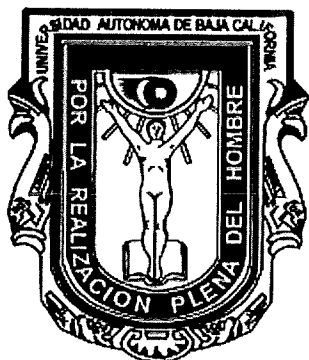




**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
OCEANOLOGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA
COSTERA**

**BUSQUEDA DE ACTIVIDAD CITOTOXICA Y
ANTIBIOTICA EN EXTRACTOS DE ESPONJAS
MARINAS Y DE SUS BACTERIAS SIMBIONTES.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
AMAYALY BECERRIL ESPINOSA**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA.

2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS

POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

BUSQUEDA DE ACTIVIDAD CITOTOXICA Y ANTIBIOTICA EN

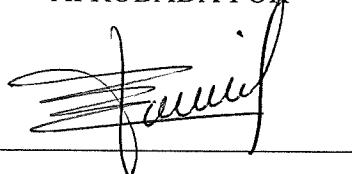
EXTRACTOS DE ESPONJAS MARINAS Y DE SUS BACTERIAS

SIMBIONTES.

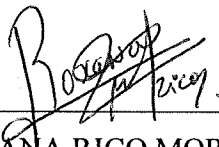
**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA
PRESENTA:**

AMAYALY BECERRIL ESPINOSA

APROBADA POR

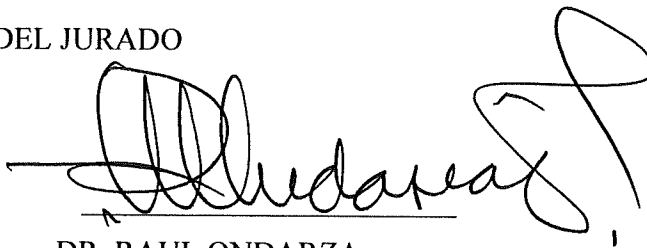


**DRA. IRMA ESTHELA SORIA MERCADO
PRESIDENTE DEL JURADO**



DRA. ROXANA RICO MORA

SINODAL



DR. RAUL ONDARZA

SINODAL

La presente Tesis se realizó en la Universidad Autónoma de Baja California en la Facultad de Ciencias Marinas bajo la dirección de la Dra. Irma E. Soria Mercado. Durante el desarrollo de este trabajo se contó el apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIA

A Dios,

Por darme la vida y por permitirme que nada me falte.

A Héctor

*por su amor, su paciencia, su cariño, su comprensión, su apoyo,
su amistad, por ser mi cómplice y por estar con migo
en las buenas y en las malas.*

A mi Mamá Luz Espinosa

*por su amor, sus enseñanzas, su apoyo, por impulsarme
a superarme en todos los aspectos.*

A mi Papá Salvador Becerril

por estar con migo, por su amor y su cariño.

A mis Hermanos Erik y Salvador,

*quienes a pesar de la distancia siempre han estado con migo
apoyándome y animándome, con todo mi amor, para que nunca se detengan en la vida
y cumplan todas de sus metas.*

A mi querida Valeria

por ser una niña tan inteligente, con todo mi amor.

DEDICATORIA

A la memoria a mi Abuelita Luz siempre la recordare.

A Georgina. A mis tíos Conchita, José, Ricardo y Gloria. A mis primos Fer, May, Ale, Martha, Luz, Chava, Paty, Sara, Esthela, Vero. A mis sobrinos, Celia, José A, Orlando, Cesar, Beto, Martín, Carlitos, Anita, Maricruz. A los que ya nacieron y no conozco y a todos los que vendrán. Por todos los momentos que hemos pasado y pasaremos, por que siempre estaremos juntos aun en la distancia, por todo su amor y su cariño.

A mi segunda Familia por el apoyo brindado.

El amor, el cariño y la unión de todos ustedes son pieza clave de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Soria Mercado por su acertada dirección de esta tesis, quien siempre mantuvo una dedicada atención para apoyarme académicamente, brindándome invaluableles sugerencias para el desarrollo de este trabajo. Gracias por su confianza y su amistad.

A la Dra. Roxana Rico por su valiosa asesoría y acertada supervisión así como sus enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Raúl Ondarza por el aporte de sus conocimientos, disposición e invaluableles comentarios, para el enriquecimiento de esta tesis.

Al Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía Scripps de la Universidad de California en San Diego, por haberme permitido realizar parte de este trabajo en sus instalaciones

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California, quien a través del personal docente, personal administrativo y demás, que la conforman, siempre estuvieron dispuestos a colaborar, en la medida de sus facultades con este proyecto.

A J Young, Ana Paula, Kwon y Irma por su ayuda en la obtención de espectros de RMN y de masas.

A Héctor Ocampo, Alejandra Prieto y Maribel Padilla por su ayuda en la identificación de las bacterias

A Francisco Becerril, Alejandra Prieto y Angel Herrera por su ayuda en la colecta de las esponjas.

A Mónica por recibirme con toda mi familia en su casa, sin aun conocerme, gracias.

A todos mis amigos del presente y del pasado, por su ayuda y amistad.

RESUMEN

Se realizó un muestreo en la zona que lleva por nombre “La Bufadora” ubicada en La Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México., colectándose cinco especies de esponjas que fueron identificadas como *Plocania igzo*, *Sphaciospongia confoederata*, *Craniella arb*, *Cliona* sp y *Haliclona* sp, de las cuales se aisló un total de 43 cepas de bacterias. Por medio de ensayos de inhibición de crecimiento entre las bacterias aisladas se seleccionaron las cepas candidatas como posibles productoras de algún compuesto bioactivo. En donde se obtuvo un 17.5% de interacciones inhibitorias de crecimiento y un 15% de interacciones bacteriostáticas. Las cepas que presentaron actividad de inhibición de crecimiento contra otras cepas fueron: R-3 y R-7b aisladas de la esponja *Plocania igzo*, la cepa M-4 procedente de *Sphaciospongia confoederata*, las cepas T-1 y T-2 aisladas de *Craniella arb*, las cepas N-5en y N-5p aisladas de la esponja *Cliona* sp. Tres de estas cepas se pudieron identificar de acuerdo al 16S rRNA, la cepa R-3 tuvo una homología del 96% a *Pseudovibrio*, la cepa M-4 presentó una homología de 83% a *Bacillus* sp. y la cepa T-2 tuvo una homología del 84% a *Vibrio*.

Se realizó el cultivo de 1 L de las siete cepas anteriores y se obtuvieron los extractos correspondientes. De los siete extractos bacterianos obtenidos, dos presentaron actividad contra células de carcinoma colorectal HCT116, la cepa M-4 fracción metanol 100% con un IC_{50} de $25.64 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la cepa T-1 fracción agua: metanol, 1:3 con un IC_{50} de $73.22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Así mismo, el extracto de la cepa T-1 presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Proteus vulgaris*, además, el extracto de la cepa R-3 presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*.

Con los resultados de las actividades citotóxica y antibiótica y el análisis químico de los extractos de la esponja *Craniella arb* y de su bacteria simbionte T-1, se propone que la cepa T-1 contribuye con la producción de compuestos que se almacena en la esponja y que pueden ser bioactivos. Basándonos en que la bioactividad contra células de carcinoma colorectal HCT116 IC_{50} es muy similar, de $72.255 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la esponja y de $73.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la bacteria, además, por que en el análisis espectroscópico de ^1H RMN y de masas se encontró un compuesto con ion molecular de 422 que se encuentra en el extractos de la esponja y de la bacteria.

INDICE

Lista de Figuras.	i
Lista de Gráficas.	iii
Lista de Tablas.	iv
Lista de Espectros	vi
Introducción.	1
Antecedentes.	4
Hipótesis.	15
Objetivos.	16
Metodología.	17
Área de colecta.	18
Identificación de esponjas.	19
Aislamiento de bacterias asociadas a las esponjas.	19
Identificación de las bacterias	21
Análisis filogenéticos	22
Pruebas bioquímicas.	22
Inhibición de crecimiento de bacterias entre ellas mismas.	22
Curvas de crecimiento.	24
Preparación de extractos.	25
Actividad antibacteriana de los extractos de las esponjas y de las bacterias.	26

Medios de cultivo.	27
Purificación de compuestos.	28
Resultados y discusión.	
Parte I.	
Identificación de esponjas.	31
Parte II.	
Aislamiento de bacterias asociadas a las esponjas.	37
Parte III.	
Pruebas de inhibición de crecimiento entre bacterias	45
Parámetros poblacionales de las bacterias	49
Parte IV.	
Actividad citotóxica y antibacteriana de esponjas y bacterias.	52
Parte V.	
Análisis químico.	59
Conclusiones.	79
Referencias	82
Anexo.	89

Lista de figuras

Figura	Página
1 Partes de la esponja	6
2 Localización del área de colecta, mapa de Bahía de Todos Santos BC.	18
3 Diagrama de las medidas de inhibición	24
4 Tipos de espículas presentes en la esponja <i>P. izgo</i>	32
5 Tipos de espículas presentes en la esponja <i>S. confoederata</i>	33
6 Tipos de espículas presentes en la esponja <i>C. arb</i>	34
7 Tipos de espículas presentes en la esponja <i>Cliona</i> sp	35
8 Tipos de espículas presentes en la esponja <i>Haliclona</i> sp	36
9 Cromatograma de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción diclorometano de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	60
10 Cromatograma de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separada por HPLC	61

Continuación. Lista de figuras

- | | | |
|----|--|----|
| 11 | Cromatograma de LC/MS del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC | 63 |
| 12 | Cromatograma de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 | 66 |
| 13 | Cromatograma de LC/MS del pico 4 con obtenido por HPLC de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 | 67 |
| 14 | Cromatograma de LC/MS de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i> | 71 |
| 15 | Cromatograma de LC/MS de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i> | 73 |

Lista de gráficas

Gráfica	Página
1 Frecuencia de cepas bacterianas que crecieron en diferentes medios de cultivo.	39
2 Densidad óptica de las cepas bacterianas alcanzada a los 5 días de cultivo.	53
3 Curva de crecimiento de la cepa R-3	89
4 Curva de crecimiento de la cepa R-7b	89
5 Curva de crecimiento de la cepa M-4	90
6 Curva de crecimiento de la cepa T-1	90
7 Curva de crecimiento de la cepa T-2	91
8 Curva de crecimiento de la cepa N-5en	91
9 Curva de crecimiento de la cepa N-5p	92

Lista de tablas

Tabla	Página
I Cepas de bacterias aisladas de las esponjas	38
II Concentración de bacterias en UFC cm ⁻³ en los diferentes medios de cultivo	40
III Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas de las cinco esponjas	42
IV Valor de inhibición del crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de las cinco esponjas.	46
V Efecto bacteriostático de las bacterias aisladas de las cinco esponjas	48
VI Parámetros poblacionales	50
VII Actividad citotóxica y antibacteriana de los extractos de las esponjas	52
VIII Actividad antibacteriana de las cepas R-3, R-7b, M-4, T-1, T-2, N-5en y N-5p	55

Continuación. Lista de tablas

IX	Pesos de los extractos bacterianos y de sus fracciones	57
X	Tamaños de las zonas de inhibición de las fracciones obtenidas de los extractos de las cepas R-3 y T-1	58
XI	Similitud en los patrones de fragmentación de los compuestos presentes en los extractos de la esponja y la bacteria T-1	77
XII	Compuestos que han sido aislados de microorganismos	78

Lista de espectros

Espectro	Página
1 ^1H RMN del pico 4 obtenido de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción diclorometano de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC	60
2 ^1H RMN del pico 4 obtenido de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC	62
3 Patrón de fragmentación del ion molecular de 499.2 con tiempo de retención de 14.61. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	63
4 Patrón de fragmentación del ion molecular de 585.2 con tiempo de retención de 15.49. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	64

Continuación. Lista de espectros

Espectro	Página
5 Patrón de fragmentación del ion molecular de 671.3 con tiempo de retención de 16.25. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	64
6 Patrón de fragmentación del ion molecular de 625.2 con tiempo de retención de 16.89. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	65
7 ¹ H RMN del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC	67
8 Patrón de fragmentación del ion molecular de 457.1 con tiempo de retención de 11.812. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC	68
9 Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.3 con tiempo de retención de 18.9. Obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC	68

Continuación. Lista de espectros

Espectro	Página
10 ^1H RMN de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i>	70
11 Patrón de fragmentación del ion molecular de 367.1 con tiempo de retención de 13.077. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i>	71
12 Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.2 con tiempo de retención de 18.618. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i>	72
13 ^1H RMN de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i>	73
14 Patrón de fragmentación del ion molecular de 367.1 con tiempo de retención de 13.069. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i>	74

Continuación. Lista de espectros

- | | | |
|----|---|----|
| 15 | Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.2 con tiempo de retención de 18.616. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i> | 74 |
| 16 | Patrón de fragmentación del ion molecular de 335.1 con tiempo de retención de 18.94. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i> | 75 |
| 17 | Patrón de fragmentación del ion molecular de 405.2 con tiempo de retención de 19.471. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H ₂ O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja <i>Craniella arb</i> | 75 |

INTRODUCCIÓN

Históricamente el estudio de los productos naturales se había enfocado en microorganismos y plantas terrestres, pero en 1960 la búsqueda de nuevos metabolitos giró en otra dirección explorando en plantas y organismos marinos de cuerpo suave como: esponjas, tunicados, briozoarios y moluscos de donde se han aislado muchos compuestos que tienen una relevante actividad biomédica (Carté, 1993; Ireland *et al.*, 1993).

Un gran número de metabolitos secundarios bioactivos que se encuentran en fase preclínica han sido aislados a partir de esponjas marinas como los compuestos halichondrin B y mycaperoxide B aislados de *Halichondria okadai* y *Mycale* sp, respectivamente. Estos compuestos son considerados como candidatos para el tratamiento del cáncer (Kijjoa y Sawangwong, 2004). Otros compuestos que están en fase preclínica son el manoalide aislado de *Luffariella variabilis* con actividad antiinflamatoria y el fármaco dithiocyanate aislado de *Oceanapia* sp con actividad contra nemátodos (Kijjoa y Sawangwong, 2004).

Por otra parte, las esponjas son organismos sésiles que obtienen su alimento del agua que filtran por lo que están expuestas a altas concentraciones de microorganismos marinos. Así mismo, son un microhábitat rico en materia orgánica ideal para que vivan los microorganismos, sin embargo, solo los microorganismos que son capaces de adaptarse morfológicamente y fisiológicamente a las condiciones de las esponjas pueden vivir en simbiosis con ellas. Se menciona que el 40% de la biomasa de las esponjas está constituido por bacterias simbiotes (Wilkinson I y II, 1978), esto es

importante en la investigación de productos naturales debido a que surge un interés ecológico para determinar si los microorganismos intervienen en la producción de metabolitos secundarios, por que se sabe que también producen metabolitos secundarios activos.

Existen trabajos que señalan a los microorganismos simbiotes de las esponjas como los responsables de la producción de los metabolitos secundarios de interés, por ejemplo Unson *et al.* (1994) reportan la producción del antibiótico 2-(2',4'-dibromofenil)-4,6-dibromofenol a partir de la cianobacteria *Oscillatoria spongelliae* simbiote de *Dysidea herbacea*. El ácido okadáico aislado en un principio de *Halichondria okadai*, en realidad es producido por un dinoflagelado del género *Prorocentrum* (Faulkner *et al.*, 2000).

Lo anterior sugiere que los microorganismo simbiotes producen los metabolitos secundarios que se depositan en el tejido de las esponjas, no obstante, no hay evidencias claras que relacionen la relación simbiótica entre la esponja y el microorganismo con la producción de los compuestos.

Una limitación en la obtención de los metabolitos secundarios de invertebrados marinos es que son producidos en pequeñas cantidades, requiriéndose colectas masivas del organismo para descubrir los fármacos y su posterior evaluación biológica. Estas limitaciones han forzado a tener otra visión en la búsqueda de nuevos compuestos aprovechando el ecosistema marino pero ahora a nivel de los microorganismos, esto presenta ventajas en la investigación, la industria y la ecología marina, porque se puede obtener mayor biomasa en el laboratorio haciendo uso de la biotecnología para cultivar al microorganismo en fermentaciones a gran escala.

La presente tesis, tuvo como objetivo la búsqueda de la actividad citotóxica y antibiótica en extractos de cinco especies de esponjas marinas y de sus bacterias simbiotes. Utilizando el término de “simbiotes” para referirnos (aunque no necesariamente) a la asociación entre dos organismos que puede ser mutualismo a comensalismo y sin especificar que sea endobiosis o epibiosis.

ANTECEDENTES

Tradicionalmente se han aislado los productos naturales a partir de plantas y desde que se descubrió la penicilina también se han utilizado los microorganismos con el mismo fin. Los productos naturales se han utilizado como fármacos por su alta eficiencia para combatir múltiples enfermedades, así mismo, su estructura química ha servido como modelo para el desarrollo de nuevos derivados sintéticos. Como ejemplos de fármacos aislados a partir de plantas se encuentra: el paclitaxel (taxol) aislado de *Taxus brevifolia*; y a partir de bacterias: la tetraciclina y la eritromicina, aisladas de *Streptomyces aereofaciens* y *Streptomyces erythraeus*, respectivamente (Talaro y Talaro, 2002).

Por muchos años se han estudiado los organismos del ambiente terrestre, sin embargo, la diversidad de plantas, microorganismos e invertebrados en el ambiente marino excede por mucho al ambiente terrestre. En este contexto desde hace 4 décadas se formó una nueva disciplina encaminada a la búsqueda de productos naturales de origen marino. Cada año son reportados en la literatura un gran número de nuevos metabolitos secundarios, procedentes de organismos marinos, con gran actividad farmacológica que son candidatos para ser usados como nuevos fármacos, principalmente en el tratamiento del cáncer. Otros compuestos son investigados como analgésicos y otros como anti-inflamatorios, lo cual indica que el ambiente marino es un reservorio excepcional de productos naturales bioactivos con estructuras químicas sin precedentes que no se encuentran en productos naturales terrestres (Faulkner, 1994).

Esponjas

Los invertebrados marinos como las esponjas, tunicados, briozoarios y moluscos acumulan gran diversidad de metabolitos con actividad farmacológica importante. A partir de esponjas se han aislado más compuestos químicos que de ningún otro filum de invertebrados marinos, muchos de estos compuestos presentan gran bioactividad con estructuras químicas únicas (Haygood *et al.*, 1999).

Las esponjas son consideradas como los metazoarios más simples (Filum Porifera). Su historia evolutiva es extremadamente larga; en el registro fósil, hay indicios de que este filum se originó en el período Cámbrico (Dixon y Brunton, 1994). Su estructura es única porque está organizada en torno a un sistema de canales de agua y presentan una superficie perforada por pequeños orificios denominados ostiolos. Dichos poros desembocan en una cavidad interior, atrio, que a su vez se abre al exterior a través del ósculo, que es una amplia abertura situada en el extremo superior del tubo. Se alimentan filtrando agua que pasa a través de los poros inhalantes hacia el atrio y sale por el ósculo (Bergquist, 1978). Filtran aproximadamente 24,000 litros de agua de mar por un kilogramo de esponja diariamente (Vogel, 1977 en Althoff *et al.*, 1998), el tamaño de las partículas filtradas varía de 5 a 50 μm y se alimentan en un 20% por plancton como dinoflagelados y en un 80% por detritus de partículas orgánicas (Bergquist, 1978). Su capacidad para utilizar esta fuente de alimento explica su éxito como organismos sésiles. La superficie exterior de su pared corporal está formada por células aplanadas denominadas pinacocitos, que constituyen el pinacodermo. Debajo del pinacodermo se encuentra el mesohilo, formado por una matriz gelatinosa de proteína que contiene

material esquelético y células ameboideas (Bergquist, 1978). Un descubrimiento muy importante es que el 40% de la biomasa del mesohilo está formado por microorganismos como bacterias heterótrofas, cianobacterias y microalgas (Wilkinson III, 1978) (Figura 1).

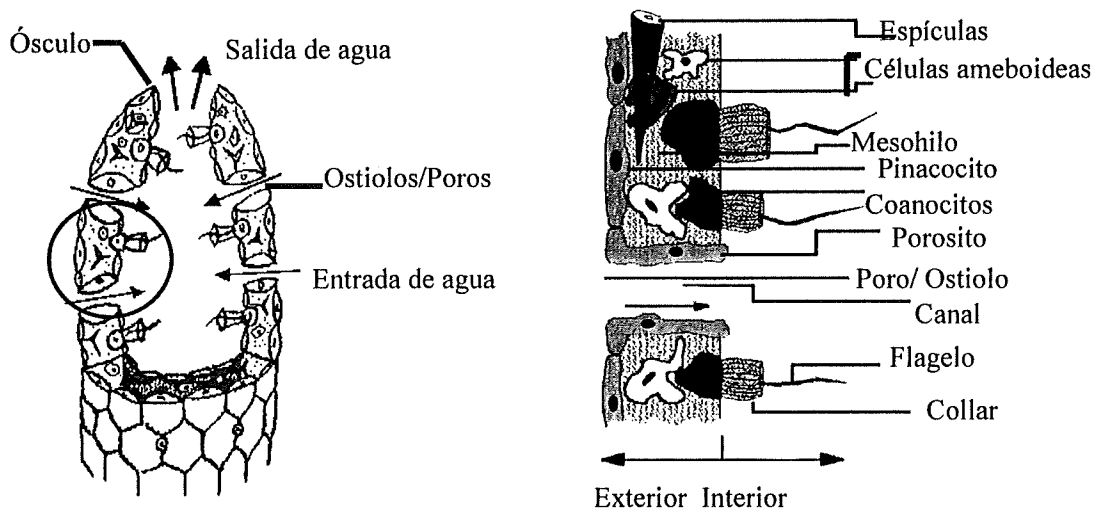


Figura 1. Partes de la esponja.

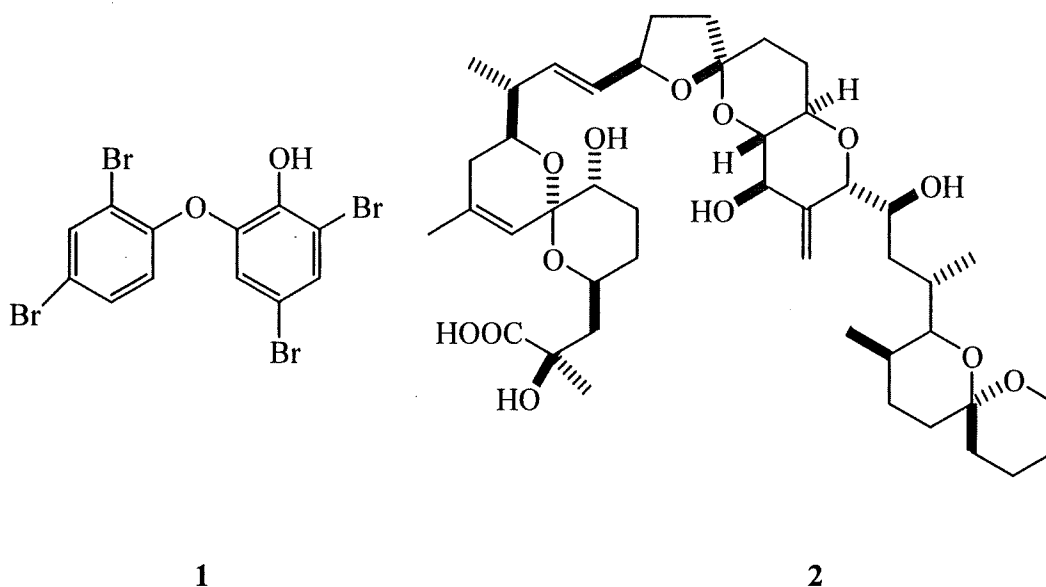
Simbiontes en esponjas

Las esponjas tienen un alto contenido de materia orgánica, convirtiéndose en un lugar apropiado para el crecimiento de una gran diversidad de bacterias marinas copiotróficas (bacterias capaces de crecer en un medio rico en nutrientes) y la formación de varios tipos de asociación con otros organismos. Las asociaciones pueden establecerse a nivel intracelular o extracelular y ser temporales o permanentes, con una gran variedad de procariontes incluyendo diversas bacterias heterotróficas (Wilkinson I, 1978), organismos fotosintéticos como cianobacterias (Unson *et al.*, 1994) y protobacterias (Erpenbeck *et al.*, 2002, Schmidt *et al.*, 2000). Los microorganismos asociados dan

estabilidad al esqueleto de la esponja (Wilkinson *et al.*, 1981), también se relacionan en procesos nutricionales como digestión intracelular, transferencia de nutrientes, fijación de nitrógeno y nitrificación (Haygood *et al.*, 1999), así mismo, participan en el sistema de defensa químico del hospedero contra predadores y producen antiadherentes (Unson *et al.*, 1994).

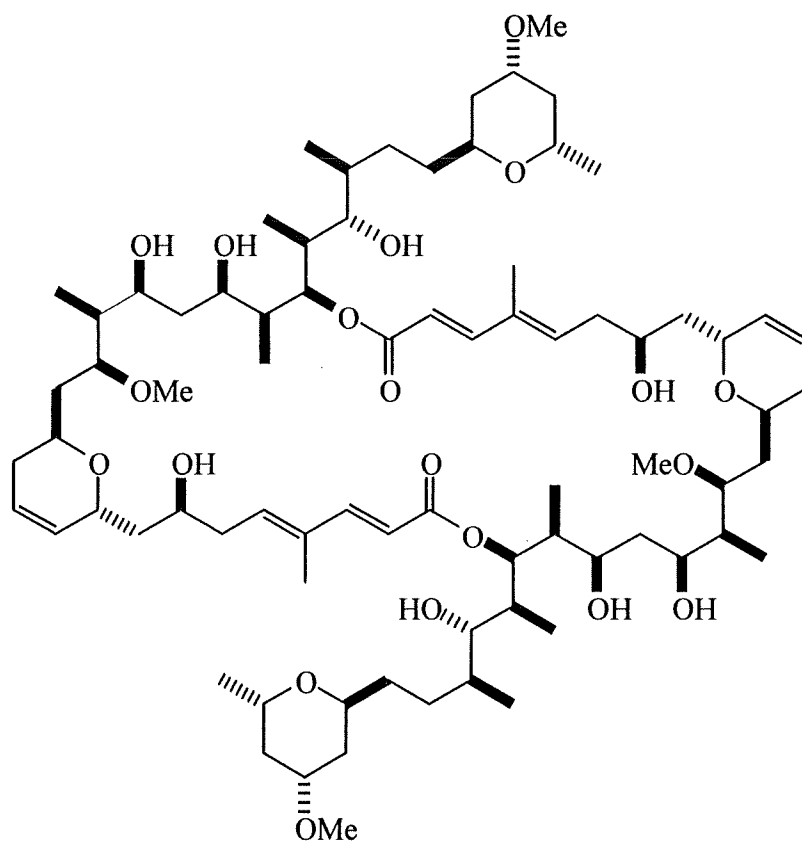
Metabolitos secundarios en simbiosis esponja-microbios

De las esponjas marinas se han aislado metabolitos secundarios con bioactividad importante, sin embargo, estudios recientes mencionan que las células de las esponjas no son las responsables de su producción y señalan a los microorganismos simbiotes como los productores. Un caso muy especial es la esponja *Dysidea herbacea* y su cianobacteria simbiote *Oscillatoria spongelliae*. Por dos décadas a partir de *D. herbacea* se aisló el antibiótico 2-(2',4'-dibromofenil)-4,6-dibromofenol (**1**), sin embargo, Unson *et al.* (1994) reportaron la producción del antibiótico **1** a partir de *Oscillatoria spongelliae* ubicada en el mesohilo de la esponja, probando que las células de la esponja no son las responsables de la producción del antibiótico **1** como se pensaba.

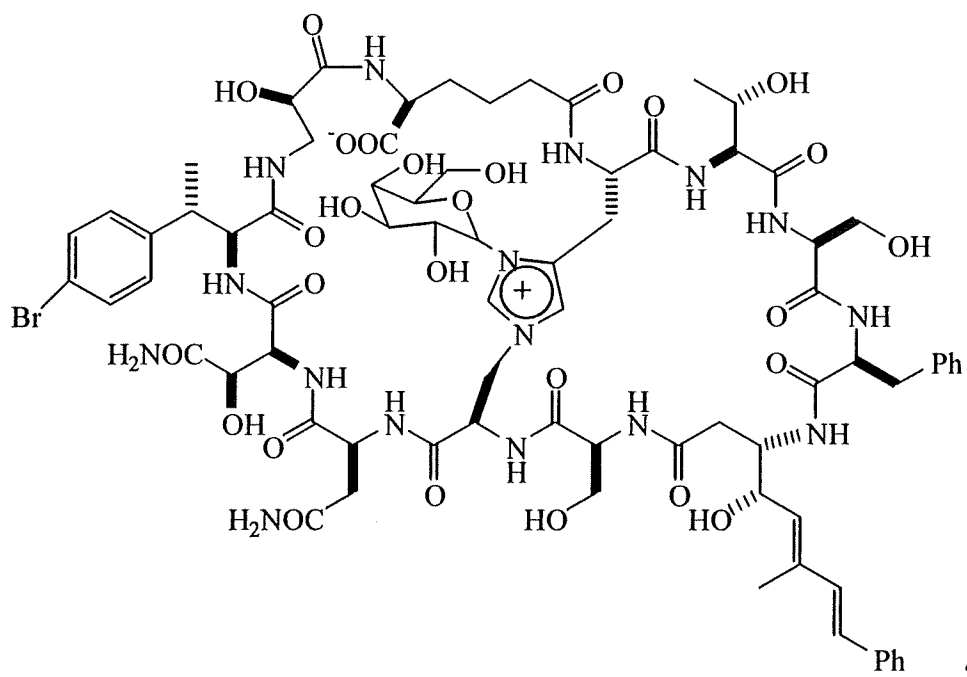


Las esponjas *Halichondria okadai* de Japón y *Halichondria melanodocia* del Caribe contienen ácido okadáico (2) el cual es producido por un dinoflagelado del género *Prorocentrum*. Lo cual sugiere, que las esponjas concentran el ácido okadáico en su tejido, sin embargo, no hay evidencias que relacionen la producción de este compuesto con la relación simbiótica entre la esponja y el dinoflagelado (Faulkner *et al.*, 2000).

Otra esponja ampliamente estudiada por contener una gran diversidad de metabolitos secundarios biológicamente activos es *Theonella* sp., estos compuestos también han sido relacionados como productos de microorganismos. Schmidt *et al.* (2000) indican que *T. swinhoei* contiene tres poblaciones distintas de células microbianas, las cuales son: bacterias heterotróficas unicelulares, cianobacterias unicelulares y bacterias heterotróficas filamentosas. En las bacterias unicelulares se localizó el macrolido swinholide A (3) y en la fracción de las bacterias filamentosas se encontró un glicopéptido bicíclico teopalauamida (4) con actividad antifungal.

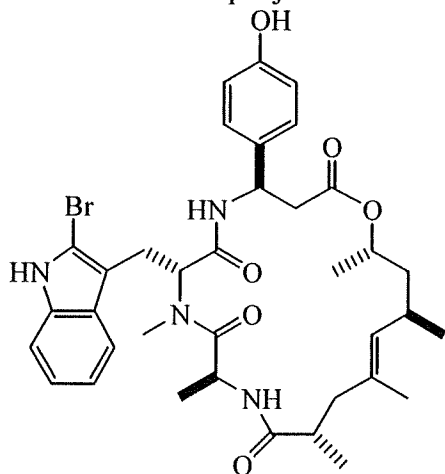
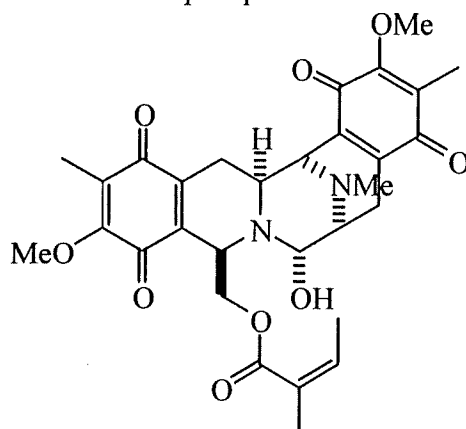
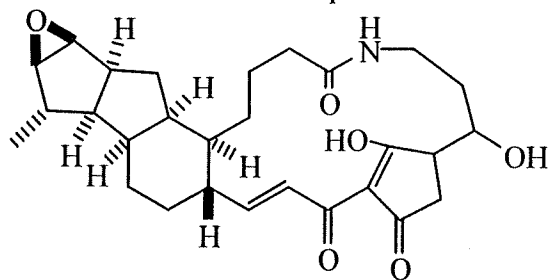
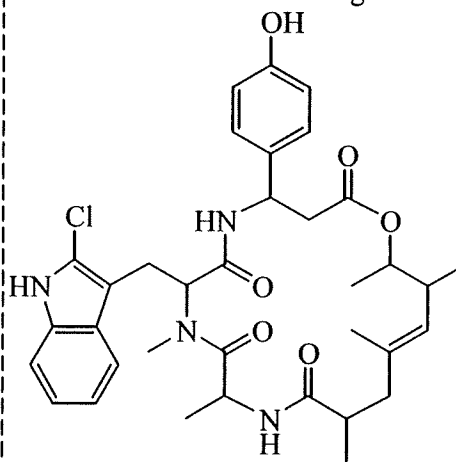
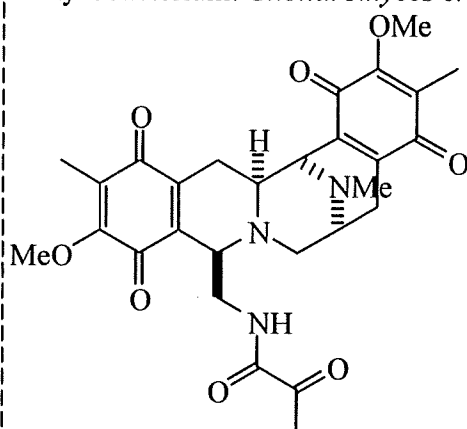
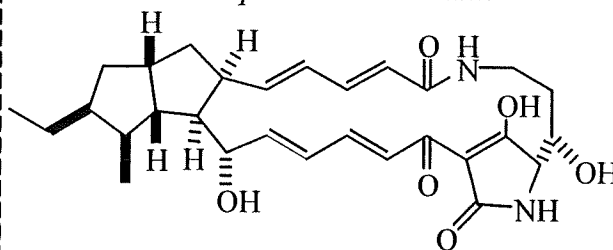


3



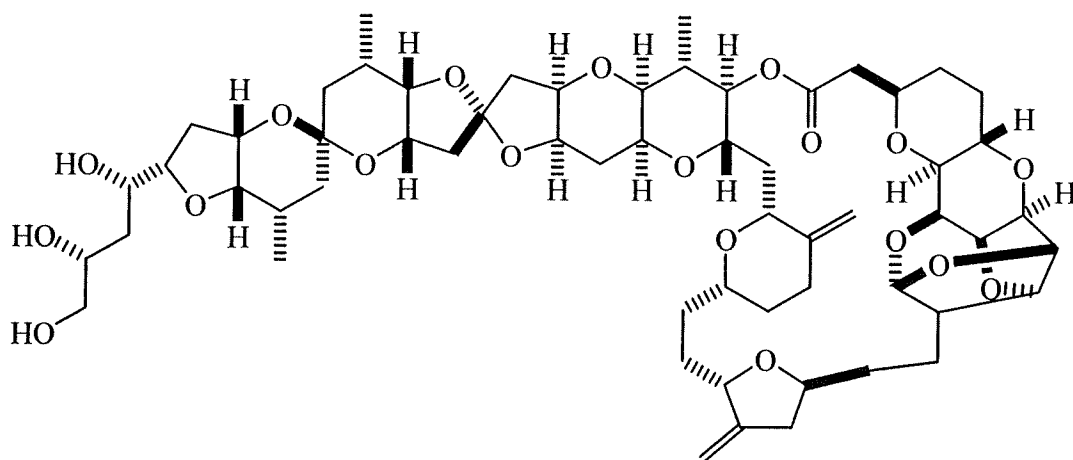
4

Otras evidencias de esto son varios metabolitos aislados de esponjas que presentan una estructura similar o idéntica a compuestos producidos por esponjas con taxonomía diversa, por microorganismos de vida libre y por algunos invertebrados que no se alimentan de ellas ni tienen ninguna relación con ellas (Bradley, 1999). En el esquema 1 se dan ejemplos de productos naturales aislados de esponjas y compuestos con estructuras similares aislados a partir de otros microorganismos.

Metabolitos secundarios
aislados de esponjasJaspamide
Jaspis spRenieramycin E
Reniera spDiscodermide
*Discodermia dissoluta*Metabolitos secundarios
aislado de microorganismosChondramide D
Mycobacterium: *Chondromyces crocatus*Saframycin B
Bacteria *Streptomyces lavendulae*Alteramide A
Bacteria *Alteromonas* sp

Esquema 1

El avance en la investigación y el desarrollo industrial de los metabolitos secundarios de esponjas, ha sido lento por que la concentración del compuesto bioactivo es mínima; menos de 10^{-6} % en peso seco del organismo y muchas de las estructuras químicas son complicadas lo que eleva la dificultad y el costo de su síntesis. Otra desventaja es que los métodos de cultivo de muchos de estos organismos no están bien desarrollados. Un ejemplo claro de esto ha sido la obtención la halicondrina B (5), un compuesto policetónico altamente citotóxico aislado de *Lissodendoryx* sp. Para obtener 300 mg de una mezcla de dos análogos de halicondrina se necesita coleccionar y extraer una tonelada métrica de esponja. Esto causa dificultades en los estudios clínicos en donde se requiere una gran cantidad del compuesto antes de obtener la licencia para ser usado como fármaco. Por ejemplo, para probar la halicondrina como nuevo fármaco anticáncer anualmente se necesitarían entre 1–5 kg por año, que corresponde a 3000- 16000 toneladas métricas de biomasa del organismo por año (Hart *et al.*, 2000).



Bacterias

Las bacterias son capaces de coordinar sus actividades, sus cambios morfológicos y fisiológicos por medio de un tipo de lenguaje en el cual las palabras son pequeñas moléculas difusibles al medio externo llamadas autoinductores o moléculas de señalización célula-célula (MSCC), este tipo de comunicación permite a las bacterias comportarse colectivamente y les confiere grandes ventajas como migrar a ambientes más aptos, adoptar nuevas formas de crecimiento, como la formación de esporas y formación de biocapas o producir mecanismos de defensa. (Kievit y Iglewsky, 2000; Williams, 2002).

“Quorum sensing” es el término que describe un tipo particular de comunicación célula-célula en el que un número de genes es expresado de manera dependiente de la densidad celular después de que ha sido alcanzada una concentración crítica de moléculas de señalización célula-célula. El “quorum sensing” es por lo tanto un ejemplo de comunicación en un ambiente multicelular y puede modular una variedad de procesos fisiológicos incluyendo bioluminiscencia, movilidad y biosíntesis de antibióticos, entre otros (Williams, 2002)

Un gran número de productos bacterianos extracelulares puede ser encontrado en los sobrenadantes del medio de cultivo y teóricamente cada uno de estos tiene el potencial de servir como MSCC en un sistema de quorum sensing.

El término de molécula de señalización célula-célula es reservado para aquellas moléculas pequeñas difusibles que tienen la función de comunicación entre células y cumple con los siguientes criterios.

1. La producción de MSCC ocurre durante un estado de crecimiento específico, con ciertas condiciones fisiológicas dadas o en respuesta a cambios en el ambiente.
2. Las MSCC son acumuladas extracelularmente y son reconocidas por un receptor específico.
3. La acumulación de las MSCC genera una respuesta concertada una vez que ha sido alcanzada la concentración crítica.
4. La respuesta celular se extiende hasta cambios fisiológicos requeridos para metabolizar o detoxificar las MSCC. (Bauer y Robinson 2002; Beth, 2000).

HIPOTESIS

Las bacterias simbiotes (asociadas) viables y cultivables aisladas de las esponjas marinas, que tengan la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias, probablemente biosinteticen un compuesto que puede ser un metabolito con actividad antibacteriana o incluso citotóxico.

Si la actividad y el tipo de compuestos presentes en los extractos de las bacterias son similares a los encontrados en los extractos de las esponjas se puede decir que el compuesto es producido por la bacteria asociada.

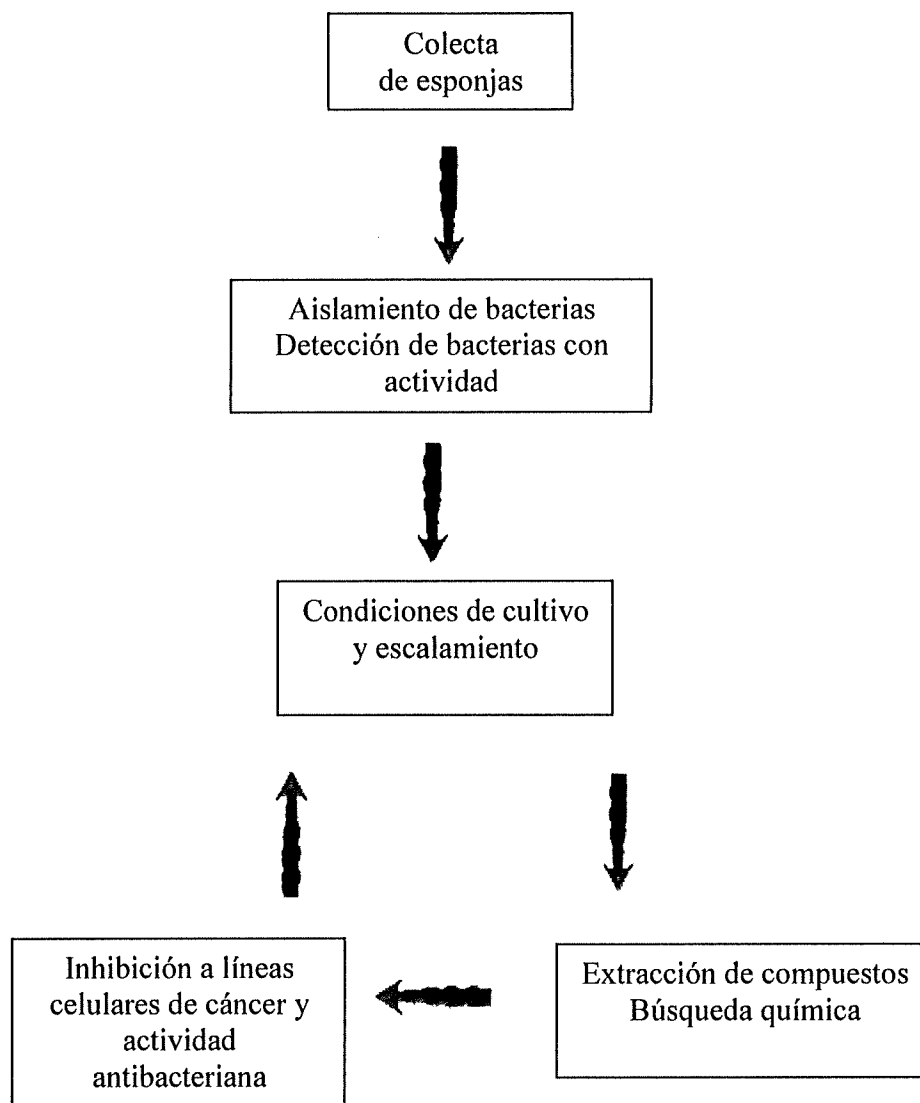
OBJETIVO GENERAL

Búsqueda de actividad antibacteriana y citotóxica en extractos de esponjas marinas y de sus bacterias simbios.

Objetivos específicos

- ✱ Aislar y cultivar bacterias asociadas a cinco especies de esponjas diferentes.
- ✱ Realizar bioensayos para demostrar la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas que invaden el nicho de otra cepa bacteriana establecida previamente. Utilizando las bacterias asociadas, viables y cultivables aisladas de las esponjas.
- ✱ Cultivar las bacterias con actividad inhibitoria de crecimiento y obtener el extracto orgánico.
- ✱ Analizar la actividad citotóxica contra células de carcinoma colorectal (HCT 116) y antibióticamente contra dos bacterias Gram +: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*.
- ✱ Comparar la bioactividad y el tipo de compuestos presentes en las bacterias y las esponjas marinas seleccionadas.

METODOLOGIA



Esquema 2. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

Área de colecta

Se colectaron por buceo libre, cinco especies de esponjas diferentes en la zona que lleva por nombre “La Bufadora” ubicada en la Bahía de Todos Santos, que se localiza en el extremo Noroeste de la península de Baja California (México), entre los 31°43' y 31°54' Latitud Norte y los 116°36' y 116°49' longitud oeste (Figura 2). La Bahía de Todos Santos se encuentra limitada al norte por Punta San Miguel, al sur por Punta Banda, al este por la playa que vá desde la rada portuaria hasta la boca del Estero de Punta Banda y al oeste por las islas de Todos Santos. Las esponjas colectadas fueron etiquetadas con las letras R, M, N, B y T. En relación con su color: R de rojo, M de morado, N de naranja y B de blanco y en relación a su familia T de Tetillidae.

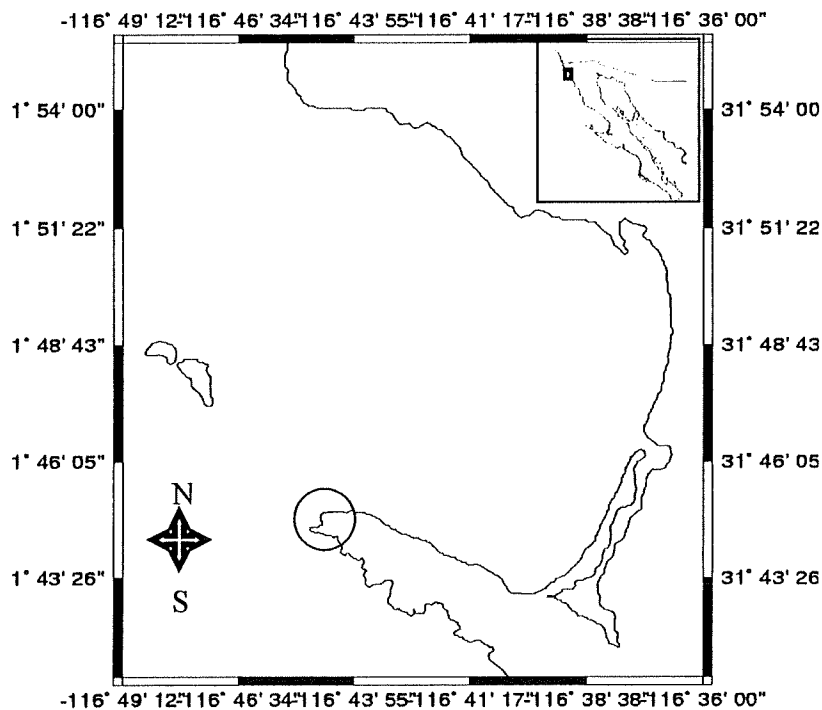


Figura 2. Localización del área de colecta, mapa de Bahía de Todos Santos, BC. resaltando el área de la Bufadora con un círculo.

Identificación de esponjas

La identificación de las esponjas se realizó tomando en cuenta sus características morfológicas, externas e internas, utilizando como referencia la clasificación realizada por De Lambenfels en 1932, con la asesoría de Catherine M. Sinich del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía Scripps, de la Universidad de California en San Diego en La Jolla, California.

Preparación de espículas.

Las espículas se obtuvieron a partir de un corte transversal de la esponja de aproximadamente 0.2 cm de grosor. El corte se trató con cloro por 12 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, posteriormente se lavaron las espículas dos veces con agua destilada, luego con etanol al 50% en agua y un último lavado con etanol al 100%, después de cada lavado se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Finalmente las espículas se suspendieron en etanol y se observaron en el microscopio para la identificación de las esponjas de acuerdo a la morfología de sus espículas (De Lambenfels, 1932).

Aislamiento de bacterias asociadas a las esponjas

Para el aislamiento de las bacterias asociadas a las esponjas se seleccionaron dos medios de cultivos, un medio rico en nutrientes y un medio pobre en nutrientes. El medio pobre en nutrientes (SWA) consiste en agua de mar y agar, y el medio rico en nutrientes (A1) contiene almidón, extracto de levadura, bactopectona y agar. Estos medios fueron seleccionados siguiendo la metodología de Prieto-Davó (2002).

Por otra parte, tanto al medio A1 como al medio SWA se les adicionó ciclohexamida ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para evitar el crecimiento de hongos presentes en las muestras. También se preparó otro juego de medios de cultivo con el antifungal y con rifampicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) como agente antibacteriano para impedir el crecimiento de bacterias con tasas de crecimiento rápido y permitir el crecimiento de otras bacterias menos estudiadas.

De esta manera, se contaron con cuatro variantes de medios de cultivos para aislar las bacterias asociadas a las esponjas:

Medios de cultivo	Abreviatura
1) Medio A1 con ciclohexamida	A1+C
2) Medio A1 con ciclohexamida y rifampicina	A1+CR
3) Medio SWA con ciclohexamida	SW+C
4) Medio SWA con ciclohexamida y rifampicina	SW+CR

Posterior a la colecta de las esponjas, ya en el laboratorio las muestras se trataron de la siguiente manera:

De forma aséptica se obtuvo 1 cm^3 del tejido de la esponja. Para el caso de la esponja *Plocamia igzo* el tejido seleccionado fue al azar, para las demás esponjas se realizó un corte transversal y se tomó 1 cm^3 del tejido interno de la esponja. Cada muestra se lavó con agua marina estéril posteriormente se lavó con una solución de etanol al 70% y se transfirió a agua marina estéril. El tejido se removió del agua y con la ayuda de una varilla de vidrio estéril se trituró, posteriormente, este material se suspendió en 9 mL de agua de mar estéril y se mezcló en un vortex por 3 minutos (Webster y Hill, 2001). Se prepararon diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 con agua de mar estéril. De cada

dilución se tomó una alícuota de 45 μL para inocular sobre la caja Petri con el medio de cultivo. Todas las cajas se incubaron a 25 °C, revisando cada 24 horas el crecimiento de las bacterias, hasta ver a simple vista colonias formadas (entre 1 y 2 semanas). Se determinó la concentración de bacterias en el tejido de cada esponja (UFC cm^{-3}) y de las colonias que crecieron con morfología diferente se tomó una asada para su aislamiento por medio de estría cruzada sobre el mismo medio de cultivo en el cual creció. Para asegurar la obtención de cepas puras éstas se sembraron por estría cruzada tres veces. Las cepas fueron etiquetadas con la letra de la etiqueta de la esponja de donde se aislaron seguido de un guión y un número consecutivo por ejemplo R-1, R-2, R-3, etc.. Las cepas puras se preservaron por criogénesis de la siguiente manera: se posó al microorganismo a crecer en 10 mL de un medio líquido A1 por 24 hrs, posteriormente se colocó 1 mL del cultivo en eppendorf de 1.5 mL que contenían 300 μL de glicerol estéril, se agitó en el vortex por 1 minuto y se coló a una temperatura de -75 °C.

Identificación de las bacterias

Las cepas R-3, R-7b, M-4, T-1, T-2, N-5p y N-5en se intentaron identificar mediante la secuenciación del RNA ribosomal 16S, sin embargo, solo las cepas R-3, M-4 y T-2 se pudieron identificar por esta técnica. Para lo cual se amplificaron de 10 a 50 ng de DNA genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un oligonucleótido (PRIMER) 16Sf y 16Sr universales. Las amplificaciones del 16S rDNA fueron secuenciados usando un total de 6 primers: FC27 (usado en amplificación temporal), F514 (5'-a- 3' GTGCCAGCAGCCGCGGTAA), F1114 (5' -a- 3'

GCAACGAGCGCAACCC), RC1492 (5' -a- 3' TACGGCTACCTTGTTACGACTT), R936 (5' -a- 3' GTGCGGGCCCCCGTCAATT), R530 (5' -a- 3' CCGCGGCTGCTGGCACGTA). Las 6 secuencias individuales resultantes fueron ensambladas para dar un total de 1500 nucleótidos.

Análisis filogenéticos

Las secuencias del 16S rDNA fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos y las similitudes entre ellas fueron calculadas usando la matriz de similitud del Proyecto de Datos Ribosomales (RDP) en línea. Los análisis filogenéticos fueron realizados usando el algoritmo “neighbor-joining” (vecino más cercano) de la interfase Phylip del RDP, (Maidak *et al.*, 2001).

Pruebas bioquímicas

El resto de las bacterias se caracterizaron solo por: A) La reacción Gram para la cual se siguió la metodología descrita por Powers (1995). B) Las reacciones de citocromo oxidasa y catalasa mediante la técnica descrita por MacFaddin (2003), C) Las pruebas Rojo de metilo, Voges- Proskauer, Hugh Leifson y Rojo fenol (para glucosa lactosa y sacarosa) de acuerdo con las modificaciones realizadas por Hanson y Sorheim (1991),

Inhibición de crecimiento de bacterias entre ellas mismas

Una vez que se tuvo la colección de cepas de bacteria asociadas a las esponjas se procedió a realizar los ensayos para detectar inhibición de crecimiento de las bacterias entre ellas mismas, por la actividad de sus metabolitos. Las cepas puras se inocularon en

cajas Petri cuadradas con 30 mL de medio sólido A1 siguiendo la metodología usada por Prieto-Davó (2002), de la siguiente manera:

Las cajas Petri se dividieron en doce cuadrantes y en cada cuadrante se colocó una cepa, con una réplica por caja, inoculando 10 μ L (una asada/ 2.5 mL de agua de mar estéril) de cada bacteria (posible “bacteria activa”). Posteriormente se sellaron las cajas con parafilm y se incubaron a 25 °C durante 5 a 6 días hasta que las colonias tenían un tamaño de entre 5-10 mm de diámetro. Transcurrido este tiempo se prepararon placas con 15 mL de medio sólido A1, estos medios fueron utilizados como tapas para cubrir las bacterias sembradas en las otras cajas. La segunda capa de medio sirvió para sembrar de forma masiva 100 μ L (una asada/ 2.5 mL de agua de mar estéril) de otra cepa (posible “bacteria inhibida”). Finalmente las cajas ya con la segunda rebanada e inoculadas se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 °C.

Los resultados de inhibición se leyeron a las 48 y 72 horas midiendo el diámetro del halo de inhibición y el diámetro de la colonia de la bacteria activa. El valor de inhibición de crecimiento y el efecto bacteriostático se obtuvieron de las siguientes ecuaciones:

$$I = \frac{(E - A)}{2} \qquad B = \frac{(O - A)}{2} - I$$

En donde A = diámetro de la colonia bacteriana activa, E = diámetro del halo de inhibición, I = inhibición real, O = diámetro del halo de inhibición mas el bacteriostático, B = efecto bacteriostático.

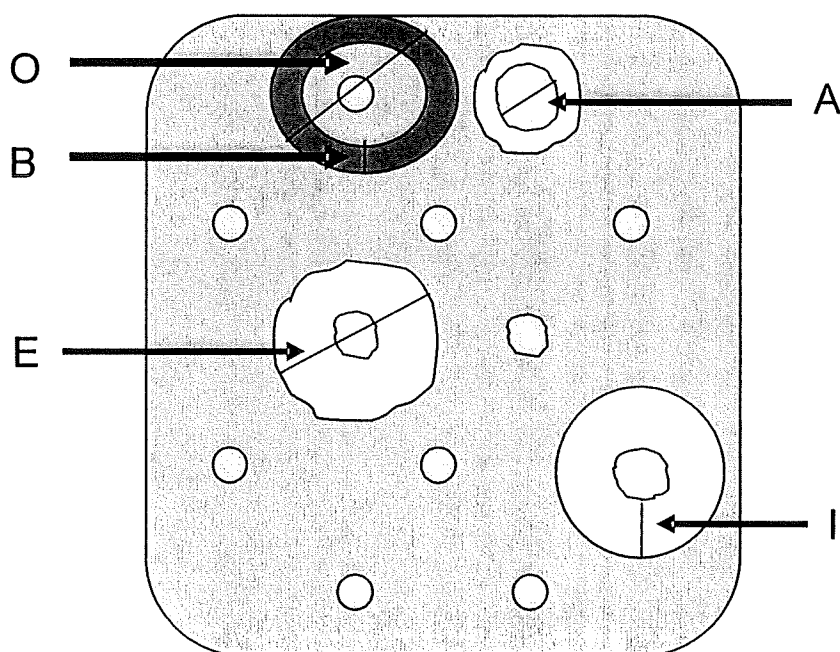


Figura 3. Diagrama de las medidas de inhibición, en donde A = diámetro de la bacteria activa, E = diámetro del halo de inhibición I = inhibición real.

Curvas de crecimiento.

A cada una de las bacterias que presentó actividad inhibitoria de crecimiento se les realizó su curva de crecimiento, de la siguiente manera:

Una colonia bien definida con crecimiento de 12, 24 o 48 horas dependiendo de la cepa sembrada sobre medio sólido A1 se transfirió a 25 mL de medio líquido A1, se dejó crecer 12 horas, a 25 °C y 215 rpm,. Posteriormente, para sincronizar el crecimiento de las bacterias, se preparó un preinóculo tomando 2.5 mL del cultivo y se adicionó a 25 mL de medio líquido A1. Una vez que se alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 600 nm (aproximadamente 2.5 horas), se tomó una alícuota de 10 mL y se inoculó en 100 mL de medio líquido A1 (tiempo cero). De este cultivo, incubado a 25 °C y 215 rpm, se

tomaron muestras para leer la densidad óptica a 600 nm empezando en el tiempo cero, recién inoculado, y realizando mediciones consecutivas cada dos horas, por 24 – 32 horas.

Con estos valores se calcularon los siguientes parámetros poblacionales de las bacterias; la constante de crecimiento (k) y el tiempo medio de duplicación (Tg), de acuerdo con las ecuaciones:

$$k = \frac{\log_2(N_2) - \log_2(N_1)}{t_2 - t_1} \quad Tg = \frac{1}{k}$$

Donde:

Tg = tiempo medio de duplicación

k = constante de crecimiento exponencial

N_1 = densidad óptica al tiempo t_1

N_2 = densidad óptica al tiempo t_2

t_1 y t_2 = tiempo inicial y final en horas.

Preparación de extractos

A partir de esponjas

Los extractos de cada esponja se obtuvieron cortando en trozos pequeños (1 cm^2) al organismo y sumergiéndolo en una mezcla de metanol: diclorometano 7:3 por 7 días. Transcurrido este tiempo la materia orgánica se eliminó por medio de filtración y el extracto se concentró a sequedad mediante destilación a presión reducida.

A partir de bacterias

Para acondicionar la bacteria de medio sólido a medio líquido, una colonia bien definida y joven se inoculó en 5 mL de medio líquido A1, se dejó crecer toda la noche a 25 °C y 215 rpm. Posteriormente, para sincronizar el crecimiento de las bacterias se preparó un preinóculo, tomando 2.5 mL del cultivo y adicionándolo a 25 mL de medio A1. Una vez que alcanzó una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 2.5 horas), se tomó una alícuota de 10 mL y se inoculó en 100 mL sobre medio líquido A1. El inóculo de 100 mL se dejó crecer hasta fase exponencial y a la mitad de la fase exponencial se adicionó a 1 L de medio de cultivo A1, se dejó en agitación a 215 rpm y a un intervalo de temperatura de 25-28 °C, por 5 días. Al finalizar los 5 días se obtuvo el extracto de la bacteria, para lo cual se adicionó al cultivo 20 g de amberlita XAD7 y se agitó por 2 horas, a 100 rpm. Posteriormente, el cultivo se filtró y la amberlita se colocó en un matraz de 1 L con 500 mL de acetona por 2 horas a 100 rpm. Finalmente, el extracto se filtró y se concentró mediante destilación a presión reducida. Todos los extractos se almacenaron a 4 °C.

Actividad antibacteriana de los extracto de las esponjas y bacterias.

Con los extractos obtenidos de las esponjas y bacterias se realizaron ensayos antimicrobianos mediante el uso de discos de papel estériles de 6.5 mm de diámetro impregnados con 75 µL de los extractos. Los discos secos se colocaron sobre las placas Petri previamente inoculadas con 45 µL de un cultivo líquido que no tuviera más de 24 horas, (una asada/ 2.5 mL de agua de mar estéril) de cada una de las cepas de ensayo.

Las cajas inoculadas se sellaron con parafilm y se incubaron a 24 °C, y se observó su crecimiento a las 48 horas. La formación de halos de inhibición alrededor de los discos se tomó como una indicación de la producción de por lo menos un metabolito antimicrobiano.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados se prepararon de acuerdo a las siguientes formulaciones y de acuerdo con Prieto-Davó (2002).

Medio A1

Formulación para 1 L

Bactopeptona	2 g
Extracto de levadura	4 g
Almidón	10 g
Agar	16-18 g
Agua de mar	1 L

Medio SWA

Agar	16-18 g
Agua de mar	1 L

Los ingredientes se suspenden y se calientan hasta disolución total, enseguida se esteriliza por 15 minutos, en autoclave a 15 lb de presión a una temperatura de 121 °C. Se deja enfriar hasta 45 – 50 °C y se vierte el medio en las cajas de Petri. En el caso de medios con antibiótico y antifungal, se adiciona sobre el medio solidificado en las cajas Petri, 1 mL de ciclohexamida a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 1 mL de rifampicina a una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para el medio líquido, los ingredientes (sin agar) se suspenden y se esteriliza.

Purificación de compuestos.

Cada extracto de las cepas R-3, R-7b, M-4, T-1, T-2, N-5 y N5p y de la esponja *Craniella arb* se percolaron por cromatografía flash sobre gel de sílice fase reversa C-18, utilizando como eluyentes fracciones de 200 mL cada una de los disolventes agua (H_2O), mezclas de agua: metanol (H_2O : MeOH), acetonitrilo (CH_3CN) y acetato de etilo (AcOEt). Empezando con las mezclas de disolventes de mayor a menor polaridad de acuerdo con Soria-Mercado (2004), como se muestra a continuación:

Mezcla de disolventes	Relación	Mezcla de disolventes	Relación
1. H_2O	100%	6. H_2O :MeOH	1:3
2. H_2O :MeOH	3:1	7. MeOH	100%
3. H_2O :MeOH	2:1	8. CH_3CN	100%
4. H_2O :MeOH	1:1	9. AcOEt	100%
5. H_2O :MeOH	1:2		

Separación por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Las fracciones $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 y $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 de la cepa T-1, se purificaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con un instrumento semipreparativo Acuflo[®] Serie II, con un detector de índice de refracción marca Waters modelo R401, y una columna fase normal con gel de sílice marca Dynamax 60A de 1 x 25 cm, a una velocidad de flujo de 2.0 mL min^{-1} . Las mezclas de disolventes y el tipo de columna empleadas para la separación de los compuestos se determinó buscando por cromatografía en capa fina, fase normal y fase reversa, la mejor separación de los compuestos, utilizando como revelador de los compuestos una solución de sulfato cérico al 1% en H_2SO_4 2 N. Para la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 de la cepa T-1, antes de separar los compuestos por HPLC se realizó una subfracción, con tres extracciones: una con dicloro metano, otra con acetato de etilo y una última con metanol. La subfracción obtenida con dicloro metano fue separada mediante HPLC utilizando como eluyente acetato de etilo. La fracción obtenida con acetato de etilo fue separada en el HPLC con una mezcla isocrática de acetato de etilo: acetonitrilo, 8:2.

En el caso de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 de la cepa T-1 la separación de los compuestos por HPLC se realizó utilizando como eluyente una mezcla isocrática de acetato de etilo: metanol 9:1. Todas las separaciones por HPLC se realizaron en fase normal.

Análisis espectroscópicos

Los compuestos mayoritarios separados por HPLC se analizaron espectroscópicamente por Resonancia Magnética Nuclear Protónica (^1H RMN), utilizando un espectrofotómetro Varian Inova Instruments de 300 megahertz (MHz), realizando las determinaciones en cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) fueron referenciados a la señal del disolvente en unidades de partes por millón (ppm) a δ 7.24 ppm para CDCl_3 .

Los espectros de masas (EM) de baja resolución se determinaron por medio de un cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC/MS) Hewlett-Packard MSD 1100 en una columna fase reversa C-18 con un método estándar. Este consistió en utilizar como fase móvil una mezcla 9:1 de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, variando esta razón hasta llegar a MeCN 100% en 30 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Parte I.

Identificación de las esponjas

De acuerdo con De Lambenfels en 1932 las especies de esponjas utilizadas se clasificaron de la siguiente manera:

Esponja etiquetada como "R":

Filum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Ceractinomorpha

Orden: Poecilosclerina

Familia: Plocamidiidae

Género: *Plocamia*

Especie: *igzo*



Descripción:

En vida su color es rojo carmín, con forma incrustante a masiva, de ancho mide 9-12 mm, su consistencia es tiesa a frágil, su superficie es aterronada, el ósculo no es evidente, los poros son 20 a 25 μm en diámetro y con separaciones de 70 a 75 μm , la membrana cutánea no es desmontable.

Las espículas que presenta son de forma tiloestiles y tilotes de tres diferentes tamaños y anchos, en las cabezas pueden presentar espinas. Contiene abundantes microscleras de forma isoquelas arqueadas (Figura 4).



Figura 4. Tipos de espículas presentes en la esponja *P. izgo*: A, isoquela arqueada; B, tilotes; C, tiloestiles.

Esponja etiquetada como “M”:

Filum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Tetractinomorpha

Orden: Hadromerida

Familia: Spirastrellidae

Género: *Spheciospongia*

Especie: *confoederata*



Descripción:

En vida debajo del agua su color es gris púrpura cremoso, fuera del agua su color es gris que tiende a morado e internamente es de color canela, su forma es masiva a semiovalada, mide entre 14 a 20 centímetros de diámetro, su consistencia es firme y levemente compresible, su superficie es lisa. Presenta uno o dos ósculos grandes y algunos pequeños, en la superficie cutánea algunas espículas penetran la superficie, el

endosoma presenta canales de casi 1 cm de diámetro y se encuentran aleatoriamente a través del endosoma, la membrana cutánea es desmontable.

Las espículas que presenta son de forma tiloestiles y subtiloestiles (Figura 5).

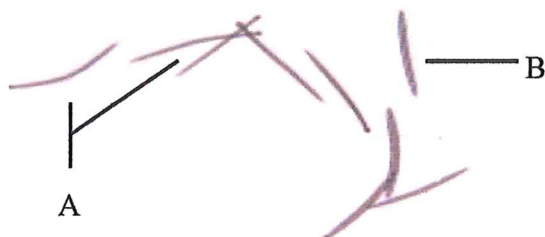


Figura 5. Tipos de espículas presentes en la esponja *S. confoederata*: A, tiloestiles; B, subtiloestiles.

Esponja etiquetada como "T":

Filum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Tetractinomorpha

Orden: Spirophorida

Familia: Tetillidae

Género: *Craniella*

Especie: *arb*



Descripción:

En vida debajo del agua su color es gris, por dentro es de color amarillo canario, su forma es semiesférica, su tamaño es de 5 cm de alto y 8 cm de diámetro, su consistencia es firme y cartilaginosa, en su superficie exhibe espículas suaves, en la parte superior

presenta un solo ósculo de aproximadamente 3 mm, los poros no son evidentes y la membrana cutánea es desmontable.

Presenta espículas de forma oxeas de diferente diámetro y un tamaño de hasta 3 cm. También presenta protrienas con rabdomas de diferentes tamaños, además de contener microscleras de forma sigma de C con espinas (Figura 6).

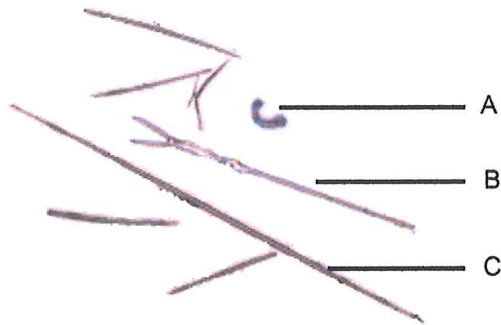


Figura 6. Tipos de espículas presentes en la esponja *C. arb*: A, sigma de C con espinas; B, protiren; C, oxeas.

Esponja etiquetada como "N":

Filum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Tetractinomorpha

Orden: Hadromerida

Familia: Clionidae

Género: *Cliona*

Especie: sp



Descripción:

En vida debajo del agua su color es amarillo, preservada en alcohol es castaño en el exterior y amarillo en el interior. Su consistencia es firme, no comprensible y cartilaginosa, su forma es incrustante o masiva, la superficie es irregular, no es evidente la presencia de ósculo, contiene poros de 3 a 8 μm de diámetro y la membrana cutánea es desmontable.

Presenta solamente espículas tiloestiles, la cabeza de estas varía en su forma de esférica a semiesférica y algunas veces no se encuentra en el extremo de la espícula (Figura 7).

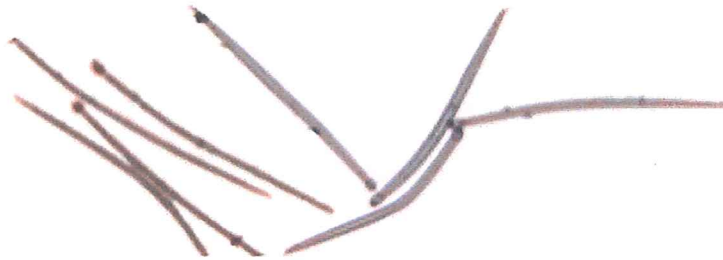


Figura 7. Tipos de espículas presentes en la esponja *Cliona* sp de forma tiloestiles.

Esponja etiquetada como "B":

Filum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Ceractinomorpha

Orden: Hoplosclerida

Familia: Halicionidae

Género: *Haliclona*

Especie: sp



Descripción:

En vida y en alcohol el color es blanco con manchas moradas, su forma es incrustante a masiva, su consistencia compresible, su superficie es lisa a verrugosa, contiene varios ósculos de 1 a 1.5 mm de diámetro, alineados a una distancia de 1 cm entre cada ósculo, los ósculos están ligeramente levantados. Los poros son muy minuciosos. La membrana cutánea es desmontable. Presenta espículas de forma oxeas (Figura 8).



Figura 8. Tipos de espículas presentes en la esponja *Haliclona* sp de forma oxea.

Parte II

Aislamiento de bacterias asociadas a las esponjas

A partir de las esponjas *Plocania igzo*, *Spheciospongia confoederata*, *Craniella arb*, *Cliona* sp. y *Haliclona* sp. se aisló un total de 43 cepas axénicas de bacterias (En la tabla I se muestra la clave de las cepas). Se puede decir que son bacterias asociadas a las esponjas debido al tratamiento realizado a las muestras, con lavados en etanol al 70% y agua de mar estéril. Sin embargo, es posible que sean bacterias que están de paso, o sea, que fueron ingeridas como alimento por las esponjas y sean microorganismos ocasionales, por lo cual no se podría distinguir entre los verdaderos microorganismos simbios. Para poder diferenciar los microorganismo simbios y tener una mejor visión de la comunidad microbiana presente en las diferentes esponjas, se requiere el uso de métodos de biología molecular como la técnica de “Hibridación *in situ* fluorescente, FISH” usando grupos específicos de oligonucleótidos del 16S rRNA (Webster e Hill, 2001).

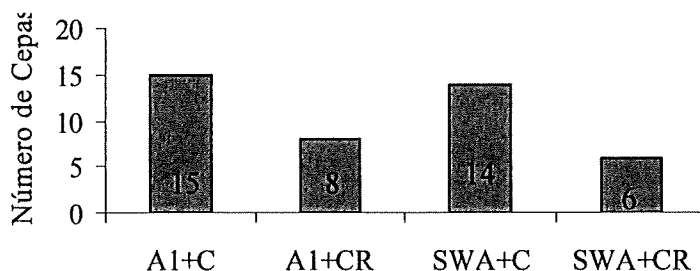
Las comunidades de bacterias asociadas a esponjas pueden ser altamente específicas, Friedrich *et al.* (2001) mencionan que ejemplares de la esponja *A. aerophoba* colectadas del ambiente marino y aclimatados por semanas en un acuario con agua de mar suplementada con antibióticos se mantiene la comunidad bacteriana similar y estable. Por su parte Wilkinson *et al.* (1981) reportan bacterias fenotípicamente similares aisladas de 9 y 10 especies de esponjas colectadas de dos regiones geográficas distintas. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede decir que existen al menos

entre 6 y 10 cepas de bacterias asociadas a cada esponja que pueden ser cultivadas esperando en otros muestreos que se aislen bacterias similares.

Tabla I. Cepas de bacterias aisladas de las esponjas.

ESPONJA					
BACTERIAS	<i>Plocania</i>	<i>Spheciospongia</i>	<i>Craniella</i>	<i>Cliona</i>	<i>Haliclona</i>
	<i>igzo</i>	<i>confoederata</i>	<i>arb</i>	sp.	sp.
	R-1	M-1	T-1	N-1	B-1
	R-2	M-2	T-2	N-2	B-2
	R-3	M-3	T-3	N-3	B-3
	R-4	M-4	T-4	N-4	B-4
	R-5	M-5	T-5	N-5en	B-5
	R-6	M-6	T-6	N-5p	B-6
	R-7a	M-7	T-7	N-6	
	R-7b	M-8	T-8	N-7	
	R-8	M-9	T-9		
			T-10		
			T-11		

La etiqueta usada para las cepas corresponde a la letra usada para las esponjas y numeradas consecutivamente.



Gráfica 1. Frecuencia de cepas bacterianas que crecieron en diferentes medios de cultivo. A1 = medio rico en nutrientes, SWA = medio pobre en nutrientes, C = ciclohexamida, R = rifampicina.

Por otra parte, el uso de un medio rico en nutrientes y otro pobre en nutrientes fue de gran relevancia ya que no se cuenta con un medio específico para aislar el mayor número de bacterias asociadas a las esponjas. En la gráfica 1 se muestra el número de cepas con morfología colonial diferente presente en los diferentes medios de cultivo. En el medio de cultivo rico en nutrientes con ciclohexamida se aislaron 15 cepas bacterianas y del medio pobre en nutrientes con ciclohexamida se aislaron 14 cepas. En ambos medios, con el antifungal y con el antibacteriano se observó un menor número de colonias bacterianas con morfología diferente (8 para A1 y 6 para SWA), lo que indica que solo el 32.5% de las bacterias aisladas son resistentes al antibacteriano.

Sin embargo, al calcular el número aproximado de bacterias presente por muestra, utilizando el método cuenta en placa, (Tabla II) el medio SWA+C presentó el valor más alto de UFC para las esponjas *Plocania igzo*, *Craniella arb* y *Cliona* sp. El medio SWA permite que las bacterias de lento crecimiento crezcan sin que su crecimiento sea inhibido por bacterias de rápido crecimiento. En el medio A1 las bacterias de rápido crecimiento invadieron el medio rápidamente. Lo anterior concuerda con lo reportado

por Jensen *et al.* (1996) quien encontró un número de unidades formadoras de colonias de bacterias heterotróficas mayor en el medio SWA que en un medio rico en nutrientes, mencionando que algunos nutrientes que son adicionados a los medios de cultivos como el extracto de levadura, pueden ser claramente tóxicos para algunas bacterias.

Tabla II. Concentración de bacterias en UFC cm⁻³ en los diferentes medios de cultivo.

Medio	<i>Plocania</i>	<i>Spheciospongia</i>	<i>Craniella</i>	<i>Cliona</i>	<i>Haliclona</i>
	<i>igzo</i>	<i>confoederata</i>	<i>arb</i>	sp	sp
A1 + C	977 777	contaminada	844 444	contaminada	422 222
A1 + CR	1 044 444	31 111	contaminada	355 555	600 000
SWA + C	1 222 222	533 333	933 333	400 000	102 222
SWA+ CR	822 222	577 777	100 000	42 222	73 333

A1 = medio rico en nutrientes, SWA = medio pobre en nutrientes, C = ciclohexamida, R = rifampicina.

En cuanto a la morfología colonial, las cepas crecidas en el medio A1 fueron más grandes, observando su aparición después del segundo día; en cambio, las colonias que crecieron sobre el medio SWA fueron de menor tamaño y se empezaron a ver después de una y media semana. La morfología colonial que presentan las cepas crecidas en el medio SWA cambia al ser transferidas al medio A1, presentando una morfología colonial similar a las cepas previamente aisladas sobre el medio A1. Sin embargo, no se puede asegurar que sean las mismas bacterias las que crecieron sobre el medio. De las 43 cepas aisladas, las cepas M-6, T-3 y T-10 se volvieron viables no cultivables después de la segunda, tercera y cuarta generación, respectivamente. Posiblemente por que el

medio utilizado no contaba con algún elemento indispensable para su crecimiento, las tres cepas pudieron soportar su crecimiento porque contaban con material de reserva que lo fueron transfiriendo de generación en generación hasta que ya no fue suficiente para su desarrollo.

Con respecto a las características bioquímicas de las bacterias, en la tabla III se reportan los datos de las diferentes pruebas realizadas. A manera general el 82.5% de las bacterias son Gram negativas y el 17.5% son Gram positivas.

En cuanto a la identificación de las bacterias, de acuerdo al 16S rRNA, que se realizó para las siete bacterias con bioactividad de inhibición de crecimiento (Página 45), sólo se logró la identificación de tres de ellas. La cepa R-3 obtuvo una homología del 96% a *Pseudovibrio*, la cepa M-4 presento una homología de 83% a *Bacillus* sp, la cepa T-2 tuvo una homología del 84% a *Vibrio*.

Tabla III. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas de las cinco esponjas.

Cepa	Metabolismo										Formación de ácido							
	Gram Ox		Cat	RM	VP	S	I	M	de glucosa			Glucosa		Sacarosa		Lactosa		
									O	F	NC	A	G	A	G	A	G	
R-1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
R-2	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
R-3	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
R-4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
R-5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
R-6	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
R-7 ^a	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
R-7b	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
R-8	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
M-1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
M-2	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
M-3	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
M-4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
M-5	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
M-7	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	

Gram, reacción Gram; Ox, oxidasa; Cat, catalasa; RM, rojo de metilo; VP, Voges-Proskauer; S, sulfhídrico; I, Indol; M, motilidad; O, Metabolismo de glucosa oxidativo; F, Metabolismo de glucosa fermentativo; NC, Metabolismo de glucosa no reacción; A, ácido; G, gas; +, positivo; - negativo.

Tabla III. Continuación, Pruebas Bioquímicas.

										Metabolismo			Formación de ácido					
Cepa	Gram Ox		Cat	RM	VP	S	I	M	de glucosa	Glucosa	Sacarosa		Lactosa					
											A	G	A	G	A	G		
M-8	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
M-9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
T-1	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
T-2	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
T-4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
T-5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
T-6	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
T-7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
T-8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
T-9	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
T-11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
N-1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
N-2	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
N-3	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
N-4	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	

Gram, reacción Gram; Ox, oxidasa; Cat, catalasa; RM, rojo de metilo; VP, Voges-Proskauer; S, sulfhídrico; I, Indol; M, motilidad; O, Metabolismo de glucosa oxidativo; F, Metabolismo de glucosa fermentativo; NC, Metabolismo de glucosa no reacción; A, ácido; G, gas; +, positivo; - negativo.

Tabla III. Continuación, Pruebas Bioquímicas.

										Metabolismo			Formación de ácido								
Cepa	Gram	Ox	Cat	RM	VP	S	I	M	de glucosa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa									
													O	F	NC	A	G	A	G	A	G
N-5en	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-				
N-5p	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-				
N-6	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-				
N-7	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-				
B-1	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-				
B-2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-				
B-3	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-				
B-4	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-				
B-5	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-				
B-6	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-				

Gram, reacción Gram; Ox, oxidasa; Cat, catalasa; RM, rojo de metilo; VP, Voges-Proskauer; S, sulfhídrico; I, Indol; M, motilidad; O, Metabolismo de glucosa oxidativo; F, Metabolismo de glucosa fermentativo; NC, Metabolismo de glucosa no reacción; A, ácido; G, gas; +, positivo; - negativo.

Parte III

Pruebas de inhibición de crecimiento entre bacterias

La selección de bacterias candidatas como productoras de algún compuesto bioactivo, fue mediante la determinación de su bioactividad inhibitoria de crecimiento de cada cepa contra las 39 bacterias restantes.

Las cepas que presentaron bioactividad, es decir, que inhibieron el crecimiento de otra cepa bacteriana, fueron: las cepas R-3 y R-7b aisladas de la esponja *Plocania igzo* las cuales inhibieron a 10 y 2 cepas distintas, respectivamente; la cepa M-4 procedente de *Spheciospongia confederata* presentó bioactividad inhibitoria contra 12 cepas; las cepas T-1 y T-2 originarias de *Craniella arb* inhibieron a 39 y a 9 cepas respectivamente, las cepas N-5en y N-5p aisladas de la esponja *Cliona* sp. inhibieron a 5 cepas. A partir de la esponjas *Haliclona* sp. ninguna de las bacterias aisladas tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de otra bacteria (Tabla IV).

De las 40 cepas utilizadas en el bioensayo, las cepas R-1, R-7a, M-7, T-5, B-1, B-2 y B-3 mostraron inhibición de su crecimiento sólo una vez y fue por la bacteria T-1. Las cepas más sensibles fueron R-7b, N-6 al ser inhibidas por 5 y 4 cepas, respectivamente, un dato interesante es que en estas dos cepas no se inhibió su crecimiento por bacterias aisladas a partir de la misma esponja.

Tabla IV. Valor de inhibición del crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de las cinco esponjas.

Cepa	Cepa	Inhibición (mm)		Cepa	Cepa	Inhibición (mm)	
Activa	Inhibida	48 Hrs.	72 Hrs.	Activa	Inhibida	48 Hrs.	72 Hrs.
R-3	R-8	1.875	1.35	T-2	R-4	3.45	2.35
	M-4	3.05	2.5		R-6	1.6	1.4
	M-9	0.5	-0.05		T-7	3.55	1.65
	M-10	1.15	0		T-9	2.8	1.55
	T-2	2.25	1.5		M-8	3.6	2.0
	T-6	-0.65	-1.1		M-9	0.15	-0.6
	T-7	3.2	0.05		N-6	2.5	1.5
	T-9	4.65	4.55		N-7	4.35	0.7
	N-5p	7.0	6.0		B-6	2.3	1.4
	N-7	1.65	0.95		R-7b	9.5	10.0
R-7b	N-5en	1.5	0.4	T-1	M-1	6.5	4.0
	N-6	2.4	0.85		M-4	1.3	0.3
M-4	R-5	2.5	2.25		T-2	5.2	2.4
	R-7b	1.0	0.5		T-4	-6.0	-22.5
	M-3	8.0	7.5		N5en	4.5	3.5
	M-5	2.3	2.0		N-5p	1.0	-18.0
	T-8	17.0	16.0		N-6	1.5	1.0
	N-1	14.0	11.5		B-1	5.0	-23.0
	N-2	2.0	2.25		B-4	4.0	2.5
	N-3	10.5	10.0		B-6	-5.0	-5.5
	N-4	10.5	10.0		*-*	Inv	Inv
	N-6	8.0	7.5		R-2	0.5	2.0
N-5p	B-4	1.0	0	N-5en	R-7b	6.5	1.0
	B-5	1.0	0		T-2	2.5	1.5
	R-3	1.45	0.75		M-1	3.5	3.0
	R-4	1.675	0.645		B-5	2.0	1.5
	R-7b	2.25	1.05				
	M-2	0.4	0.2				
	M-9	0.4	0.3				

Inv = invadida por la cepa T-1; *-* , las 28 cepas faltantes no crecieron en toda la caja.

La inhibición puede ser ocasionada por competencia indirecta o por competencia directa (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Si fuese el caso de competencia indirecta, las bacterias activas utilizaron un recurso requerido por la bacteria inoculada en la rebanada de agar superior por lo cual se impidió o se redujo el crecimiento de la bacteria afectada. Por otro lado, en una competencia directa, es probable que la bacteria inoculada en el agar inferior estuviera produciendo alguna sustancia tóxica la cual se difundió a través de la segunda rebanada de agar inhibiendo el crecimiento de la otra bacteria sembrada en la capa de agar superior y se estaría hablando de amensalismo. En la página 52 se discute la actividad de los compuestos producidos por las bacterias bioactivas de este bioensayo.

Cabe la posibilidad de que la inhibición no se esté dando por la producción de compuestos antibacterianos, sino porque las bacterias produjeron un cambio en el pH del medio que impide el crecimiento del otro organismo. Una opción más es que las moléculas producidas por las bacterias establecidas sean moléculas bacteriostáticas y no bactericidas, es decir, que solamente detengan el crecimiento de la población pero no la matan (Long y Azam 2001).

Por otra parte, siete cepas provocaron un efecto bacteriostático superior al efecto inhibitorio, es decir, las bacterias establecidas en el agar inferior detenían el crecimiento de las bacterias en el agar superior, observándose una disminución en el tamaño de las colonias afectadas por el efecto bacteriostático (Tabla V). Se puede suponer que este efecto bacteriostático fue ocasionado por que las bacterias presentes en la colonia de la capa inferior produjeron moléculas de señalización célula-célula para comunicarse entre ellas mismas de la presencia de bacterias en el agar superior. Posiblemente las moléculas

de señalización fueron detectadas a su vez por las bacterias del agar superior, estas últimas vieron limitada su posibilidad para crecer. Así mismo, este efecto pudo ser ocasionado por las mismas causas que en el efecto inhibitorio por competencia directa o indirecta.

Tabla V. Efecto bacteriostático de las bacterias aisladas de las cinco esponjas.

		Efecto	
		bacteriostático (mm)	
Cepa activa	Cepa afectada bacteriostáticamente	48 Hrs.	78 Hrs.
R-3	R-8	1.875	1.7
	T-9	15.05	14.55
	N-2	1.65	1.45
	N-5p	4.5	3.5
R-7b	N-6	6.95	3.9
M-3	M-9	1.65	1.125
M-4	M-3	9.0	7.5
N-5en	N-6	3.65	3.0
N5-p	M-4	0.3	0.3

Con los resultados obtenidos, se puede decir que al menos hubo un 17.5% de interacciones inhibitorias entre las bacterias aisladas de las esponjas y un 15% de interacciones bacteriostáticas. No se pueden comparar estos resultados con alguna literatura ya que no se encontraron trabajos similares en bacterias simbiotes de esponjas, sin embargo, Prieto-Davó (2000) reporta 5% de interacción de inhibición de crecimiento entre actinomicetos aislados de sedimentos, Fair y Simidu (1987) reportan un 2.7% de actividad antibiótica en algunas bacterias aisladas de sedimentos marinos.

Por su parte, Long y Azam (2001) mencionan que bacterias de la columna de agua unidas a partículas presentan una actividad antibiótica de 53.5%.

Este estudio prueba solo algunas de las interacciones ecológicas que tienen entre sí las bacterias asociadas a las esponjas. Estos microorganismos presentan diversas estrategias para convivir y protegerse de otros organismos con quienes cohabitan dentro de su ambiente natural ya que no se observan tendencias de inhibiciones de un grupo de bacterias hacia otro grupo de bacterias.

Parámetros poblacionales de las bacterias

En la tabla VI se reportan los parámetros poblacionales que presentan las bacterias con actividad de inhibición de crecimiento. De manera general la fase exponencial se mantuvo por 2 horas para la cepa T-2, entre 4 y 5 horas para las cepas M-4, N-5p y T-1, alrededor de 6 horas la cepas R-3 y R-7b y 9 horas para la cepa N-5en. En el anexo se muestran las curvas de crecimiento de cada una de esta cepas.

Tabla VI. Parámetros poblacionales de las cepas que presentaron actividad inhibitoria de crecimiento.

Tiempo				T_g					
Cepa	(horas)	D O	K	(horas)	Cepa	Hrs.	D O	K	(horas)
R-3	0	0,045			T-2	0	0,076		
	2	0,060	0,208	4,819		2	0,365	1,251	0,800
	4	0,099	0,362	2,759		4	1,003	0,725	1,380
	6,5	0,386	0,784	1,275		5	1,115	0,174	5,738
	24	2,350	0,149	6,715		6,5	1,345	0,181	5,531
	30	2,960	0,055	18,021		24	1,945	0,026	39,029
	35	2,840	-0,012	-83,743		30	2,075	0,030	33,835
R-7b	0	0,053			N-5en	0	0,033		
	2	0,116	0,570	1,756		3	0,110	0,582	1,718
	4	0,360	0,817	1,224		5	0,192	0,401	2,496
	6	0,900	0,661	1,513		7	0,412	0,550	1,818
	8	1,705	0,461	2,169		9	0,727	0,409	2,444
	14	3,470	0,171	5,855		20	2,561	0,165	6,077
	21	3,587	0,007	146,93		32	3,396	0,034	28,991

DO = densidad óptica a 600 nm, k = constante de la velocidad de crecimiento,
 T_g = tiempo medio de generación.

Tabla VI. Continuación. Parámetros poblacionales de las cepas que presentaron actividad inhibitoria de crecimiento.

Cepa	Hrs.	D O	K	Tg	Cepa	Hrs.	D O	K	Tg
M-4	0	0,052			N-5p	0	0,043		
	2	0,142	0,724	1,381		2,5	0,085	0,629	1,589
	4	0,327	0,603	1,659		5	0,000	0,786	1,272
	6	0,617	0,457	2,188		7	0,572	0,389	2,571
	8	0,788	0,176	5,666		8	0,645	0,175	5,723
	18	1,107	0,049	20,378		20	1,420	0,046	21,687
	26	1,370	0,038	26,015		30	1,860	0,039	25,680
T-1	0	0,078							
	2	0,728	1,612	0,620					
	4	5,150	1,410	0,709					
	6	12,662	0,649	1,541					
	7	14,546	0,201	4,972					
	24	13,433	-0,007	-140,14					

DO = densidad óptica a 600 nm, k = constante de la velocidad de crecimiento,
 Tg = tiempo medio de generación.

Parte IV

Actividad citotóxica y antibacteriana de esponjas y bacterias

Extractos de las esponjas

Los extractos obtenidos de las esponjas *Plocania igzo*, *Spheciospongia confoederata*, *Craniella arb*, *Cliona* sp y *Haliclona* sp, fueron probados citotóxicamente contra células de carcinoma colorectal HCT116, además, se probó su actividad antibacteriana contra dos bacterias Gram +: *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (RM) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (RV) (Tabla VII). Así mismo se probó la actividad antibacteriana de los extractos de las esponjas contra las 40 cepas de bacterias asociadas a las esponjas aisladas en el presente trabajo, obteniendo resultados no significativos, por lo que no se incluyen en la tabla.

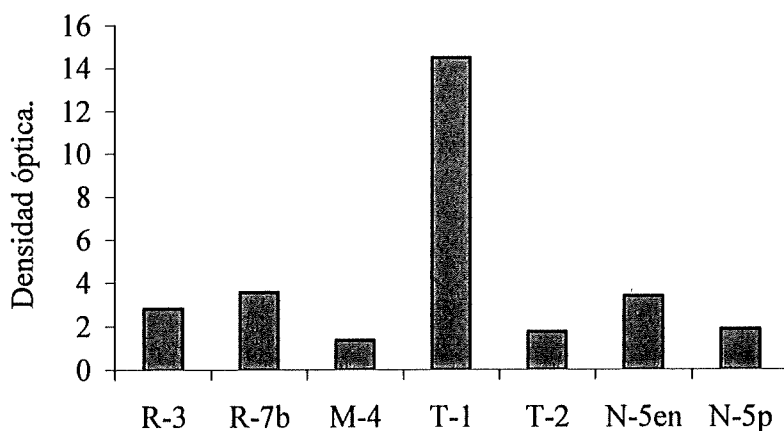
Tabla VII. Actividad citotóxica y antibacteriana de los extractos de las esponjas.

Extracto de la esponja	HCT116	MR	VR
	IC ₅₀	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>
	μg mL ⁻¹	MIC μg mL ⁻¹	MIC μg mL ⁻¹
<i>Plocania igzo</i>	NS	NS	NS
<i>Spheciospongia confoederata</i>	NS	NS	NS
<i>Craniella arb</i>	72.255	250	NS
<i>Cliona</i> sp	65.8	NS	NS
<i>Haliclona</i> sp	42.15	NS	NS

NS, no significativo; RM, resistente a metacilina; RV, resistente a vancomicina MIC, concentración mínima inhibitoria.

Extractos de las bacterias

De las 43 bacterias aisladas de las esponjas, las cepas M-4, R-7b, T-1, R-3, T-2, N-5en y N-5p fueron las seleccionadas por presentar bioactividad inhibitoria de crecimiento importante (ver pagina 45). Estas bacterias se cultivaron en 1 L de medio líquido A1 a 215 rpm, a 25-28 °C, la extracción de los compuestos se realizó al quinto día de cultivo. En la gráfica 2 se muestra la densidad óptica a 600 nm alcanzada al quinto día de cultivo de cada cepa bacteriana. Al finalizar los 5 días se obtuvo el extracto bacteriano utilizando amberlita XAD7 y posteriormente de la resina fueron extraídos los compuestos con acetona. Los extractos de las bacterias fueron probados citotóxicamente contra células de cáncer de colon HCT116, también, se probó su bioactividad antibacteriana contra dos bacterias Gram +: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*, similarmente, los resultados no fueron alentadores ya que todos los extractos presentaron una actividad no significativa.



Gráfica 2. Densidad óptica a 600 nm alcanzada a los 5 días de cultivo de las cepas bacterianas.

Por otro lado, se realizó un antibiograma con los extractos de las cepas R-3, R-7b, M-4, T-1, T-2, N-5en y N-5p utilizando el método difusión de agar (Kirby-Bauer) contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, *Proteus vulgaris* y *Echericha coli*. En la tabla VIII se muestra el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de los discos impregnados con 2, 4 y 6 mg de los extractos de las bacterias. El extracto de la cepa T-1 presentó zonas de inhibición para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Proteus vulgaris* con una concentración mínima de inhibición de 2.0, 2.0 y 4.0 mg, respectivamente. Además, *Bacillus subtilis* fue sensible a una concentración mínima de 4 mg del extracto de la cepa E1R-3.

Fenical (1993) menciona que bacterias Gram negativas generalmente no son productoras prolíficas de metabolitos extracelulares, sin embargo, cuando producen compuestos en fermentaciones de 1 L con cultivos densos de bacterias se obtiene menos de 1 mg del total orgánico, pero esto no es una regla. Teniendo estos antecedentes cada extracto de las bacterias se percoló por cromatografía flash sobre gel sílica fase reversa C-18, utilizando como fase móvil mezclas de agua - metanol, acetonitrilo y acetato de etilo. Inicialmente se obtuvieron de 600 mg a 190 mg de extracto crudo de cada bacteria, sin embargo, al pasar los extractos por cromatografía flash se pierde alrededor de 470 mg a 90 mg que puede ser material inorgánico. En la tabla IX se indica el peso de cada extracto crudo y los pesos obtenidos en cada fracción.

Tabla VIII. Actividad antibacteriana de los extractos de las cepas R-3, R-7b, M-4, T-1, T-2, N-5en y N-5p.

Diámetro de la zona de inhibición (mm)												
Extractos de las cepas	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Staphylococcus epidermis</i>			<i>Proteus vulgaris</i>			<i>Escherichia Coli</i>		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
R-3	0	9.5	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R-7b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T-1	10	12	13	14	16	17	0	8.5	9	0	0	0
T-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-5en	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El siguiente paso fue probar citotóxicamente contra células de carcinoma colorectal HCT116 las fracciones provenientes de las mezclas agua-metanol y metanol 100%. Solo dos fracciones presentaron actividad citotóxica: La fracción obtenida con metanol 100% del extracto de la cepa M-4 con un IC_{50} de $25.64 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la fracción obtenida con agua: metanol, 1:3, del extracto de la cepa T-1 con un IC_{50} de $73.22 \mu\text{g mL}^{-1}$. A pesar de que el extracto crudo de la cepa M-4 no presentó actividad antimicrobiana su fracción 100% metanol, que presentó actividad anticancerígena, se probó contra *Bacillus*

subtilis, *Staphylococcus epidermis*, *Proteus vulgaris* y *Echericha coli*, sin embargo, no se observaron zonas de inhibición.

Para tener un panorama de la actividad antibacteriana de cada fracción obtenida por cromatografía flash fase reversa C-18 de los extractos de las cepas R-3 y T-1 se realizaron pruebas de sensibilidad a *B. subtilis*, además, las fracciones del extracto de la cepa T-1 se probaron contra *S. epidermidis* y *P. vulgaris*. En la tabla X se muestra que *Bacillus subtilis* presenta zonas de inhibición de 8, 15 y 9 mm en los sensidiscos impregnados con las fracciones agua:metanol 2:1, 1:1 y 1:2 del extracto de la cepa R-3, respectivamente. Por otra parte, casi todas las fracciones del extracto de la cepa T-1 presentaron actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Proteus vulgaris*, resaltando la actividad de las fracciones agua:metanol 1:1 y 1:2 al presentar el mayor diámetro de zona de inhibición para las tres bacterias.

Aunque los extractos de las cepas R-7b, T-2, N-5en y N-5p no presentaron actividad citotóxica contra células de cáncer de colon ni actividad antibacterial, no significa que las bacterias no biosinteticen compuestos activos. Se tiene que tomar en cuenta que los extractos se obtuvieron de cultivos puros en donde las bacterias contaban con todos los requerimientos nutricionales y no estaban compitiendo por nutrientes contra otra bacteria, por lo tanto, no tenían la necesidad de producir algún compuesto para defenderse de otra bacteria. Así mismo, un compuesto determinado solo se puede expresar bajo condiciones específicas, el medio de cultivo y las condiciones de cultivo pueden producir efectos en la producción de metabolitos secundarios. Existe una gran variedad de condiciones de cultivo como son la variación en el pH de 7 a 7.5, la temperatura de 22 a 30 °C, sin agitación o con agitación de 200, 300 y 800 rpm, medios

con glucosa, otros con glicerol, otros más con glicerol y peptona, así mismo, el tiempo del cultivo varía desde 27 a 50 horas y desde 6, 8 a 10 días (Bernan *et al.*, 1994; Doshida *et al.*, 1996; Abbanat *et al.*, 1998, Wicke *et al.*, 2000).

Tabla IX. Pesos de los extractos bacterianos y de sus fracciones.

Fase	R-3	R-7b	M-4	T-1	T-2	N-5en	N-5p
Móvil	Peso en gramos						
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O: MeOH 3:1	0.0252	0.0407	0.0233	0.0412	0.0537	-	0.0302
H ₂ O: MeOH 2:1	0.02	0.0158	0.0105	0.0139	0.0074	0.0223	0.0532
H ₂ O: MeOH 1:1	0.0043	0.0112	0.0080	0.0223	0.0149	0.0082	0.0485
H ₂ O: MeOH 1:2	0.0032	0.0037	0.0048	0.0087	0.005	0.0042	0.0044
H ₂ O: MeOH 1:3	0.0013	0.0075	0.0048	0.0055	0.0019	0.0053	0.0022
MeOH 100%	0.0042	0.0133	0.0609	0.0256	0.0039	0.0064	0.0107
CH ₃ CN 100%	0.0005	0.0028	0.0014	0.008	0.0017	0.0015	0.0015
AcOEt 100%	0.0018	0.0037	0.004	0.0012	0.0018	0.002	0.0029
Total	0.0605	0.0987	0.1177	0.1264	0.0903	0.0435	0.1536
Peso inicial	0.4334	0.1918	0.5958	0.6004	0.3802	0.5854	0.6426

Tabla X. Tamaños de las zonas de inhibición de las fracciones obtenidas de los extractos de las cepas R-3 y T-1.

		Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
Fracción	mg usados	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Proteus</i>
		<i>subtilis</i>	<i>epidermis</i>	<i>vulgaris</i>
Cepa R-3				
H ₂ O: MeOH 3:1	6.0	0	-	-
H ₂ O: MeOH 2:1	6.0	8.0	-	-
H ₂ O: MeOH 1:1	6.0	15.0	-	-
H ₂ O: MeOH 1:2	6.0	9.0	-	-
H ₂ O: MeOH 1:3	2.0	0.0	-	-
MeOH 100%	6.0	0.0	-	-
Cepa T-1				
H ₂ O: MeOH 3:1	6.0	8.0	8.0	0
H ₂ O: MeOH 2:1	4.0	10.5	8.0	0
H ₂ O: MeOH 1:1	6.0	15.0	11.0	8.0
H ₂ O: MeOH 1:2	6.0	11.0	11.5	10.5
H ₂ O: MeOH 1:3	4.0	11.0	0	0
MeOH 100%	6.0	10.0	13.0	0

Parte V.

Análisis químico

El análisis de los compuestos presentes en el extracto de la cepa bacteriana T-1 se realizó en las fracciones H₂O:MeOH 1:3 y 1:2 debido a que presentaron mayor actividad antimicrobiana, además, de que la fracción 1:3 presentó actividad citotóxica contra células de carcinoma colorectal (Ver pagina 52), y también porque la cepa T-1 se aisló de la esponja *Craniella arb* cuyo extracto presentó actividad contra células de carcinoma colorectal HCT116 IC₅₀ de 72.255 µg mL⁻¹. La purificación de los compuestos presentes en las fracciones del extracto de la cepa T-1 se realizó por HPLC fase normal y los compuestos mayoritarios se analizaron espectroscópicamente por ¹H RMN y por espectrometría de masas.

Análisis de la fracción H₂O:MeOH 1:2 – subfracción diclorometano de la cepa bacteriana T-1.

La fracción H₂O:MeOH 1:2 – subfracción diclorometano se separó en HPLC utilizando como fase móvil acetato de etilo. En el cromatograma se muestra la separación de diez compuestos presentes en esta subfracción (Figura 9). La señal etiquetada con el número 4 con un tiempo de retención de 9.6 minutos se analizó espectroscópicamente por H¹ RMN. En el espectro 1 se observan las siguientes señales: a δ 1.23 ppm una señal triple (o doble de doble) que integra para 4 protones; a δ 1.42 - 1.64 ppm una señal múltiple que integra para 8 protones; a δ 2.40 - 2.50 ppm una señal múltiple que integra para 2

protones; a δ 2.549 - 2.628 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 5.2 - 5.27 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón.

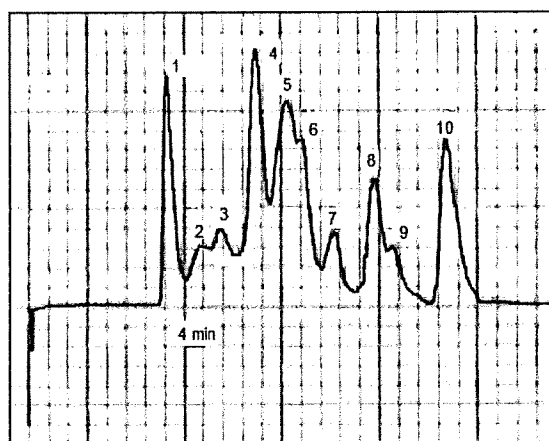
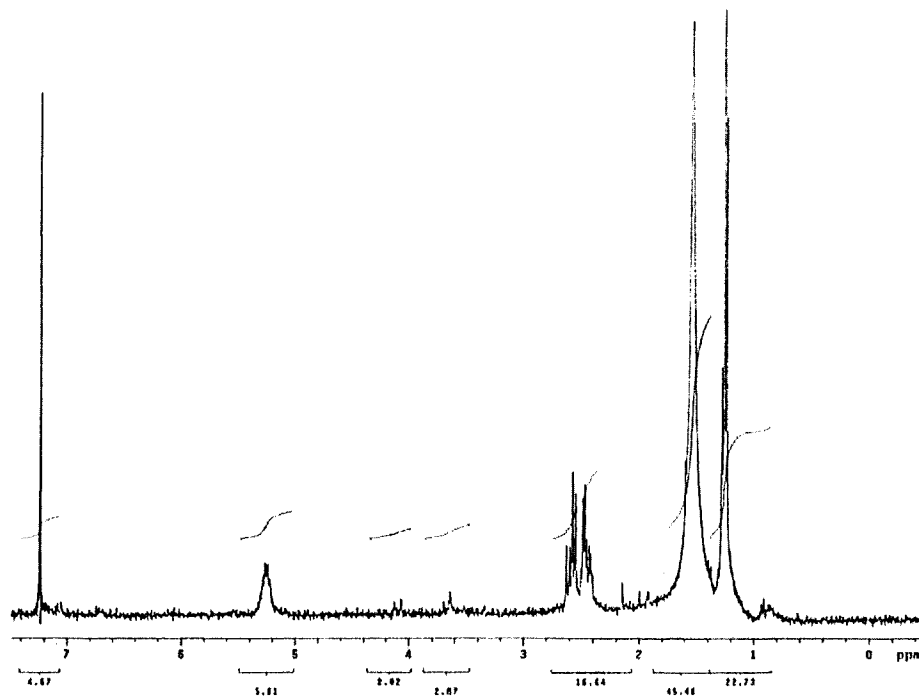


Figura 9. Cromatograma de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción diclorometano de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC.



Espectro 1. ¹H RMN del pico 4 obtenido de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción diclorometano de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.

Análisis de la fracción H₂O:MeOH 1:2 – subfracción acetato de etilo de la cepa T-1.

La fracción H₂O:MeOH 1:2 – subfracción acetato de etilo se separó en HPLC utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de acetato de etilo: acetonitrilo, 8:2. En el cromatograma se muestra la separación de por lo menos 5 compuestos, en donde el compuesto etiquetado con el número 4 con un tiempo de retención de 9.6 minutos es el mas abundante (Figura 10). El análisis espectroscópico por ¹H RMN (Espectro 2) de este compuesto revela las siguientes señales: A δ 1.193 - 1.296 ppm una señal múltiple (o doble de doble) que integra para 5 protones; a δ 1.55 ppm una señal simple que integra para 6 protones; a δ 2.40 - 2.50 ppm una señal múltiple que integra para 2 protones; a δ 2.548 - 2.628 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 3.59 - 3.66 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 4.06 - 4.2 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón, y a δ 5.2 - 5.37 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón.

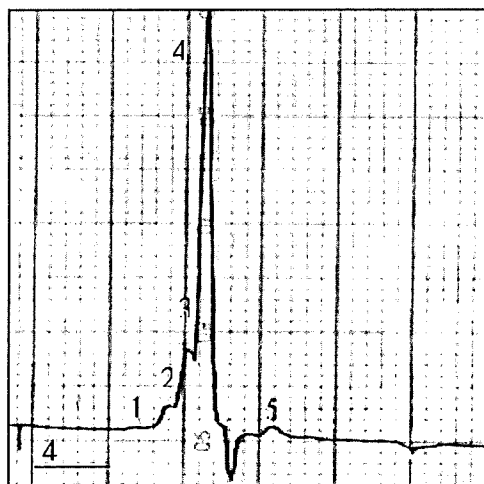
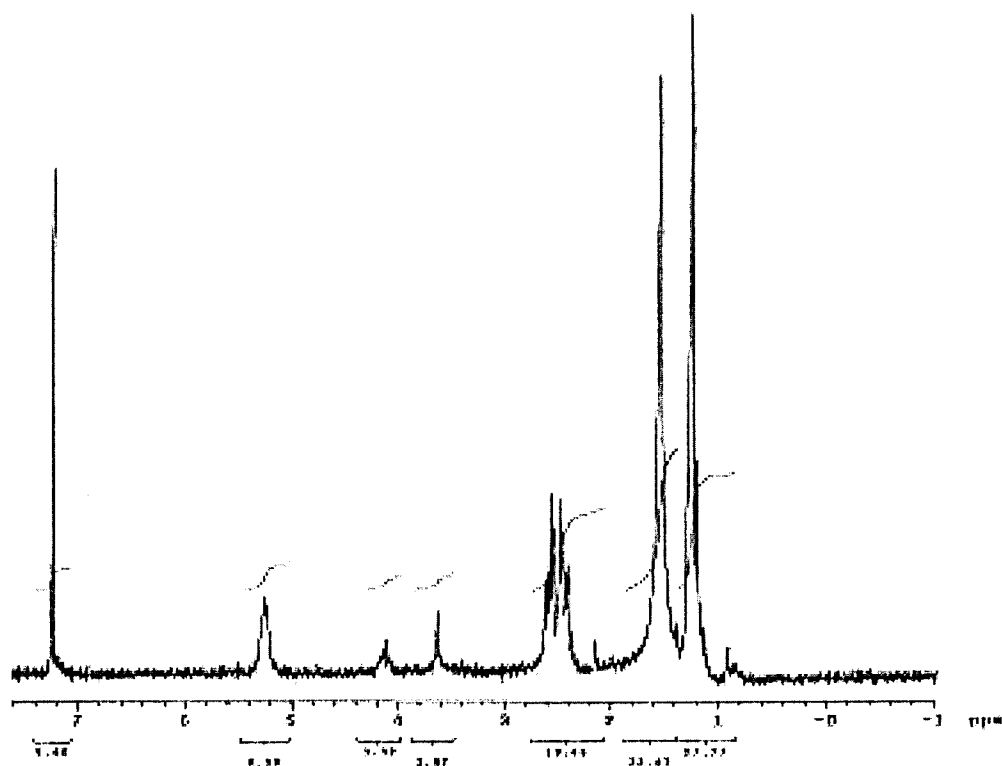


Figura 10. Cromatograma de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separada por HPLC.



Espectro 2. ^1H RMN del pico 4 obtenido de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC

En el análisis de masas por LC/MS del pico 4 obtenido por HPLC de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1, se detectaron cuatro compuestos principales con tiempos de retención de 14.61, 15.49, 16.25 y 16.89 (Figura 11). Las masas de cada uno de estos picos tuvieron un ion molecular de 499.2, 585.2, 671.3 y 625.2, respectivamente. En los espectros 3, 4, 5 y 6 se muestran los patrones de fragmentación de cada uno de los iones moleculares correspondientes a cada uno de los tiempos de retención.

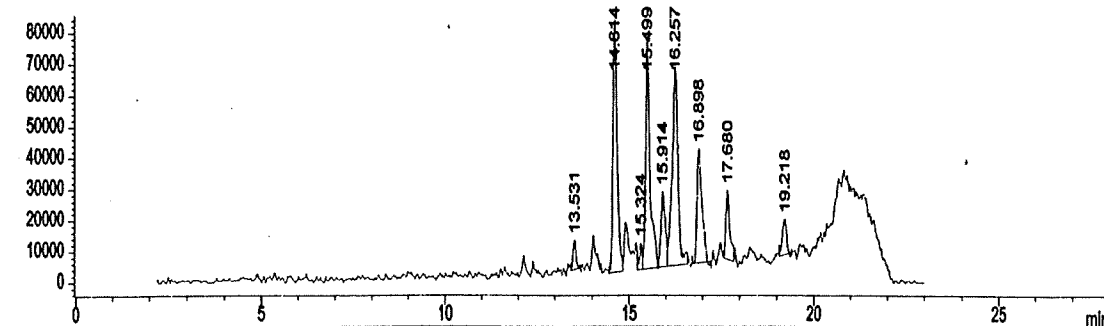
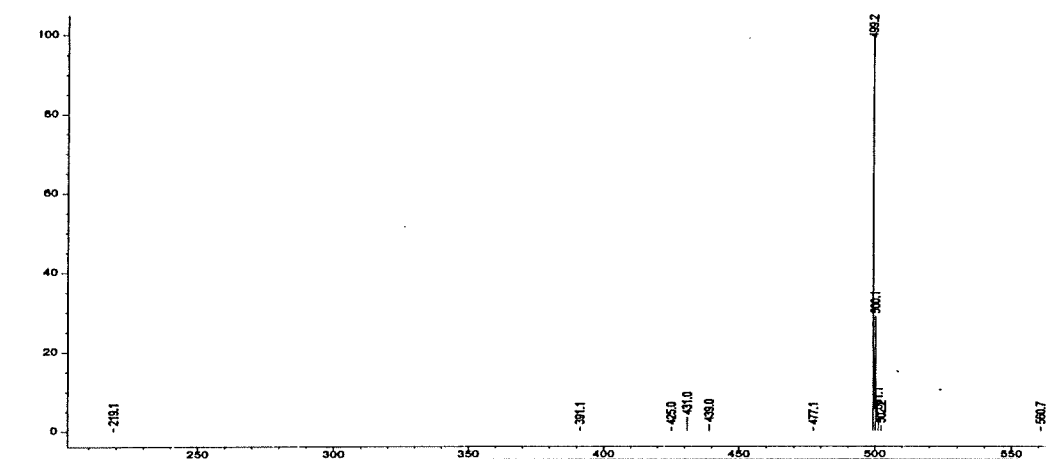
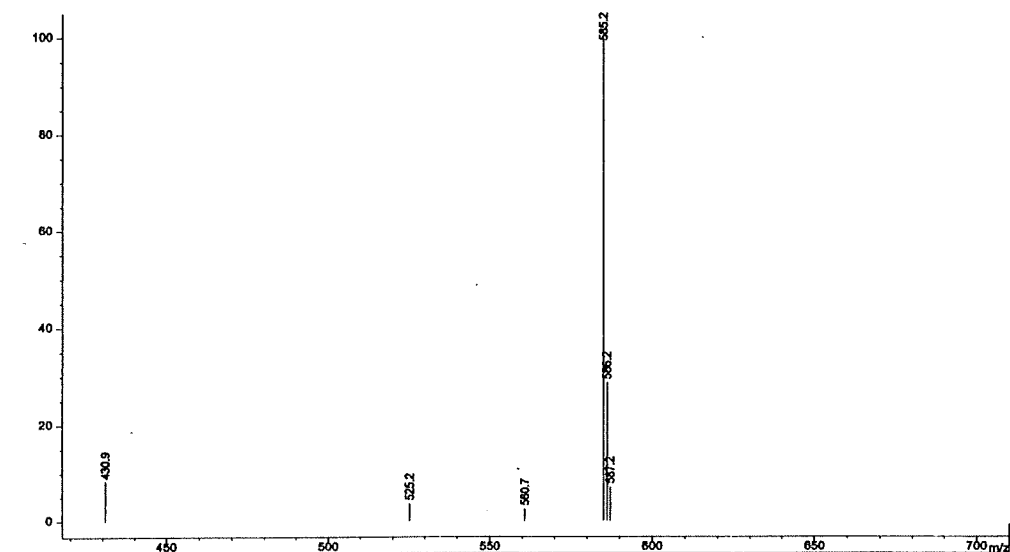


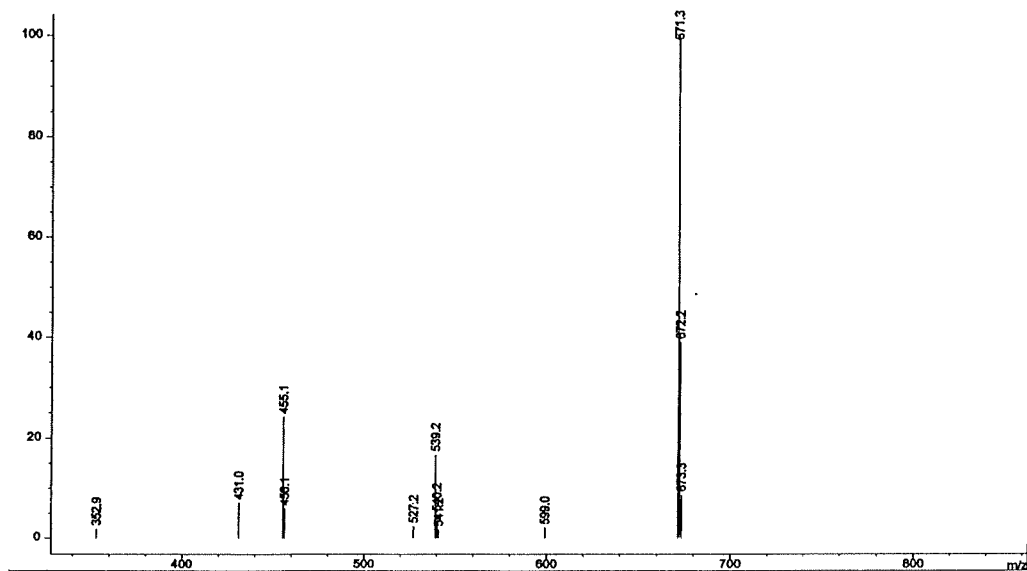
Figura 11. Cromatograma de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.



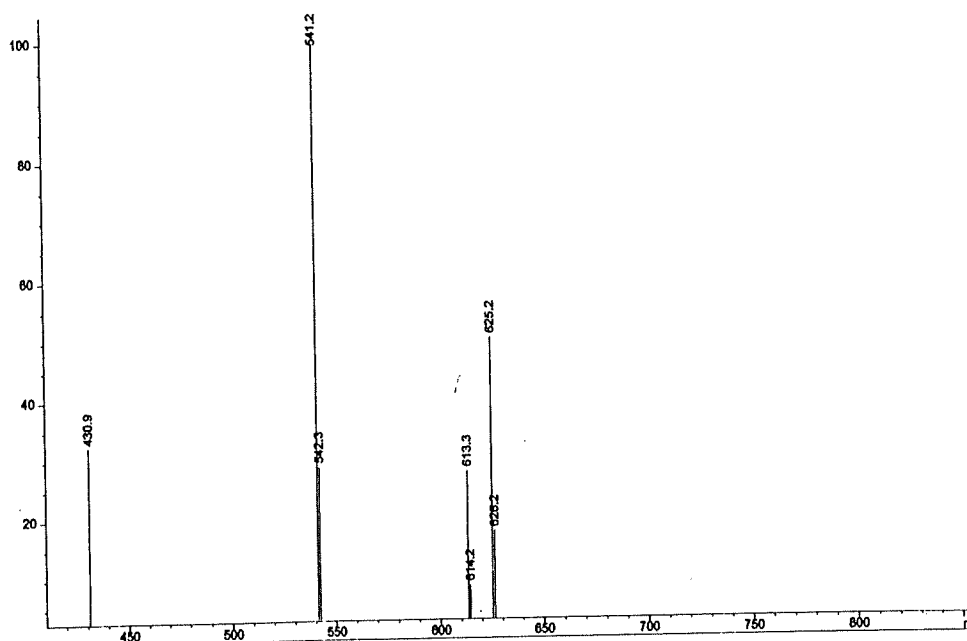
Espectro 3. Patrón de fragmentación del ion molecular de 499.2 con tiempo de retención de 14.61, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC



Espectro 4. Patrón de fragmentación del ion molecular de 585.2 con tiempo de retención de 15.49, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.



Espectro 5. Patrón de fragmentación del ion molecular de 671.3 con tiempo de retención de 16.25, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.



Espectro 6. Patrón de fragmentación del ion molecular de 625.2 con tiempo de retención de 16.89, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.

Análisis de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1.

Los compuestos presentes en la fracción H₂O:MeOH 1:3 fueron separados en HPLC utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de acetato de etilo: metanol 9:1. En el cromatograma se muestra la separación de por lo menos 5 compuestos, en donde el compuesto que tiene un tiempo de retención de 12 minutos es el más abundante (Figura 12). El análisis espectroscópico por ¹H RMN (Espectro 7) de este compuesto revela las siguientes señales: a δ 0.894 ppm una señal triple (o doble de doble) que integra para 1 protón; a δ 1.128 - 1.379 ppm una señal múltiple que integra para 5 protones; a δ 1.5 - 1.8 ppm una señal múltiple que integra para 10 protones; a δ 2.4 - 2.68 ppm una señal múltiple que integra para 3 protones; a δ 3.450 ppm una señal triple (o doble de doble) que integra para 2 protones; a δ 3.629 ppm una señal triple (o doble de doble) que

integra para 1 protón; a δ 4.137 - 4.195 ppm una señal múltiple que integra para 1 protones; a δ 5.22 - 5.28 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón.

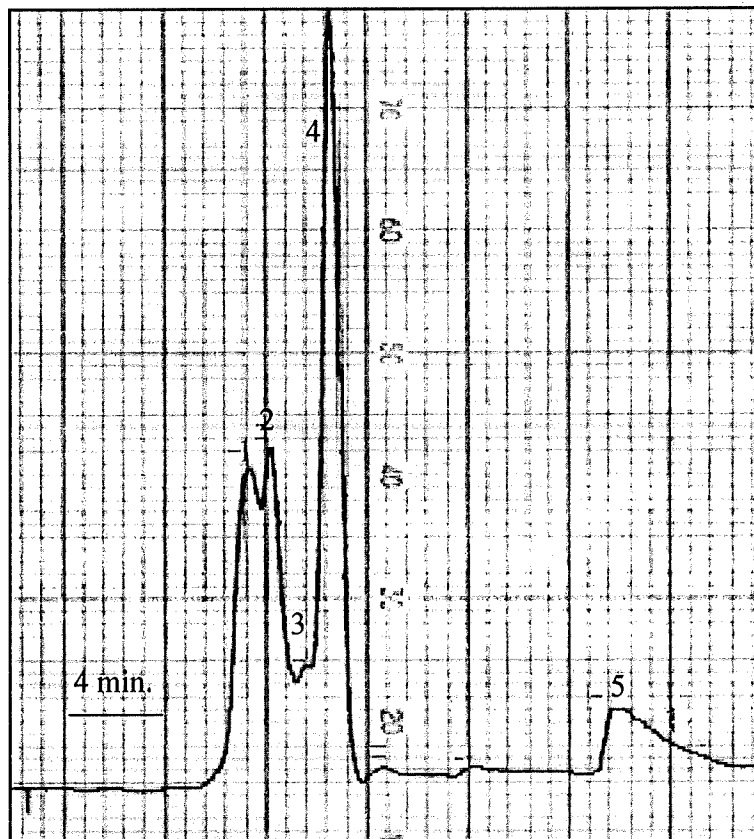
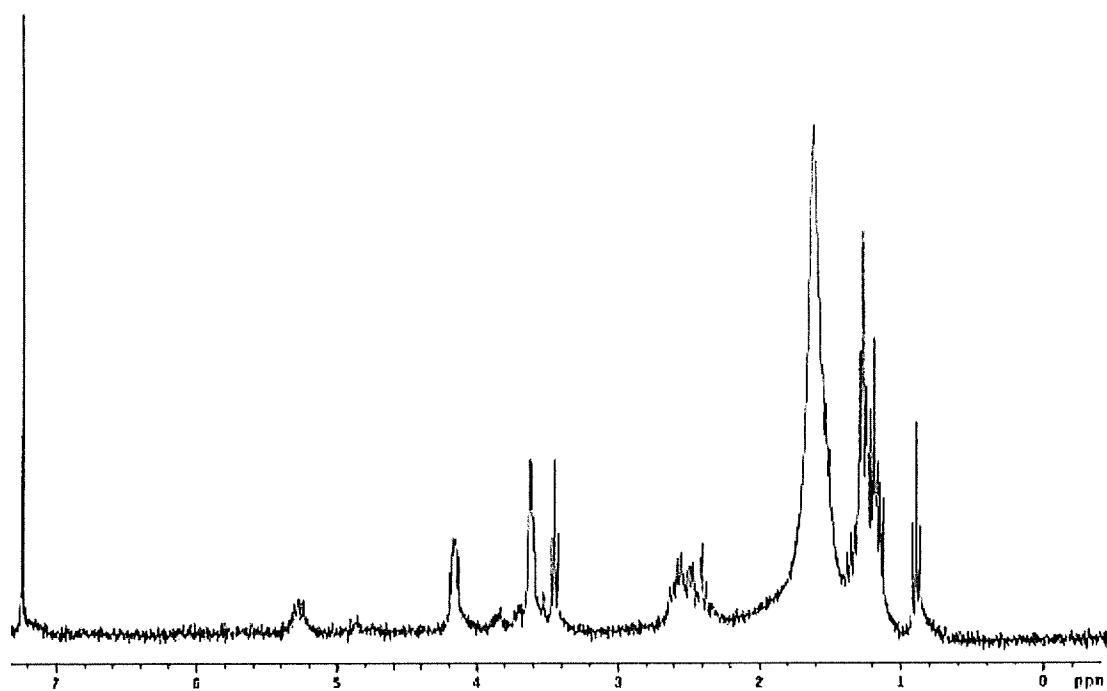


Figura 12. Cromatograma de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1.

En el análisis de masas por LC/MS del pico etiquetado con el número 4, obtenido por HPLC de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1, se detectaron (Figura 13) dos compuestos principales con tiempos de retención de 11.812 y de 18.903. Las masas de cada uno de estos picos tuvieron un ion molecular de 457.1 y de 421.3, respectivamente. En los espectros 8 y 9 se muestran los patrones de fragmentación de cada uno de los iones moleculares correspondientes a cada uno de los tiempos de retención.



Espectro 7. ^1H RMN del pico 4 de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 de la cepa bacteriana T-1 obtenido por HPLC.

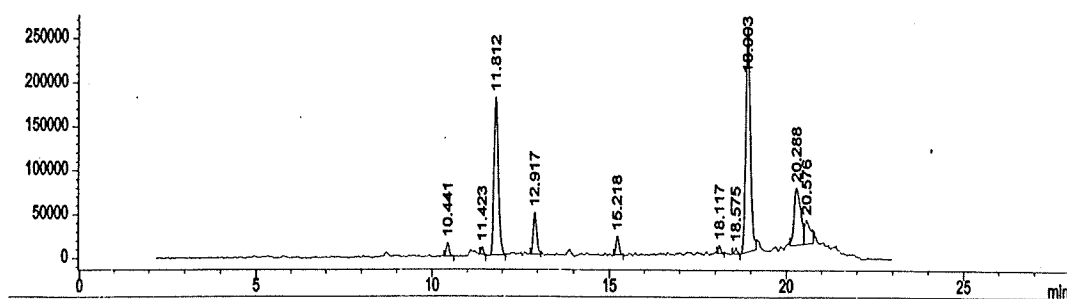
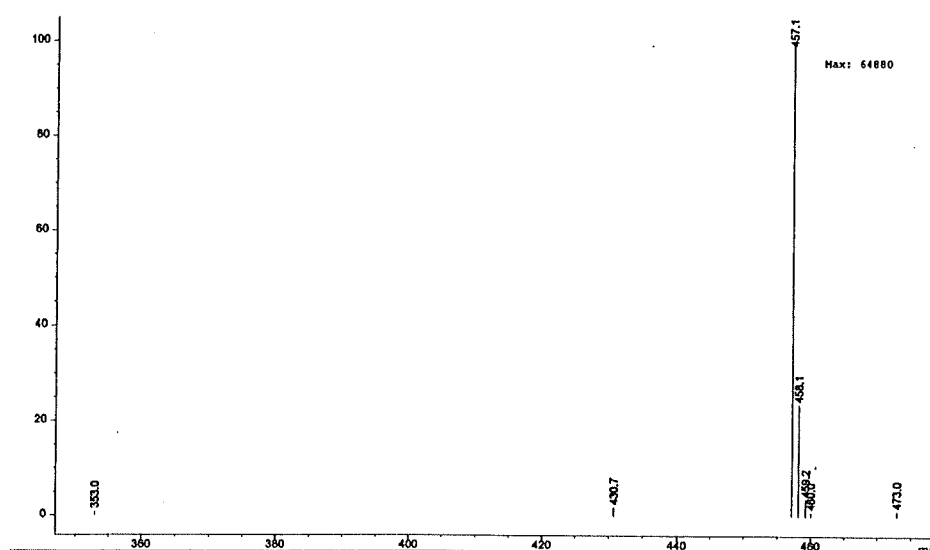
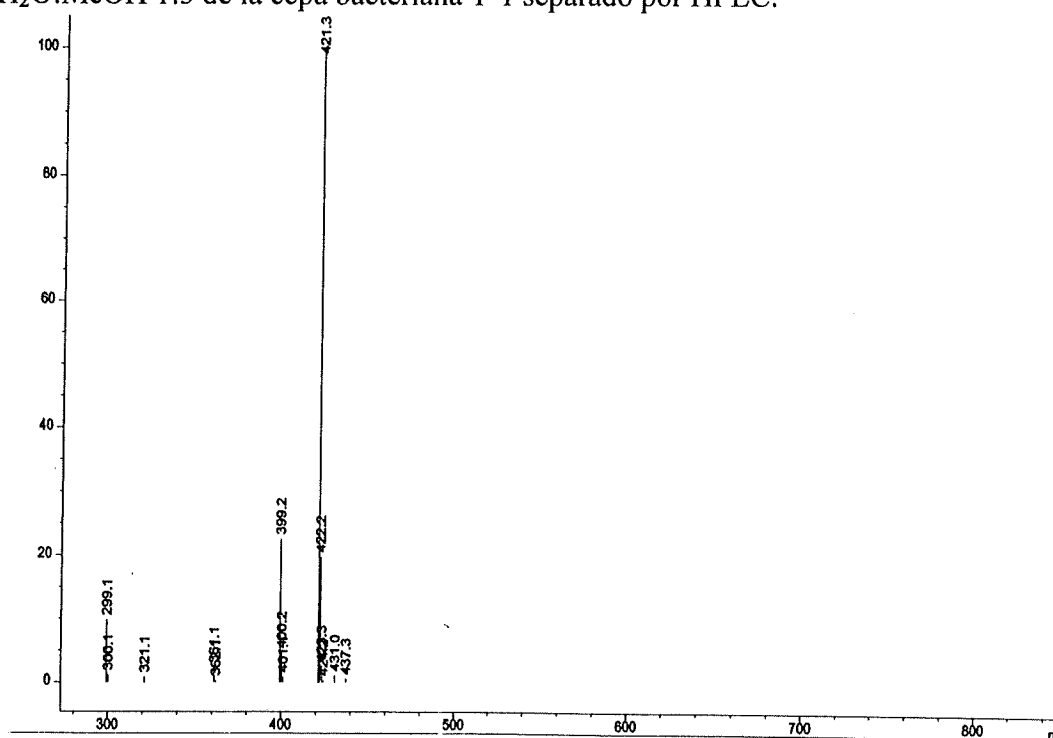


Figura 13. Cromatograma de LC/MS del pico 4 separado por HPLC de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 de la cepa bacteriana T-1.



Espectro 8. Patrón de fragmentación del ion molecular de 457.1 con tiempo de retención de 11.812, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.



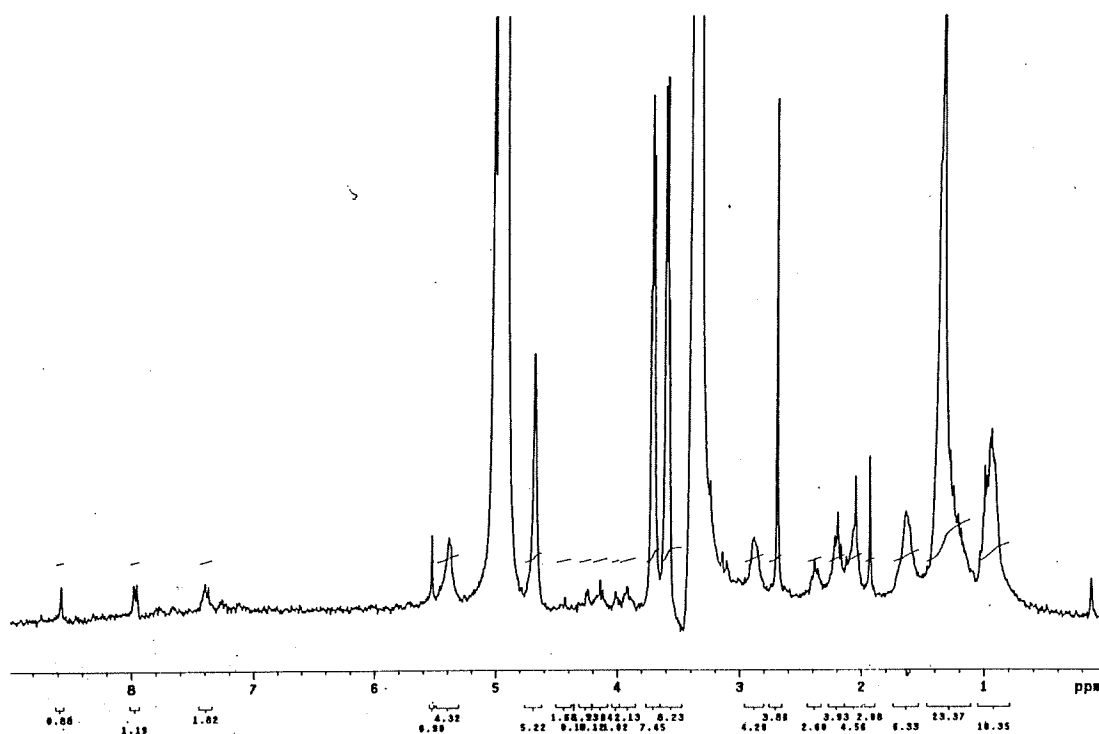
Espectro 9. Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.3 con tiempo de retención de 18.9, obtenido del análisis de LC/MS del pico 4 de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la cepa bacteriana T-1 separado por HPLC.

Con la finalidad de poder correlacionar la actividad del extracto de la cepa T-1 con la actividad del extracto de la esponja *Craniella arb*, el extracto de la esponja se percoló por cromatografía flash sobre gel sílica fase reversa C-18, utilizando como fase móvil mezclas de agua 100%, H₂O:MeOH 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, metanol 100%, acetonitrilo y acetato de etilo. A partir de la fracción H₂O:MeOH 1:2 se obtuvo una subfracción con acetato de etilo la cual fue analizada al igual que la fracción H₂O:MeOH 1:3 por ¹H RMN y por masas.

Análisis de la fracción H₂O:MeOH 1:2 – subfracción acetato de etilo de la esponja *Craniella arb*

El análisis espectroscópico de ¹H RMN (Espectro 10) muestra las siguientes señales: a δ 0.88 a 1.01 ppm una señal múltiple que integra para 10 protones; a δ 1.2 -1.4 ppm una señal múltiple que integra para 23 protones; a δ 1.55 - 1.67 ppm una señal múltiple que integra para 6 protones; a δ 1.927 ppm una señal simple que integra para 2 protones; a δ 2.01 - 2.1 ppm una señal múltiple que integra para 4 protones; a δ 2.16 - 2.24 ppm una señal múltiple que integra para 4 protones; a δ 2.32 - 2.4 ppm una señal múltiple que integra para 2 protones; a δ 2.69 ppm una señal simple que integra para 4 protones; a δ 2.84 - 2.92 ppm una señal múltiple que integra para 4 protones; a δ 3.2 - 3.4 ppm una señal múltiple; a δ 3.58 ppm una señal triple que integra para 8 protones; a δ 3.7 ppm una señal triple que integra para 8 protones; a δ 3.9 - 3.94 ppm una señal múltiple que integra para 2 protones; a δ 3.98 - 4.04 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 4.1 - 4.2 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 4.22 - 4.25 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 4.42 - 4.44 ppm una señal múltiple que

integra para 1 protón; a δ 4.6 ppm una señal simple que integra para 5 protones; a δ 5.3 - 5.5 ppm una señal múltiple que integra para 4 protones; a δ 5.5 ppm una señal simple que integra para 1 protón; a δ 7.35 - 7.45 ppm una señal múltiple que integra para 2 protones; a δ 7.9 - 8.0 ppm una señal múltiple que integra para 1 protón; a δ 8.5 ppm una señal simple que integra para 1 protón.



Espectro 10. ¹H RMN de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja *Craniella arb.*

En el análisis de masas por LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja *Craniella arb.*, se detectaron dos compuestos principales con tiempos de retención de 13.077 y de 18.618 las masas de cada uno de estos picos tuvieron un ion molecular de 367.1 y de 421.2 respectivamente (Figura 14). En los

espectros 11 y 12 se muestran los patrones de fragmentación de cada uno de los iones moleculares correspondientes a cada uno de los tiempos de retención.

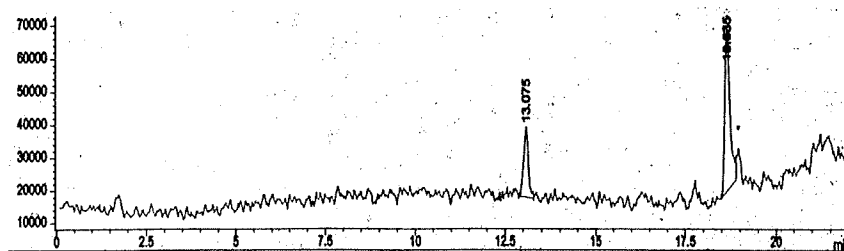
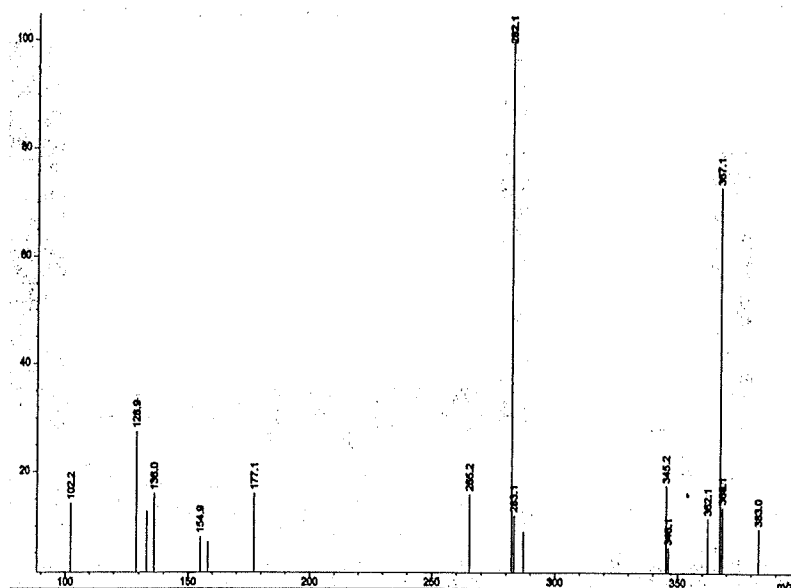
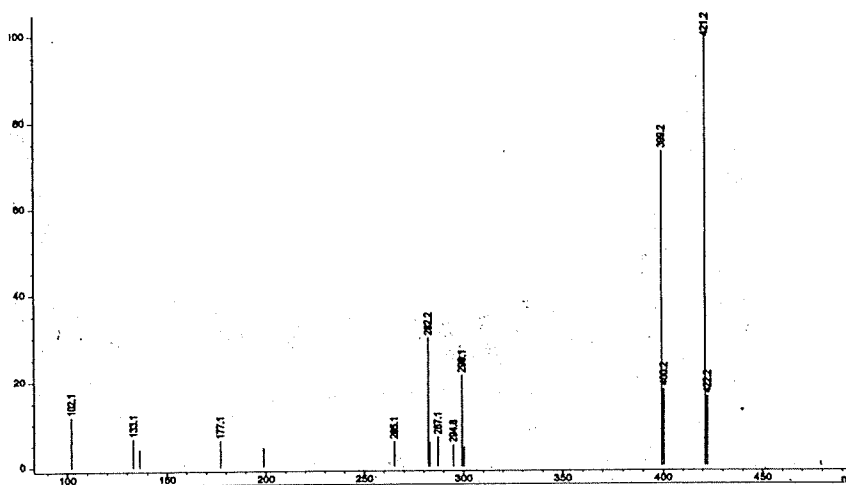


Figura 14. Cromatograma de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja *Craniella arb.*



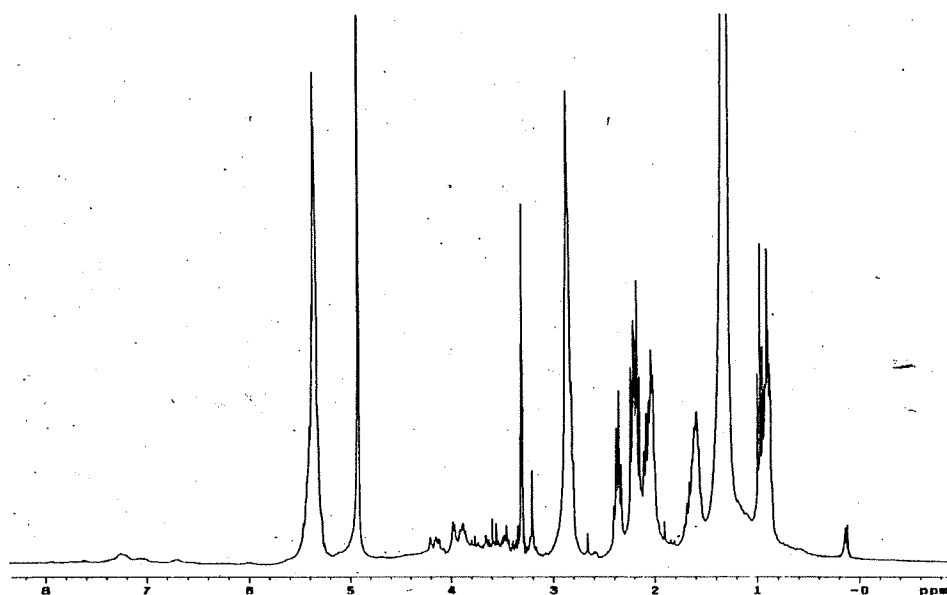
Espectro 11. Patrón de fragmentación del ion molecular de 367.1 con tiempo de retención de 13.077. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja *Craniella arb.*



Espectro 12. Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.2 con tiempo de retención de 18.618. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo del extracto de la esponja *Craniella arb.*

Análisis de la fracción H₂O:MeOH 1:3 de la esponja *Craniella arb.*

El análisis espectroscópico de ¹H RMN (Espectro 13) muestra las siguientes señales: a δ 0.86 - 1.0 ppm una señal múltiple; a δ 1.24 - 1.38 ppm una señal múltiple; a δ 1.55 - 1.7 ppm una señal múltiple; a δ 2.0 - 2.12 ppm una señal múltiple; a δ 2.13 - 2.24 ppm una señal múltiple; a δ 2.31 - 2.4 ppm una señal cuatruple; a δ 2.76 - 2.92 ppm una señal múltiple; a δ 3.18 - 3.24 ppm una señal múltiple; a δ 3.3 - 3.36 ppm una señal múltiple; a δ 3.44 - 3.64 ppm una señal múltiple; a δ 3.82 - 4.02 ppm una señal múltiple; a δ 4.04 - 4.424 ppm una señal múltiple; a δ 5.0 ppm una señal simple; a δ 5.2 - 5.5 ppm una señal múltiple; a δ 7.0 - 7.1 ppm una señal múltiple; a δ 7.18 - 7.32 ppm una señal múltiple. Las señales que aparecen a partir de δ 0.86 - 2.92 ppm y la señal a δ 5.5 ppm se parecen a las señales características de ácidos grasos insaturados. Sin embargo pueden ser otros compuestos.



Espectro 13. ^1H RMN de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb.*

En el análisis de masas mediante LC/MS de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb.*, se detectaron cuatro compuestos principales con tiempos de retención de 13.069, 18.616, 18.94 y 19.471 las masas de cada uno de estos picos tuvieron un ion molecular de 367.1, 421.2, 335.1 y 405.2 respectivamente (Figura 15). En los espectros 14, 15, 16 y 17 se muestran los patrones de fragmentación de cada uno de los iones moleculares correspondientes a cada uno de los tiempos de retención.

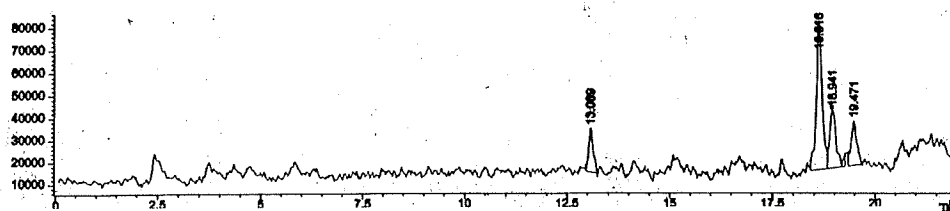
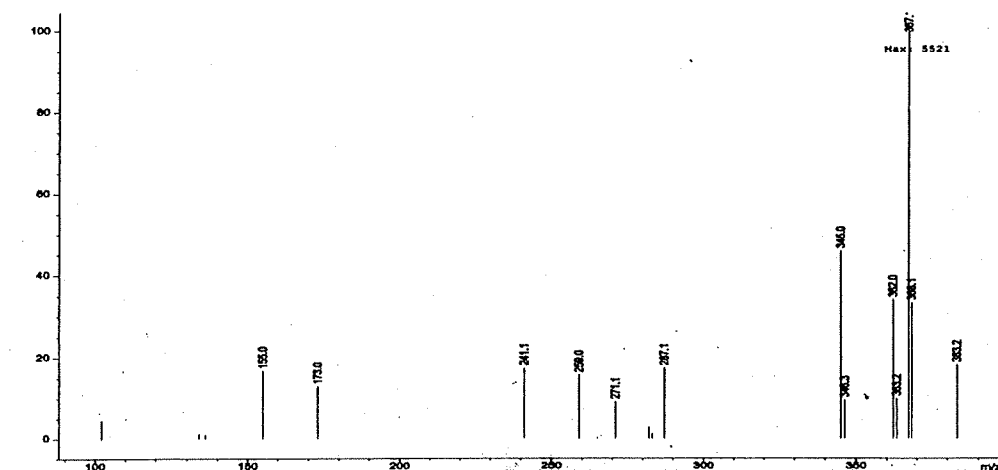
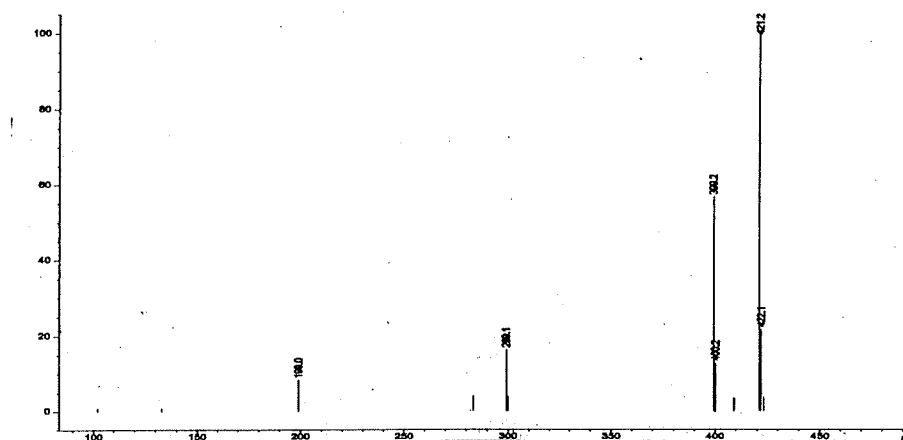


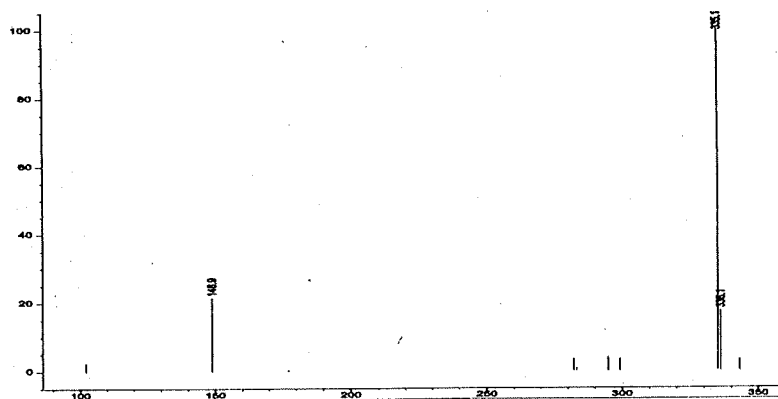
Figura 15. Cromatograma de LC/MS de la fracción $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb.*



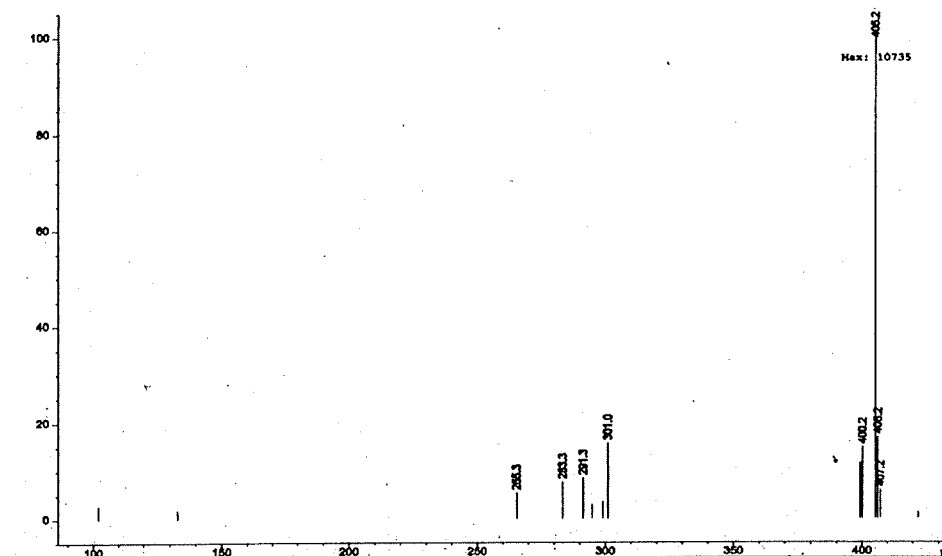
Espectro 14. Patrón de fragmentación del ion molecular de 367.1 con tiempo de retención de 13.069. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb.*



Espectro 15. Patrón de fragmentación del ion molecular de 421.2 con tiempo de retención de 18.616. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb.*



Espectro 16. Patrón de fragmentación del ion molecular de 335.1 con tiempo de retención de 18.94. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb*.



Espectro 17. Patrón de fragmentación del ion molecular de 405.2 con tiempo de retención de 19.471. Obtenido del análisis de LC/MS de la fracción H₂O:MeOH 1:3 del extracto de la esponja *Craniella arb*.

Al comparar los resultados espectroscópicos de ¹H RMN y de masas de las fracciones agua: metanol 1:2 y 1:3 de los extractos de la cepa bacteriana T-1 y de la esponja *Craniella arb* se encontró una similitud en las señales que se encuentran en la fracción agua: metanol 1:3 de ambos extractos, en el análisis de LC/MS se observó un patrón de

fragmentación con ion molecular de 421.2 similar para ambos extractos y con el mismo tiempo de retención alrededor de 18.56 minutos, a la par este mismo patrón de fragmentación se encontró en la fracción agua: metanol 1:2 de la esponja. En la tabla XI se muestra la similitud de los compuestos de los extractos de la esponja y de la bacteria, comparando el ion molecular (M), el porcentaje de M+1 y de M+2, el patrón de fragmentación y los tiempos de retención.

Utilizando el ion molecular y la regla del 13 se puede obtener la fórmula condensada de la molécula, sin embargo, la posibilidad de que sea una molécula u otra es enorme. Por lo cual se realizó una búsqueda en la base de datos de compuestos microbiológicos “Anti BaseTM” buscando compuestos con peso molecular entre 422, 420 y 419, (Tabla XII) se encontraron compuestos que han sido aislados de microorganismos pero no se puede decir que alguno de estos es el mismo que es producido por la esponja o por la bacteria T-1. Para determinar la estructura de los compuestos producidos por la bacteria debido a que se obtiene una pequeña cantidad de extracto se requeriría realizar un cultivo a mayor escala de aproximadamente de 40 L.

Tabla XI. Similitud en los patrones de fragmentación de los compuestos presentes en los extractos de la esponja y la bacteria T-1.

LC/MS	Extracto de la cepa bacteriana T-1	Extracto de esponja <i>Craniella</i>	Extracto de esponja <i>Craniella</i>
	fracción H ₂ O: MeOH 1:3	<i>arb</i> fracción H ₂ O: MeOH 1:3	<i>arb</i> fracción H ₂ O: MeOH 1:2 subfracción acetato de etilo
Tiempo de retención	18.9	18.567	18.586
Ion molecular; porcentaje	421.3; 100%	421.2; 100%	421.2; 100%
M+1; porcentaje	422.2; 19%	422.1; 22%	422.2; 17%
M+2; porcentaje	423; 2.4%	423; 4 %	-
Patrón de fragmentación	401.1	-	-
	400.2	400.2	400.2
	399.2	399.2	399.2
	362	-	-
	361	-	-
	321.1	-	-
	300.1	-	-
	299.1	299.1	299.1
	-	199.0	294.8
	-	-	287.1
	-	-	282.2
	-	-	265.1
	-	-	177.1
	-	-	133.1
	-	-	102.1

Tabla XII. Compuestos que han sido aislados de microorganismos

Peso molecula r	Formula molecular	Nombre del compuesto	Microorganis mo	Activa contra
420.59	C ₂₅ H ₄₀ O ₅	Maesaquinone	-	-
420.51	C ₂₃ H ₃₂ O ₇	3a,4-,15-triacetoxy-12,13- epoxytrichothec-9-ene	<i>F. sulphureum</i>	-
420.57	C ₁₉ H ₃₆ N ₂ O ₆ S	Lincomycin-C	<i>S. lincolnensis</i> +ethionine	<i>S. aureus</i> <i>S. lutea</i>
420.46	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	Trichorabdal D	<i>Radbosia</i> sp	Antitumor
419.82	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₇	(4S)-4-Hydroxyochratoxin A	<i>Penicillium</i> sp	-

Por otra parte, los resultados obtenidos de la bioactividad de ambos extractos contra células de carcinoma colorectal HCT116 IC₅₀ son muy similares de 72.255 µg mL⁻¹ para la esponja y de 73.22 µg mL⁻¹ para la bacteria, el análisis espectroscópico de ¹H RMN y de masas indican que el compuesto con ion molecular de 422 se encuentra tanto en el extracto de la esponja como en el de la bacteria, por lo cual se da la pauta para suponer que la cepa T-1 que se encuentra asociada a *Craniella arb* contribuye con la producción de compuestos que se almacena en la esponja y que pueden ser bioactivos, a su vez la bacteria T-1 puede contribuir con la relación ecológica de la esponja y otras bacterias como se observó en el experimento de inhibición de crecimiento entre bacterias en donde esta bacteria inhibió el crecimiento de todas las bacterias que se aislaron a partir de esponjas en la presente tesis.

CONCLUSIONES

El experimento de inhibición de crecimiento entre bacterias fue de gran utilidad para seleccionar las bacterias candidatas como productoras de algún compuesto bioactivo, obteniendo un 17.5% de interacciones inhibitorias entre las bacterias aisladas de las esponjas y un 15% de interacciones bacteriostáticas.

Las cepas que presentaron bioactividad de inhibición de crecimiento contra otras cepas fueron:

R-3 y R-7b aisladas de la esponja *Plocania igzo*

M-4 procedente de *Spheciospongia confederata*

T-1 y T-2 originarias de *Craniella arb*

N-5en y la N5p aisladas de la esponja *Cliona* sp

De las siete bacterias con bioactividad de inhibición de crecimiento se pudieron identificar tres bacterias de acuerdo al 16S rRNA, la cepa R-3 obtuvo una homología del 96% a *Pseudovibrio*, la cepa M-4 presento una homología de 83% a *Bacillus* sp, la cepa T-2 tuvo una homología del 84% a *Vibrio*.

De los siete extractos bacterianos obtenidos, dos presentaron actividad contra células de carcinoma colorectal HCT116, la fracción obtenida con metanol 100% del extracto de la cepa M-4 con un IC_{50} de $25.64 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la fracción obtenida con agua: metanol, 1:3,

del extracto de la cepa T-1 con un IC_{50} de $73.22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Así mismo, el extracto de la cepa T-1 presento actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Proteus vulgaris*, además, el extracto de la cepa R-3 presento actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*.

El efecto de inhibición de crecimiento de bacterias producido por las cepas R-3, M-4 y T-1, pudo ser ocasionado por una competencia directa, o sea, que estas cepas produjeron alguna sustancia tóxica.

Los extractos de las cepas R-7b, T-2, N-5en y N-5p no presentaron actividad anticancerígena ni antibacteriana, por lo tanto, no podemos decir que en el experimento de inhibición de crecimiento las cuatro bacterias anteriores provocaron la inhibición de crecimiento por una competencia directa o indirecta. Sin embargo, no significa que estas bacterias no biosinteticen compuestos activos, ya que el medio de cultivo y las condiciones de cultivo utilizados para su crecimiento pudieron producir algún efectos en la producción de metabolitos secundarios.

Con los resultados de la actividad citotóxica, antibacteriana y el análisis químico de los extractos de la esponja *Craniella arb* y de su bacteria simbiote T-1, se puede proponer que la cepa T-1 contribuye con la producción de compuestos que se almacenan en la esponja y que pueden ser bioactivos. Ya que la bioactividad contra células de carcinoma colorectal HCT116 IC_{50} es muy similar de $72.255 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la esponja y de $73.22 \mu\text{g}$

mL⁻¹ para la bacteria, además, los análisis espectroscópico de ¹H RMN y de masas indican que el compuesto con ion molecular de 422 se encuentra en ambos extractos de la esponja y de la bacteria. Así mismo, la bacteria T-1 puede contribuir con la relación ecológica de la esponja con otras bacterias debido a que en el experimento de inhibición de crecimiento entre bacterias la cepa T-1 inhibió el crecimiento de todas las bacterias que se aislaron a partir de esponjas marinas en la presente tesis.

REFERENCIAS

Abbanat, D.; Leighton, M.; Maiese, W.; Jones, E. B.; Pearce, C.; Greenstein, M. **1998**, Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. I. Taxonomy and fermentation. *J. Antibiot.* 51, 296-302.

Althoff, K.; Schütt, C.; Steffen, R.; Batel, R.; Müller, W. E. G. **1998**, Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria?. *Marine Biology.* 130, 529-536.

Bauer, W.; Robinson, J. B. **2002**, Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology.* 13, 234-237.

Bernan, V. S.; Montenegro, D. A.; Korshalla, J. D.; Maiese, W. M.; Steinberg, D. A.; Greenstein, M. **1994**, Bioxalomycins, new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: taxonomy and fermentation. *J. Antibiot.* 47, 1417-24.

Beth, A. L. **2000**, Quorum Sensing and Starvation: Signal for Entry into Stationary Phase. *Current Opinion in Microbiology.* 3, 177-182.

Bradley, S. M. **1999**, Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae, *Nat. Prod. Rep.* 16, 653-674.

Bergquist, P. R. **1978**, Sponges, University of California Berkeley and Los Angeles, pp 256.

Carté, B. K. **1993**, Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4, 275-279.

De Lambenfels **1932**, Proceedings of the United States national museum 81, United States Government Printing office Washington.

Dixon, O. A.; Brunton, F. R. **1994**, Siliceous sponge- microbe biotic associations and their recurrence through the phanerozoic as reef mound constructors. *Palaios.* 9, 370-387.

Doshida, J.; Hasegawa, H.; Onuki, H.; Shimidzu, N. **1996**, Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. *J Antibiot.* 49, 1105-1109.

Erpenbeck, D.; Breeuwer, J. A. J.; Van Der Velde, H. C.; Van Soest, R. W. M. **2002**, Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrin sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Marine Biology.* 141, 377-386.

Faulkner, D. J. **1994**, Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 11, 355-394.

Faulkner, D. J.; Harper, M. K.; Haygood, M. G.; Salomon, C. E.; Schmidt, E. W. **2000**, Symbiotic bacteria in sponges sources of bioactive substances. En: Fusetani, N. (ed) *Drugs from the sea* Karger, Basel. 106-119.

Fenical, W. **1993**, Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem. Rev.* 93, 1673-1683.

Fredrickson, G. A.; Stephanopoulos, G. **1981**, Microbial competition. *Science.* 213, 972-979.

Friedrich, A. B.; Fischer, I.; Proksch, P.; Hacker, J.; Hentschel, U. **2001**, Temporal variation of microbial associated with the Mediterranean sponge *Aplisina aerophoba*. *FEMS Microbiology Ecology.* 38, 105-113.

Hansen, H. G.; Sorheim, R. **1991**, Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria, *Journal of Microbiological Methods.* 13, 231-241.

Hart, J. B.; Lill, R. E.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. **2000**, The Halichondrins: chemistry, biology, supply and delivery. En: Fusetani, N. (ed) *Drugs from the sea*. Karger, Basel. 134-153.

Haygood, G. M.; Schmidt, W. E.; Davidson, S. K.; Faulkner, J. D. **1999**, Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1), 33-43.

Ireland, C. M.; Copp, B. R.; Foster, M. P.; Mc Donald, L. A.; Radisky, D. C.; Swersey, J. C. **1993**, Biomedical potential of marine natural products marine biotechnology. *Pharmaceutical and bioactive natural products. 1*, 1-43.

Jensen, P. R.; Kauffman, C. A.; Fenical, W. **1996**, High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine alga. *Marine Biology.* 126, 1-7.

Kievit, T. R.; Iglewsky, B. H. **2000**, Minireview. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationship. *Infection and Immunity.* 9, 4839-4889.

Kijjoa, A.; Sawangwong, P. **2004**, Drugs and cosmetics from the sea. *Marine drugs.* 2, 73-82.

Long, R.; Azam, F. **2001**, Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 67, 4975-5983.

MacFaddin, J. F. **2003**, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición . Editorial Panamericana, pp 850.

Maidak, B. L.; Cole, J. R.; Lilburn, T. G.; Parker, C. T.; Saxman, P. R., Farris, R. J.; Garrity, G. M.; Olsen, G. J.; Schmidt, T. M.; Tiedje, J. M. **2001**, The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29: 173-174.

Nair, S.; Simidu, U. **1987**, Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Applied and Environmental Microbiology.* 53, 2957–2962.

Powers, E. M. **1995**, Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology.* 61, 3756–3758.

Prieto-Davó, A. **2002**, Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos. Tesis Ensenada, Baja California. pp 53.

Schmidt, E. W.; Obraztsova, A. Y.; Davidson, S. K.; Faulkner, D. J.; Haygood, M. G.; **2000**, Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, “*Candidatus* Entotheonella palauensis” *Marine Biology.* 136, 969-977.

Soria-Mercado I. **2004**. Aislamiento y elucidación estructural de seminaftoquinonas bioactivas, a partir de un nuevo genero de Actinomiceto marino de la familia Streptomycetaceae. Tesis Ensenada, Baja California. pp 119 .

Talaro, P. K.; Talaro, A. **2002**, Foundations in Microbiology. 4^a edition. Editorial McGraw Hill. pp 534.

Unson, M. D.; Holland, N. D.; Faulkner, D. J. **1994**, A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*, 119, 1-11.

Webster, N. S.; Hill, R. T. **2001**, The culturable microbial community of the great barrier reef sponge *Rhopalaeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Marine Biology*. 138, 843-851.

Wicke, C.; Huners, M.; Wray, V.; Nimtz, M.; Bilitewski, U.; Lang, S. **2000**, Production and structure elucidation of glycolipids from a marine sponge-associated microbacterium species. *J. Nat. Prod.* 63, 621.

Wilkinson, C. R. **1978**, Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology*. 49, 161-167.

Wilkinson, C. R. **1978**, II. Microbial associations in sponges. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology*. 49, 169-176.

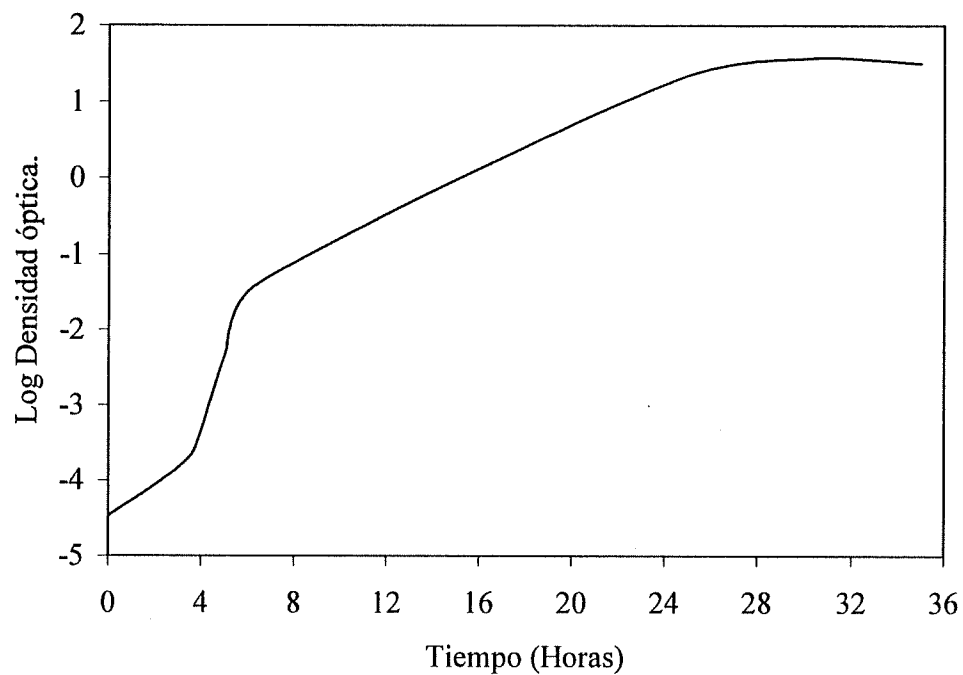
Wilkinson, C. R. 1978, III. Microbial associations in sponges. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Marine Biology*. 49, 177-185.

Wilkinson, C. R; Nowak, M., Austin, B.; Colwell, R. R.; 1981, Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier reef sponges. *Microb. Ecol.* 7, 13-21.

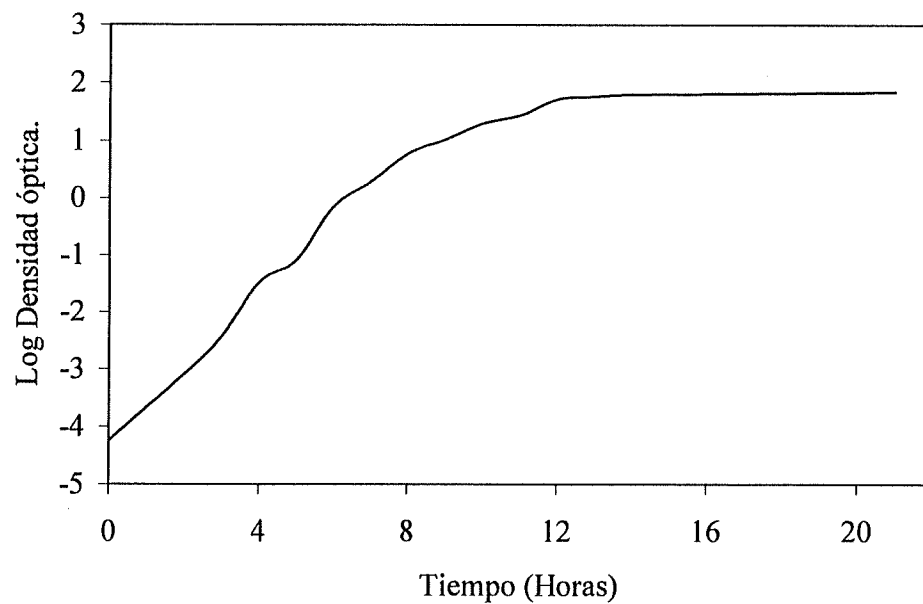
Williams, P. 2002, Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert. Opin. Ther. Targets*. 6(3), 257-274.

ANEXO

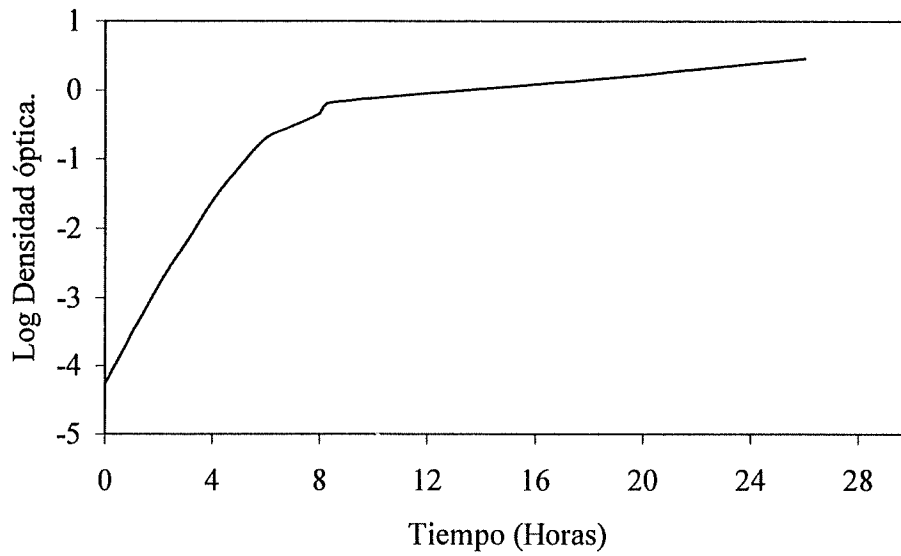
Curvas de crecimiento



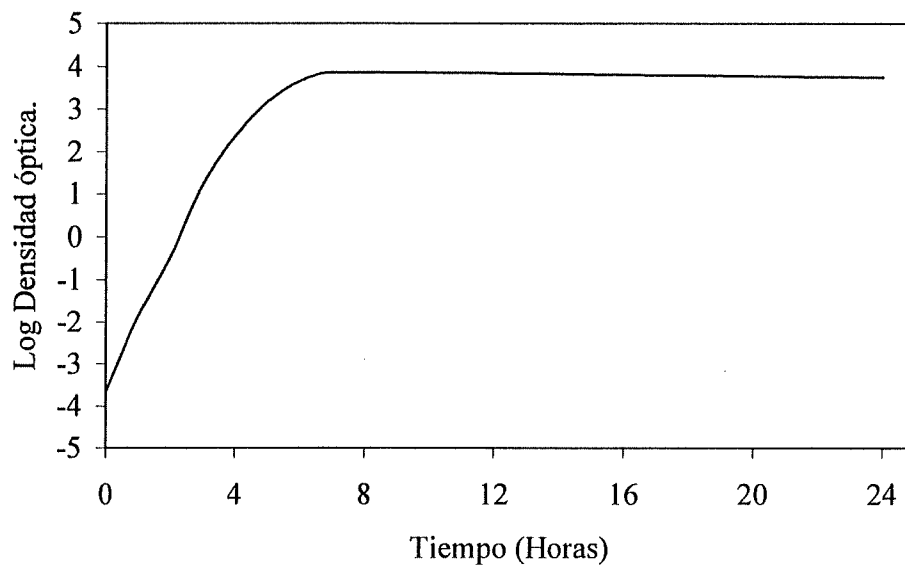
Gráfica 3. Curva de crecimiento de la cepa R-3



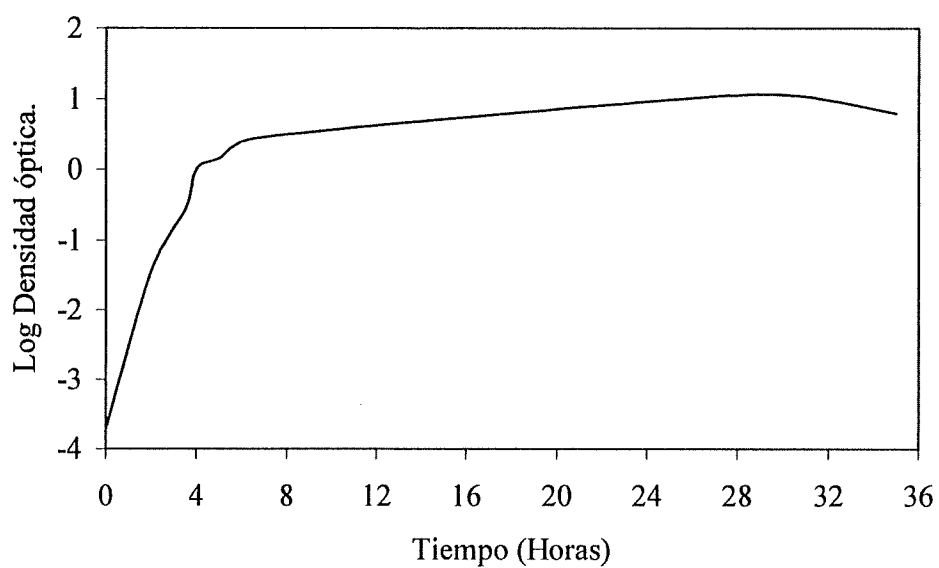
Gráfica 4. Curva de crecimiento de la cepa R-7b



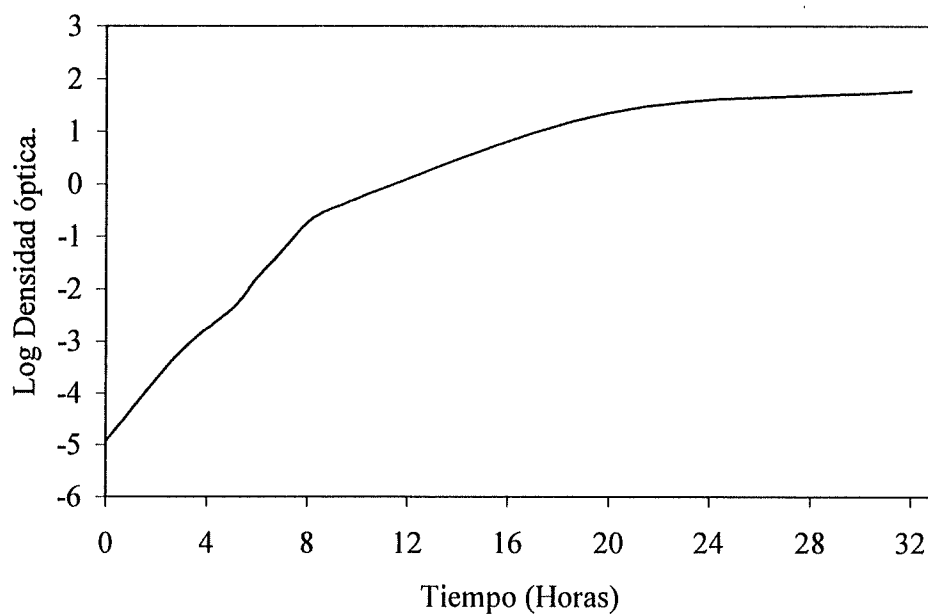
Gráfica 5. Curva de crecimiento de la cepa M-4



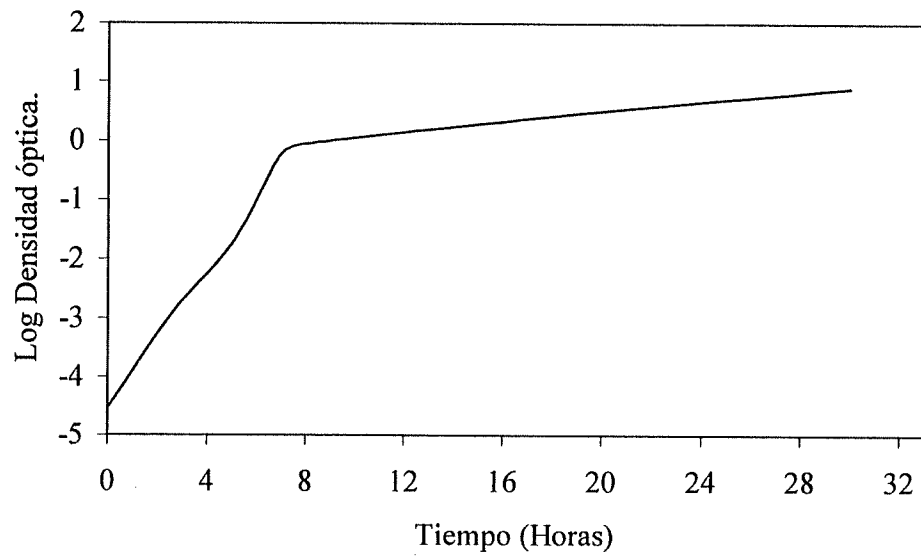
Gráfica 6. Curva de crecimiento de la cepa T-1



Gráfica 7. Curva de crecimiento de la cepa T-2



Gráfica 8. Curva de crecimiento de la cepa N-5en



Gráfica 9. Curva de crecimiento de la cepa N-5p