *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 38:e23455. <https://doi.org/10.1096/fj.202301218R>

- Yao, Z., Wu, H., Zhang, S, Du, Y. (2014). Enzymatic preparation of k-carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity. Carbohydr Polym. 30(101):359–367. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.055>
- Zilong Guo, Yanshang Wei, Yu Zhang, Yinxiao Xu, Ling Zheng, Benwei Zhu, Zhong Yao. (2022). Carrageenan oligosaccharides: A comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. Algal Res. 61: 102593 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102593>