



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

“Actividad carbohidrasa en el estilo cristalino de bivalvos: comparación entre especies infaunales y epifaunales”

Alumna: *Cano Iglesias, Marina*
Fecha: Septiembre 2015

Director/a
Dr. Irrintzi Ibarrola Bellido

Curso Académico
2014/15

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALIMENTACIÓN EN BIVALVOS

1.2. EL SISTEMA DIGESTIVO DE LOS BIVALVOS

1.3. EL ESTILO CRISTALINO: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

1.4. CARBOHIDRASAS DEL ESTILO CRISTALINO

1.4.1. Amilasas

1.4.2. Celulasas

1.4.3. Laminarinasas

1.4.4. Xilanasas

2. OBJETIVO

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS BIVALVOS

3.2. DISECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.3. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

3.3.1. Preparación de los sustratos

3.3.2. Preparación del extracto enzimático

3.3.3. Determinación de las actividades carbohidrasa

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL ESTILO CRISTALINO

4.2. RESULTADO DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

4.2.1. Actividad específica obtenida por especie.

4.2.2. Comparación de la actividad específica entre especies.

4.2.3. Actividad total por gramo de animal

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ALIMENTACIÓN EN BIVALVOS

Debido a sus características morfológicas y fisiológicas los bivalvos no pueden desplazarse grandes distancias y, por ello, deben soportar importantes cambios en las variables ambientales así como en la cantidad y composición del alimento disponible. Numerosos estudios han demostrado que los bivalvos presentan una gran adaptabilidad en sus procesos alimentarios y digestivos, lo que les permite sobrevivir a pesar de encontrarse en un ambiente tan inestable (Bayne, 1993). Concretamente, la regulación de las enzimas digestivas puede ser uno de los factores clave en esta adaptación (Labarta *et al.*, 2002).

En función de su modo de vida los bivalvos se clasifican en dos grupos: infaunales y epifaunales. Los bivalvos infaunales, como berberechos o almejas, habitan enterrados en los sedimentos del fondo marino a distintas profundidades en función de la especie, mientras que los epifaunales, como mejillones u ostras, se encuentran adheridos a estructuras rígidas o libres sobre los fondos. Todos ellos se alimentan de un conjunto heterogéneo de partículas suspendidas en la columna de agua.

Debido a su disposición en el substrato los bivalvos infaunales, que solo están en contacto con las corrientes muy cercanas al fondo, son más susceptibles de experimentar importantes variaciones en la cantidad y calidad de los nutrientes como consecuencia de la continua resuspensión de los sedimentos. De hecho, se ha afirmado que, en general, los bivalvos infaunales se adaptan mejor a estas variaciones que las especies epifaunales (Hawkins *et al.*, 1990).

1.2. EL SISTEMA DIGESTIVO EN BIVALVOS

Los bivalvos adquieren el alimento mediante la filtración de las partículas suspendidas en el agua a través de las branquias. Los palpos labiales, unas prolongaciones situadas en el extremo de las branquias y alrededor de la boca, realizan posteriormente un proceso de selección pre-ingestiva de las partículas en función de su naturaleza y tamaño.

Una vez que el alimento entra al tubo digestivo, el movimiento coordinado de los cilios del epitelio de la boca y del esófago facilita su transporte hasta el estómago. En este punto cabe destacar que la digestión de los bivalvos es de carácter bifásico, ya que combina una digestión preliminar extracelular en el estómago, con un posterior proceso de fagocitosis y procesamiento intracelular del alimento en los divertículos de la glándula digestiva.

Asociado al estómago se encuentra el estilo cristalino, una estructura de aspecto transparente y gelatinoso que contiene enzimas digestivas que se liberan en la cavidad estomacal, llevando a cabo la digestión extracelular.

Las paredes del estómago de los bivalvos poseen unas zonas recubiertas de cilios, cuya función parece ser la de seleccionar las partículas e incorporar las partículas seleccionadas a los divertículos digestivos de la glándula. Allí, mediante fagocitosis y pinocitosis las partículas son incorporadas a las células digestivas. Estas células poseen enzimas digestivas, y es ahí donde tiene lugar la digestión intracelular, que es el modo predominante de digestión en bivalvos, y la posterior absorción del alimento.

Tras la digestión intracelular los desechos vuelven a la luz del estómago, pasan por el intestino y se eliminan a través del recto. En algunos tipos de bivalvos, en el intestino también tienen lugar procesos absorción y digestión (mediante la liberación de enzimas intestinales) de las partículas procedentes del estómago. (Hill *et al.*, 2012). (Cargnin-Ferreira y Sarasquete, 2008).

1.3 EL ESTILO CRISTALINO: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El estilo cristalino es una estructura transparente compuesta en un 80-90% de agua, además de proteínas, glicoproteínas, enzimas digestivas y, en menor proporción, carbohidratos. Se encuentra en la parte posterior del estómago, en contacto con una estructura quitinosa conocida como escudo gástrico, y tiene forma de tallo alargado.

La función del estilo cristalino en la digestión es doble, ya que además de participar en la digestión extracelular liberando enzimas también rompe y mezcla los alimentos gracias a su movimiento de rotación, observado anteriormente mediante técnicas endoscópicas (Ward *et al.*, 1991). Esto último se conoce como digestión mecánica.

En uno de los extremos del estilo cristalino se encuentra el saco del estilo, un tubo ciego que se abre al estómago y está provisto de cilios, responsables de la rotación del estilo sobre su eje longitudinal. Al rotar, este ejerce presión contra la pared del estómago, facilitando la fragmentación de los alimentos en la ya mencionada digestión mecánica. El movimiento de rotación también tracciona unas hebras de mucina que se van enrollando al estilo de manera que las partículas de alimento adheridas a estas hebras mucosas se desplazan desde la boca al interior del estómago.

Durante la digestión, uno de los extremos del estilo cristalino se va degradando, liberándose así las enzimas digestivas. Sin embargo, el saco del estilo, que recubre el otro extremo, va sintetizando el material que compone el estilo de manera continua a medida que se desintegra, de forma que su tamaño se mantiene constante (Alexander *et al.*, 1979).

1.4. CARBOHIDRASAS DEL ESTILO CRISTALINO

A partir de la primera detección de actividad amilasa en el estilo cristalino de bivalvos (Yonge, 1923) se han realizado varios estudios para analizar distintos tipos de actividad enzimática tanto en la glándula digestiva como en el estilo cristalino.

En cuanto a los tipos de enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo de los bivalvos, podemos encontrar carbohidrasas, proteasas y lipasas. Aunque existen estudios sobre la actividad proteasa (Sisini y Corrias, 1964; Kreeger, 1993) y, en menor medida, lipasa (George, 1952; Patton y Quin, 1973), el estilo cristalino libera fundamentalmente carbohidrasas a la cavidad estomacal, y por ello se tiene mucha más información sobre este tipo de enzimas (Newell *et al.*, 1980, Lucas y Newell, 1984; Fielding *et al.*, 1987; Ibarrola *et al.*, 1998; Labarta *et al.* 2002).

A continuación se detallan algunas características de las carbohidrasas del estilo cristalino estudiadas en este trabajo.

1.4.1. Amilasas

Una importante fuente de materia orgánica para los bivalvos son las algas verdes, organismos unicelulares o pluricelulares fotosintetizadores, cuyo principal polisacárido de reserva es el almidón.

El almidón está compuesto por amilosa, formada por α -D-glucosa unidas en disposición lineal mediante enlaces glucosídicos (1-4), y amilopectina, que presenta una estructura similar a la amilosa, pero contiene ramificaciones con enlaces glucosídicos (1-6). La amilosa se degrada completamente a maltosa por acción de la β -amilasa, pero para degradar la amilopectina, debido a su estructura ramificada también es necesaria la acción de la α -amilasa.

Se ha demostrado que la actividad amilolítica predominante en bivalvos es del tipo α -amilasa (Wojtowicz, 1972), y que generalmente tanto en el estilo cristalino como en la glándula digestiva la actividad amilasa es más elevada que la del resto de carbohidrasas (Brock y Kennedy, 1992).

Por otra parte, se ha comprobado la coexistencia de distintas isozimas de α -amilasa en varias especies de bivalvos. Algunos de los estudios más recientes sobre la expresión y regulación de la amilasa en bivalvos son los realizados por Huvet *et al.* (2012) y Ren *et al.* (2014).

1.4.2. Celulasas

La celulosa es un polisacárido estructural formado por β -D-glucosa con enlaces (1-4). No contiene ramificaciones, las cadenas se disponen paralelamente unidas mediante puentes de hidrógeno. Es el componente principal de las paredes celulares de los vegetales y por lo tanto forma parte de muchos de los alimentos que toman los bivalvos, como el detritus de origen vegetal o el fitoplancton.

Sin embargo, los niveles de actividad celulasa son en general más bajos en comparación con los de otras carbohidrasas (Seiderer *et al.*, 1982; Brock *et al.* 1992), aunque se han documentado algunas excepciones (Labarta *et al.*, 2002).

1.4.3. Laminarinasas

La laminarina es un polisacárido compuesto por unidades del disacárido laminaribiosa. Se trata de un polisacárido de reserva presente en numerosas algas macrofitas, fundamentalmente del tipo laminaria, y constituye una importante fuente de materia orgánica para los bivalvos.

En general, la actividad laminarinaasa suele ser más alta en el estilo cristalino que en la glándula digestiva (Brock y Kennedy, 1992; Ibarrola *et al.*, 1998).

1.4.4. Xilanasas

El xilano es un polisacárido formado por una cadena lineal de xilosa con enlaces β (1-3) o β (1-4) que puede incluir diversas ramificaciones y sustituciones. Es un polisacárido estructural que forma parte de la hemicelulosa presente en la pared de las células vegetales, y sustituye a la celulosa en las paredes celulares de algunas algas rojas y verdes (Frei y Preston, 1964; Craigie, 1990). Los bivalvos encuentran una importante fuente de xilano en el detrito de origen vegetal.

Aunque se han realizado menos estudios sobre la actividad xilanasas en bivalvos que sobre las tres carbohidrasas anteriores, algunos autores han determinado esta actividad en el estilo cristalino de varias especies de bivalvos (Sakamoto y Haruhiko, 2009).

2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es establecer las posibles diferencias en la actividad de las principales carbohidrasas del estilo cristalino entre especies infaunales y epifaunales de bivalvos.

La hipótesis a testar es la siguiente: las especies infaunales de bivalvos se encuentran enterrados en los fondos marinos, y por lo tanto, al contrario que en el caso de las especies epifaunales, el alimento disponible para estos organismos contiene una mayor proporción de partículas inorgánicas (del sedimento resuspendido) y detríticas (Urrutia *et al.*, 1996), las cuales poseen abundantes polisacáridos refractarios tales como celulosa o xilano. Por ello, cabe esperar que la adaptación a la vida infaunal exija el desarrollo de un aparato digestivo extracelular más eficaz. Esto podría expresarse en forma de diferencias significativas en a) el tamaño relativo del estilo cristalino en relación al resto de tejidos y b) una mayor actividad relativa de los enzimas involucrados en la hidrólisis de carbohidratos refractarios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS BIVALVOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos especies de bivalvos infaunales, y dos epifaunales.

INFAUNALES:

- Almeja, n=15 (*Ruditapes decussatus*)
- Berberecho, n=15 (*Cerastoderma edule*)

EPIFAUNALES:

- Mejillón, n=15 (*Mytilus galloprovincialis*)
- Ostra, n=15 (*Ostrea edulis*)

Las almejas, los berberechos y las ostras fueron adquiridos en un vivero situado en Deusto (Bilbao) a finales del mes de abril y los mejillones se recogieron en el Puerto Viejo de Algorta en las mismas fechas.

Con el objetivo de homogeneizar las muestras y obtener unas condiciones óptimas para la disección, una vez trasladados al laboratorio los animales se mantuvieron durante una semana en tanques de agua de mar provistos de aireación y control de la temperatura. Además, durante este tiempo se alimentó a los bivalvos con Shellfish Diet 1800®, un preparado compuesto por seis microalgas marinas: *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira weissflogii* y *Thalassiosira pseudonana*.

3.2. DISECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras una semana de mantenimiento de los bivalvos en el laboratorio se procedió a la disección y extracción del estilo cristalino y el resto de tejidos blandos de cada animal.

Los estilos se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido, y se introdujeron en criotubos previamente etiquetados con la especie y el número del individuo. A continuación, se sometieron a un proceso de liofilización durante 24 horas para evitar la desnaturalización de las proteínas presentes en las muestras. Una vez liofilizados los estilos cristalinos se conservaron en un congelador a -20°C hasta su uso.

Por otro lado, el resto de tejidos de cada animal, etiquetados de la misma forma que los estilos, se secaron durante 48 horas en estufa de desecación a 100°C , con el objetivo de determinar posteriormente su peso seco.

3.3. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

3.3.1. Preparación de los sustratos

Los sustratos se prepararon en forma de disoluciones al 1% (peso/volumen) en tampón citrato-bifosfato 0,1M conteniendo 20mM NaCl, pH=6.5.

- Almidón: SIGMA S-9765
- Celulosa: Biochemical BDH 27929
- Laminarina: SIGMA L9634-5G
- Xilano: SIGMA X0627-10G

Una vez preparadas, las disoluciones se cocieron durante 15 minutos para su homogeneización.

3.3.2. Preparación del extracto enzimático

Antes de comenzar a preparar los extractos, los estilos se pesaron y se anotaron los datos distinguiendo especie e individuo. Justo antes de la utilización de cada estilo, se homogeneizaron en tampón citrato-bifosfato 0,1M conteniendo 20mM de NaCl, pH=6.5. Para ello se utilizó un homogeneizador manual de vidrio sobre hielo. El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C y para los ensayos se utilizó el sobrenadante obtenido.

La concentración de estilo cristalino utilizada en los extractos fue de 0.1mg peso seco/mL.

3.3.3. Determinación de las actividades carbohidrasa

Para ello se siguió una adaptación del método Nelson-Somogyi, que tiene como principio la determinación del poder reductor de la mezcla mediante colorimetría.

Para comenzar se incuban durante 30 minutos en baño a 20°C con agitación 0,5 mL de extracto enzimático con 0,5 mL de cada uno de los substratos. Una vez transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 1mL de reactivo de Somogyi, se agita con vórtex y se cuece durante 15 minutos. A continuación, se enfría la mezcla durante 10 minutos en baño de agua fría, y después se añaden 2mL de reactivo de Nelson previamente diluido con sulfúrico 1,5N.

Por último, se diluye el contenido de cada tubo añadiendo 6mL de agua destilada y se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos. El color desarrollado por la reacción química se determina en el espectrofotómetro a 600nm.

Simultáneamente se preparan los controles con cada uno de los substratos. El procedimiento para ello es el mismo, con la excepción de que en este caso el tiempo de incubación es 0.

Cada una de las mezclas se preparó por triplicado, y la curva de calibrado para la colorimetría se realizó con maltosa en un rango de concentración de 0-200 µg/mL.

Para calcular la cantidad de azúcar reductor liberado en cada reacción, se aplica la siguiente expresión:

$$\frac{[Maltosa_{t=incubación}] - [Maltosa_{t=0}]}{Tiempo\ incubación} \quad (1)$$

Siendo en este caso el tiempo de incubación 0,5 horas. A continuación, se calcula la actividad específica por mg de estilo así como la actividad total para cada estilo por gramo de animal, puesto que las especies utilizadas tienen masas corporales bastante distintas. Esto se obtiene multiplicando la actividad específica por mg de estilo por los mg de estilo de cada individuo y después dividiéndolo entre el peso de cada uno de ellos.

4. RESULTADOS

Durante la fase de mantenimiento en los tanques del laboratorio y en la disección se perdieron algunas de las muestras, por lo que se obtuvieron resultados para 8 almejas, 7 berberechos, 8 mejillones y 10 ostras.

4.1. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL ESTILO CRISTALINO

Al calcular el porcentaje medio del peso seco del estilo cristalino respecto al resto de tejidos blandos para cada especie no se observaron diferencias significativas entre mejillón y ostra ni entre almeja y berberecho. Como puede apreciarse en la **Figura 1**, las dos especies infaunales presentan un estilo más grande en relación a su peso (en torno al 0,7-0,8%), mientras que para las especies epifaunales el porcentaje medio se aproxima al 0,6%.

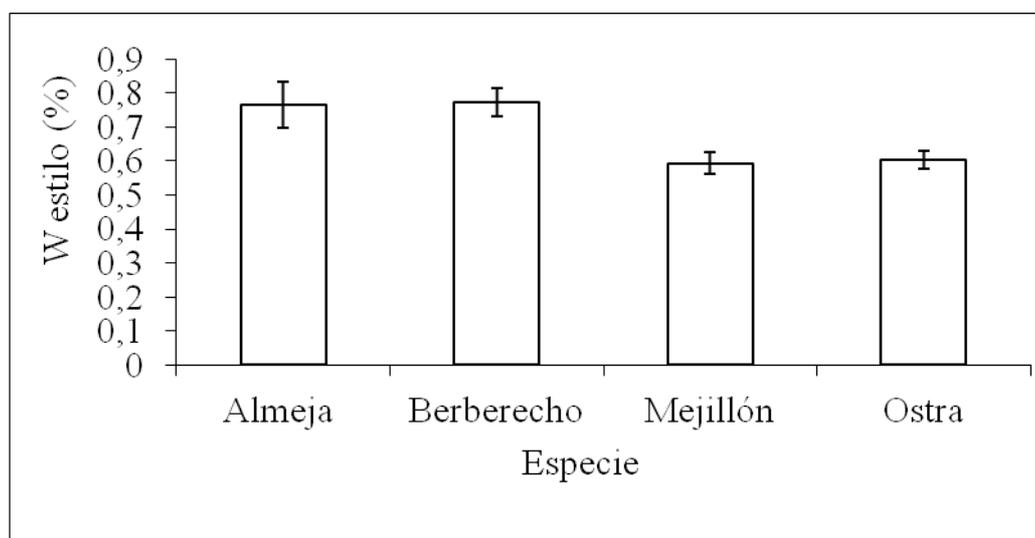


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje del peso seco del estilo cristalino respecto al peso seco del resto de tejidos blandos del animal. Se evaluó este porcentaje para todos los individuos (Almeja: n=8, Berberecho: n=7, Mejillón: n=8, Ostra: n=10), y se calculó el valor medio para cada especie.

4.2. RESULTADO DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

4.2.1. Actividad específica obtenida por especie.

Tal y como se muestra en la **Figura 2**, la actividad por mg de estilo obtenida en las 4 especies al utilizar el almidón como sustrato fue notablemente mayor que el resto de actividades testadas. En almeja y ostra la segunda actividad más alta detectada fue la xilanasa, mientras que en berberecho y mejillón fue la laminarinasa. Por otro lado, la celulasa fue la actividad más baja en almeja y berberecho, mientras que en mejillón y ostra fueron la xilanasa y la laminarinasa respectivamente.

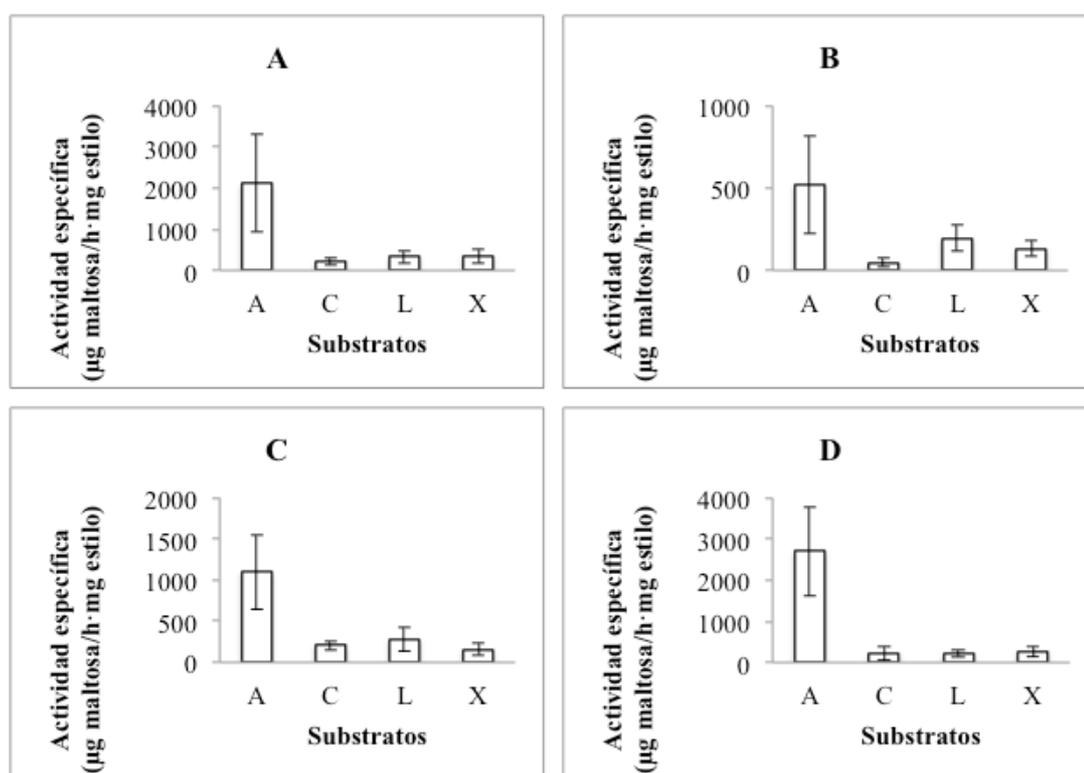


Figura 2. Representación gráfica de la actividad específica obtenida (μg maltosa liberados/h·mg estilo) con cada uno de los sustratos para cada especie. A: almeja, n=8; B: berberecho, n=7; C: mejillón, n=8; D: ostra, n=10.

4.2.2. Comparación de la actividad específica entre especies.

Los resultados de la actividad específica (μg maltosa liberados/h \cdot mg estilo) se muestran en la **Figura 3** clasificados por actividades para visualizar las diferencias entre especies.

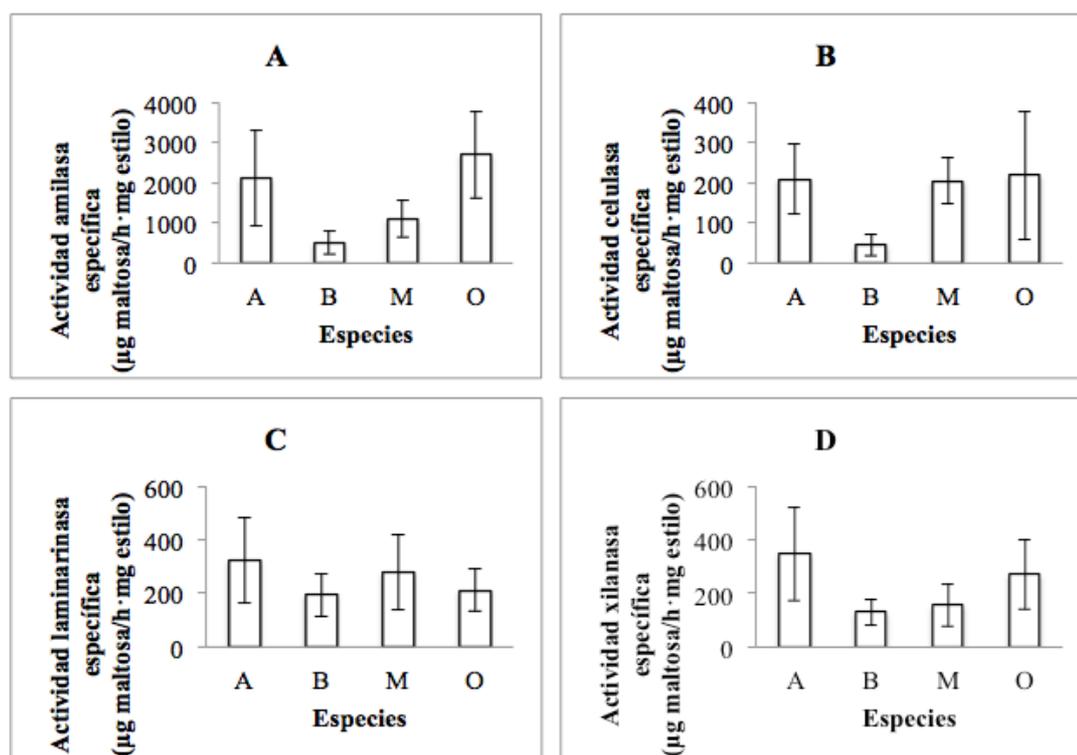


Figura 3. Representación gráfica de las actividades específicas obtenidas (μg maltosa liberados/h \cdot mg estilo), comparación entre especies. A: Amilasa, B: Celulasa, C: Laminarinasa, D: Xilanasa.

Respecto a la actividad amilasa (**Figura 3A**), aplicando el test HSD de Tukey para comparaciones múltiples no se encontraron diferencias significativas entre almeja y ostra, con actividades amilasa más altas, y mejillón y berberecho. Sin embargo, la amilasa del berberecho si es significativamente más baja ($p < 0,05$) que la de la almeja y la ostra, mientras que la del mejillón sólo es significativamente más baja que la de la ostra. En la **Tabla 1** se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos (DHS de Tukey).

Tabla 1. Resultado del test Honestly-significant-difference de Tukey para la actividad amilasa. Clasificación de las especies en subconjuntos homogéneos en función de su actividad amilasa media. N= número de individuos de cada especie. $p = 0,05$.

AMILASA ESPECÍFICA 1 ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$ estilo)				
DHS de Tukey				
ESPECIE	N	Subconjunto		
		1	2	3
Berberecho	7	518,24029		
Mejillón	8	1095,24775	1095,24775	
Almeja	8		2110,65163	2110,65163
Ostra	10			2704,27260
Sig.		,557	,115	,534

En cuanto a la actividad celulasa específica (**Figura 3B; Tabla 2**), se obtuvieron dos subconjuntos homogéneos al aplicar el test DHS de Tukey, aunque la actividad celulasa media en berberechos se obtuvo aproximadamente $165\mu\text{g}$ maltosa/h·mg estilo inferior a la del resto de especies. Además, en el subconjunto 1 $p=0,05$, con lo cual se encuentra en el límite de la significación.

Tabla 2. Resultado del test Honestly-significant-difference de Tukey para la actividad celulasa. Clasificación de las especies en subconjuntos homogéneos en función de su actividad celulasa media. N= número de individuos de cada especie. $p = 0,05$.

CELULASA ESPECÍFICA 1 ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$ estilo)			
DHS de Tukey			
ESPECIE	N	Subconjunto	
		1	2
Berberecho	7	44,78180	
Mejillón	8	205,10583	205,10583
Almeja	8	208,93888	208,93888

Ostra	10		218,00830
Sig.		,050	,996

Los resultados para la actividad laminarinasa específica a simple vista no revelan diferencias significativas entre ninguna de las cuatro especies (**Figura 3C**). Esto se confirma al realizar el test DHS de Tukey y obtener un solo subconjunto (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultado del test Honestly-significant-difference de Tukey para la actividad laminarinasa. Clasificación de las especies en subconjuntos homogéneos en función de su actividad laminarinasa media. N= número de individuos de cada especie. $p = 0,05$.

LAMINARINASA ESPECÍFICA 1		
($\mu\text{g/h} \cdot \text{mg estilo}$)		
DHS de Tukey		
ESPECIE	N	Subconjunto
		1
Berberecho	7	193,65814
Ostra	10	211,75950
Mejillón	8	277,61800
Almeja	8	324,79913
Sig.		,147

Por último, la actividad xilanasas específica (**Figura 3D, Tabla 4**) es significativamente mayor ($p < 0,05$) en almeja que en berberecho y mejillón. Sin embargo, esta actividad en las ostras presenta un valor intermedio y no es significativamente distinta a la de ninguna especie.

Tabla 4. Resultado del test Honestly-significant-difference de Tukey para la actividad xilanasa. Clasificación de las especies en subconjuntos homogéneos en función de su actividad xilanasa media. N= número de individuos de cada especie. $p = 0,05$.

XILANASA ESPECÍFICA 1 ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{mg}$ estilo)			
DHS de Tukey			
ESPECIE	N	Subconjunto	
		1	2
Berberecho	7	130,67586	
Mejillón	8	155,78225	
Ostra	10	270,42720	270,42720
Almeja	8		347,36375
Sig.		,111	,576

4.2.3. Actividad total por gramo de animal

La **Figura 4** muestra los datos de actividad total por gramo de animal, es decir, actividad por estilo cristalino, entre el peso de los individuos para cada una de las cuatro especies.

Se observa, al igual que con la actividad específica, que en todos los casos la actividad amilasa es notablemente superior al resto de actividades carbohidrasa. Por otra parte, la actividad celulasa total por gramo de animal en los berberechos es notablemente más baja que en el resto de especies, en las que se obtuvieron valores bastante similares.

En cuanto a la actividad laminarinasa, la mayor actividad total por gramo de animal se detectó en las almejas, aunque los valores son bastante parecidos en todas las especies.

Por último, la mayor actividad xilanasa total por gramo de animal también se obtuvo en las almejas, y la más baja en los mejillones.

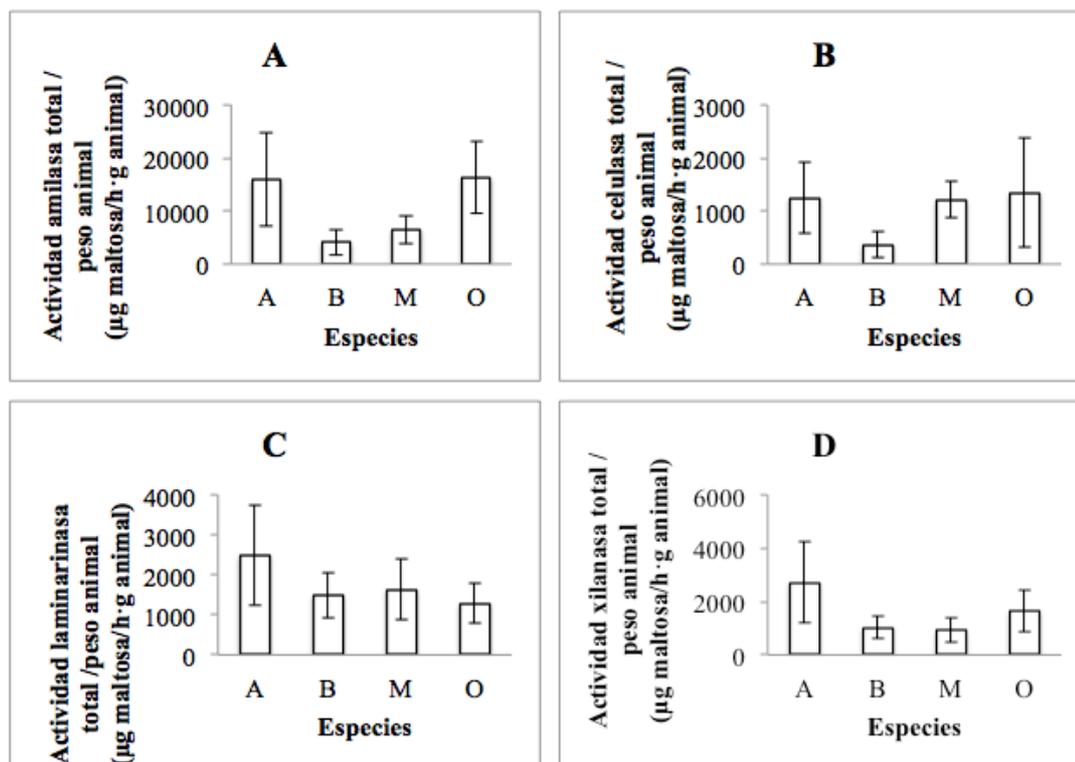


Figura 4. Representación gráfica de las actividades totales por estilo entre el peso de cada individuo (μg maltosa liberados/h·g animal), comparación entre especies. A: Amilasa, B: Celulasa, C: Laminarinasa, D: Xilanasa.

5. DISCUSIÓN

En estudios anteriores a este se han realizado con distintos fines determinaciones del peso y longitud del estilo cristalino en *Cerastoderma edule* (Ibarrola *et al.* 1998), *Mytilus galloprovincialis* (Alyakrinskaya, 2001), *Ruditapes decussatus* (Albentosa y Moyano, 2008), y *Ostrea edulis* (Morton, 1971; Langton y Gabbott, 1974), pero hasta la fecha no se había realizado una comparación entre especies del peso del estilo cristalino respecto al resto de tejidos blandos del animal.

En el presente trabajo se realizó una comparación entre esas cuatro especies de bivalvos, y los resultados revelaron diferencias entre las especies infaunales (almeja y berberecho) y las epifaunales (mejillón y ostra) (**Figura 1**).

En el caso de las especies infaunales, la proporción del tamaño del estilo cristalino resultó ser significativamente mayor, hecho que respalda la hipótesis planteada en el apartado de objetivos que establece que esta diferencia de tamaño podría revelar una mayor relevancia de la digestión extracelular en los bivalvos infaunales.

Un relativamente mayor peso del estilo cristalino en los bivalvos infaunales indicaría una mayor capacidad para la hidrólisis mecánica de las partículas, circunstancia que sería ventajosa en dicho hábitat. Los infaunales se encuentran enterrados en los fondos marinos y por ello, es esperable una contribución alta de partículas detríticas compuestas por material refractario cuya digestión requeriría una mayor acción mecánica.

Con respecto a las actividades enzimáticas en el estilo cristalino, parece evidente que las cuatro especies muestran patrón similar de distribución de carbohidrasas (**Figura 2**): la amilasa es el enzima que presenta la mayor actividad específica en todas las especies, mientras que las otras tres carbohidrasas presentan actividades mucho más débiles. Este resultado coincide con los hallados anteriormente por varios autores, como Brock y Kennedy (1992) en varias especies infaunales y epifaunales, o Ibarrola *et al.*, (1998) en *C. edule*.

Sobre este patrón general, hay diferencias entre especies en los valores de actividad específica (μg maltosa liberados/h·mg estilo, **Figura 3**) que se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) Almejas y ostras presentaron valores de actividad amilasa específica significativamente superiores a los hallados en berberecho y mejillón. El valor medio de amilasa específica en ostras prácticamente duplicó al de mejillones y fue cuatro veces superior al hallado en berberechos. Este patrón interespecífico es muy parecido para la xilanasa, para la cual se obtuvo un valor significativamente mayor en almeja que en berberecho y mejillón, y un valor intermedio para las ostras.
- b) Los valores de actividad celulasa específica resultaron especialmente bajos en los berberechos. No se registraron diferencias significativas entre almejas, ostras y mejillones, que alcanzaron valores de celulasa específica superiores a los registrados con el berberecho.

- c) No se hallaron diferencias interespecíficas en la actividad laminarinasa desarrollada por el estilo cristalino.

Los resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas e importantes entre especies, fundamentalmente en actividad amilasa (que fue la actividad más alta detectada) y xilanas. No obstante, las diferencias no están asociadas al hábitat (epifaunal vs infaunal) ya que fundamentalmente se diferencian almejas y ostras frente a berberechos y mejillones. Por otro lado, cabe destacar que durante el periodo de mantenimiento de los animales en el laboratorio surgieron algunos problemas con los berberechos, la mortalidad fue más elevada que en el resto de especies y los animales no parecían encontrarse en condiciones óptimas en el momento de su disección, que tuvo que realizarse de manera precipitada para evitar la pérdida de más individuos de la muestra. Puede que esta circunstancia haya motivado un sesgo en los resultados.

Al objeto de establecer comparaciones entre especies en la composición del pool enzimático que actúa en el estilo cristalino se realizó una aproximación a partir de los datos de actividad total (**Figura 4**, μg maltosa liberados/h·g animal). Para ello se calculó el porcentaje relativo de actividad de cada carbohidrasa para cada una de las especies con respecto a la actividad conjunta de carbohidrasas computada como la suma de las cuatro actividades determinadas en el estilo (**Tabla 5**). Este cálculo se realizó con la actividad total por estilo entre el peso del animal y no con la actividad específica con el objetivo de tener en cuenta tanto el tamaño del estilo, relativamente mayor en las especies infaunales, como el tamaño del animal, puesto que se trata de distintas especies.

Tabla 5. Porcentajes de la actividad total por estilo por gramo de individuo para cada una de las especies. Se calcularon a partir de los resultados de actividad total obtenidos (μg maltosa liberados/h·g animal).

ACTIVIDAD	ESPECIE			
	Almeja	Berberecho	Mejillón	Ostra
Amilasa	71%	59%	63%	79%
Celulasa	6%	5%	12%	7%
Laminarinasa	11%	21%	16%	6%
Xilanas	12%	15%	9%	8%

Las actividades de las cuatro carbohidrasas muestran que la composición del pool enzimático del estilo cristalino difiere entre especies. La amilasa es el enzima que presenta mayor actividad relativa en todas las especies (de 60 a 80% de la actividad conjunta sumando las actividades de las cuatro carbohidrasas). Concretamente en *O. edulis* la amilasa constituye prácticamente el total de la actividad carbohidrasa.

Las otras tres carbohidrasas testadas presentan actividades siempre menores a la amilasa, y sus contribuciones relativas muestran diferencias interespecíficas. La celulasa es en general la carbohidrasa con menor contribución relativa, coincidiendo con los resultados obtenidos por Brock y Kennedy (1992) en varias especies infaunales y epifaunales. En general está aceptado que los niveles de actividad celulasa suelen ser más bajos en comparación con los de otras carbohidrasas, pero se han documentado excepciones como la especie de mejillón *Mytilus chilensis* en la que el complejo celulasa es el enzima más importante tanto en la glándula digestiva como en el estilo cristalino (Labarta *et al.*, 2002). En la especie de mejillón utilizada en este estudio (*Mytilus galloprovincialis*) la actividad celulasa también supone un porcentaje de la actividad total más elevado (12%) con respecto a las otras especies (en torno al 6%).

La contribución porcentual de las laminarinasas parece superior en el berberecho y el mejillón, y la actividad xilanasa es especialmente elevada en las especies infaunales, en las que representa un 12-15% de la actividad conjunta frente al 8-9% de las especies epifaunales. Estos datos si sugieren la existencia de un efecto asociado al hábitat ya que la xilanasa es una actividad específicamente ligada a la hidrólisis de material detrítico. Además, resulta significativo que la contribución de la actividad xilanasa en berberechos es más alta que en las otras especies, a pesar de la baja actividad registrada en general en los enzimas digestivos de estos organismos, probablemente asociada a un estado fisiológico deficiente.

6. CONCLUSIONES

- 1) La proporción del tamaño del estilo cristalino en relación al resto de tejidos blandos es mayor en las especies infaunales *Ruditapes decussatus* y *Cerastoderma edule* que en las epifaunales *Mytilus galloprovincialis* y *Ostrea edulis*. Esto sugiere una mayor relevancia de la función mecánica del estilo cristalino en las especies infaunales.
- 2) La amilasa es la carbohidrasa más importante en el estilo cristalino de *Ruditapes decussatus*, *Cerastoderma edule*, *Mytilus galloprovincialis* y *Ostrea edulis*.
- 3) La celulasa es la carbohidrasa con menos actividad específica y total por gramo de animal en el estilo cristalino de *R. Decussatus* y *C. edule*, mientras que la xilanasa lo es en *M. galloprovincialis* y la laminarinasa en *O. edulis*.
- 4) No se hallaron diferencias interespecíficas en la actividad laminarinasa desarrollada por el estilo cristalino de *Ruditapes decussatus*, *Cerastoderma edule*, *Mytilus galloprovincialis* y *Ostrea edulis*.
- 5) La xilanasa es la segunda carbohidrasa de mayor importancia en el estilo cristalino de la almeja *Ruditapes decussatus*, con valores de actividad específica y total superiores a los de *C. edule*, *M. galloprovincialis* y *O. edulis*. Además, la xilanasa representa un porcentaje superior de la actividad carbohidrasa del estilo cristalino en las especies infaunales que en las epifaunales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Albentosa, M., Moyano F. J. 2008. Differences in the digestive biochemistry between the intertidal clam, *Ruditapes decussatus*, and the subtidal clam, *Venerupis pullastra*. *Journal of Sea Research*. Vol. 59: 249-258.

Alexander, C. G., Cutler, R. L., Yellowless, D. 1979. Studies on the composition and enzyme content of the crystalline style of *Telescopium telescopium*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Vol. 64: 83-89.

Alyakrinskaya, I. O. 2001. The dimensions, characteristics and functions of the crystalline style of molluscs. *Biology Bulletin*. Vol. 28: 523-535.

Bayne, Brian L. 1993. Feeding physiology of bivalves: Time-Dependence and compensation for changes in food availability, en: Richard F. Dame, (Ed). *Bivalve Filter Feeders*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Vol. 33, pp 1-24.

Brock, V., Kennedy, V. S. 1992. Quantitative analysis of crystalline style carbohydrases in five suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 159: 51-58.

Cargnin-Ferreira, E., Sarasquete C. 2008. *Histofisiología de moluscos bivalvos marinos*, CSIC, Madrid.

Craigie, J. 1990. Cell walls, en: Cole, K. M., Sheath, R. (Eds). *Biology of the red algae*, University of Cambridge Press, Cambridge, pp 221-258

Fielding, P.J., Harris, J. M., Lucas, M. I., Cook, P. A. 1987. Implications for the assessment of crystalline style activity in bivalves when using the Bernfeld and

Nelson-Somogy assays for reducing sugars. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 101: 269-284.

Frei, E., Preston, R. 1964. Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. I. Xylan in siphonous green algae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. Vol. 160: 293-353

George, W. C. 1952. The digestion and absorption of fat in lamellibranchs. *Biological Bulletin*. Vol. 102, 118-127.

Hawkins A. J., Navarro E., Iglesias J. I. 1990. Comparative allometries of gut-passage time, gut content and metabolic faecal loss in *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*. *Marine Biology*. Vol 105: 197-204.

Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M. 2012. *Animal Physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA.

Huvet, A., Jeffroy, F., Daniel, J. Y., Quéré, C., Le Souchu, P., Van Wormhoudt, A., Boudry, P., Moal, J., Samain, J. F. 2012. Starch supplementation modulates enzymatic properties and amylase B mRNA level in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Vol. 163: 96-100

Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias J. I., Urrutia, M.B., Navarro, E. 1998. Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. Vol. 121: 25-34.

Kreeger, D. A. 1993. Seasonal patterns in utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. Marine Ecology Progress Series. Vol. 95: 215-232.

Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Velasco, A. 2002. Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. Marine Biology. Vol. 140: 669-676.

Langton, R. W., Gabbott, P. A. 1974. The tidal rhythm of extracellular digestion and the response to feeding in *Ostrea edulis*. Marine Biology. Vol. 24: 181-187.

Lucas, M. I., Newell, R.C. 1984. Utilization of saltmarsh detritus by two estuarine bivalves: carbohydrase activity of crystalline style enzymes of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the mussel *Geukensia demissa* (Dillwyn). Marine Biology Letters. Vol. 5: 275-290.

Morton, B. 1971. The diurnal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 3: 329-342.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 153: 375-380.

Newell, R. C., Parker, I., Cook, P. A. 1980. A possible role of α -amylase isoenzymes from the style of the mussel *Choromytilus meridionalis* (Krauss) following thermal acclimation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 47: 1-8.

Patton, J.S., Quin, J.G. 1973. Studies on the digestive lipase of the surf clam *Spisula solidissima*. Marine Biology. Vol. 21: 59-69.

Ren, G., Tang, J. Y., Wang, Y. 2014. Molecular characterization and expression of and α -amylase gene (HcAmy) from the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*. Genetics and Molecular Research. 6653-6664.

Sakamoto, K., Haruhiko, T. 2009. A comparative study of cellulase and hemicellulose activities of brakish water clam *Corbicula japonica* with those of other marine Veneroida bivalves. The Journal of Experimental Biology. Vol. 212: 2812-2818.

Seiderer, L. J., Newel, R. C., Cook, P. A. 1982. Quantitative significance of style enzymes from two marine mussels (*Choromytilus meridionalis* Krauss and *Perna perna* Linnaeus) in relation to diet. Marine Biology Letters. Vol. 3: 257–271.

Sisini, A., Corrias, B. 1964. Peptidase activity in the crystalline style and in the hepatopancreas of *Solen siliqua*. Bolletino Societa Italiana Biologia Sperimentale. Vol. 40: 24.

Somogyi, M. Notes on sugar determination. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 195: 19-23.

Urrutia, M. B., Iglesias, J. I., Navarro, E., Prou, J. 1996. Feeding and absorption in *Cerastoderma edule* under environmental conditions in the bay of Marennes-Oleron (western France). Journal of the Marine Biological Association UK Vol. 76: 431-450

Ward, J. E., Beninger, P. G., MacDonald B. A., Thompson R. J. 1991. Direct observations of feeding structures and mechanisms in bivalve molluscs using endoscopic examination and video image analysis. Marine Biology. Vol. 111: 287-291.

Wojtowicz, M. B. 1972. Carbohydrases of the digestive gland and the crystalline style of the atlantic deep-sea scallop (*Placopecten magellanicus*, gmelin). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. Vol.43: 131-141.

Yonge, C. M. 1923. Studies on the comparative physiology of digestion 1: The mechanism of feeding, digestion and assimilation in the Lamellibranch *Mya*. The Journal of Experimental Biology. Vol. 1: 15-64.

