



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

Análisis de la microflora asociada a *Aplysina* sp., recolectada en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena (Ecuador), en la búsqueda de nuevos probióticos para uso acuícola

Proyecto para optar al Título de Ingeniero Acuicultor
por
Valeska Carolina Ardiles Tapia

Valparaíso
2015

Comité de Titulación:

Profesor Guía : Dra. Jenny Antonia Rodríguez León

Profesor : Dr. José Gallardo Matus

Profesor : Dra. Mariel Campalans

Profesor : Dr. Gabriel Yany

ACTA COMITÉ DE PROYECTO DE TÍTULO

“Análisis de la microflora asociada a *Aplysina* sp., recolectada en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena (Ecuador), en la búsqueda de nuevos probióticos para uso acuícola”

**De
Valeska Ardiles Tapia**

El proyecto de título de la alumna Srta. Valeska Ardiles de la carrera de Ingeniería en Acuicultura, es un trabajo original que realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL) en Ecuador, que tuvo como objetivo Analizar la flora microbiana asociada a esponjas marinas.

Para la realización de este proyecto la estudiante seleccionó y ejecutó diversas técnicas de diagnóstico para identificar la microflora asociada a las esponjas y luego probó mediante bioensayos con larvas de camarón *P. vannamei* el potencial de las bacterias seleccionadas, como probiótico para los peneidos cultivados en Ecuador.

El comité de titulación de la alumna reunidos el 12 de enero de 2015, acuerda calificar el documento de su proyecto de título con nota 6,8.

Jenny Rodríguez
Profesora Guía

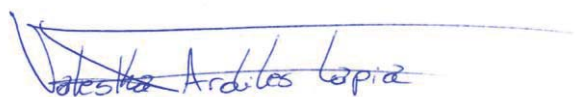
Sra. Mariel Campalans
Comisión

Sr. José Gallardo
Comisión

Sr. Gabriel Yany
Comisión

AUTORIZACIÓN DE USO

Al presentar este Proyecto como último requisito para la obtención del título de Ingeniero Acuicultor, autorizo a la biblioteca de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, para que disponga libremente de ella. Autorizo además reproducciones parciales o totales de este Proyecto sólo con fines académicos.

A handwritten signature in blue ink, reading "Valeska Carolina Ardiles Tapia". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Valeska Carolina Ardiles Tapia

DEDICATORIA

A mis padres, hermanas, familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al centro nacional de acuicultura e investigaciones marinas CENAIM-ESPOL, institución patrocinadora de este proyecto, por la oportunidad, el apoyo y la confianza. A todo el personal que en él trabaja por hacer de esta una gran experiencia de vida.

Al personal del laboratorio de microbiología por todo el conocimiento y apoyo entregado, gracias por ser mis amigos. A la Dra Jenny Rodríguez por la confianza y el apoyo.

A mis padres y hermanas por el apoyo incondicional, por aguantarme y quererme. A mis amigos, mis hermanos del alma, no lo habría logrado sin ustedes.

CONTENIDO

	pág.
Portada de presentación	
Comité de titulación	i
Acta de informe proyecto de titulación	ii
Autorización de uso	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1.- Introducción	1
2.- Objetivos	4
2.1.- Objetivo general	4
2.2.- Objetivos específicos	4
3.- Antecedentes	5
3.1.- Esponjas marinas	5
3.2.- Las esponjas como fuentes de productos naturales	6

3.3.- Bacterias asociadas a esponjas marinas	8
3.4.- Valoración de las bacterias marinas asociadas a invertebrados y sus bioproductos en acuicultura	9
4.- Materiales y métodos	12
4.1.- Localización geográfica del estudio	12
4.2.- Materiales biológicos	12
4.3.- Métodos	12
4.3.1.- Colección de muestras de esponjas	12
4.3.2.- Análisis histológico	13
4.3.3.- Técnicas microbiológicas	13
4.3.3.1.- Aislamiento bacteriano	13
4.3.3.2.- Reactivación y conservación de bacterias	13
4.3.4.- Determinación <i>in vitro</i> de la bioactividad antibacteriana	14
4.3.5.- Determinación <i>in vivo</i> del potencial probiótico de las bacterias	14
4.3.5.1.- Evaluación de la toxicidad de las posibles bacterias probióticas en zoeas de camarón <i>P. vannamei</i> .	14
4.3.5.1.1.- Preparación de inóculos bacterianos	14
4.3.5.1.2.- Diseño experimental	15
4.3.5.2.- Estudio de interacción <i>in vivo</i> entre posibles bacterias probióticas y bacterias luminiscentes, en postlarvas de camarón <i>P.vannamei</i>	16
4.3.5.2.1.- Preparación del inóculo bacteriano	16
4.3.5.2.2.- Diseño experimental	16

4.3.5.2.3.- Análisis histológico	17
4.3.7.- Análisis estadístico	17
5.- Resultados	18
5.1.- Recolección de esponjas y aislamiento bacteriano	18
5.2.- Análisis histológico esponja <i>Aplysina</i> sp.	18
5.3.- Activación de cepas bacterianas	20
5.4.- Pruebas de exclusión competitiva	20
5.5.- Evaluación de la toxicidad de las posibles bacterias probióticas en zoeas de camarón <i>P. vannamei</i>	24
5.6.- Estudio de interacción <i>in vivo</i> entre posibles bacterias probióticas y bacterias luminiscentes, en postlarvas de camarón <i>P.vannamei</i>	27
6.- Discusión	31
7.- Conclusión	34
8.- Recomendaciones	35
9.- Bibliografía	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Morfología de esponja	5
Figura 2: Diagrama de disposición de bacterias en placas	20
Figura 3: a y b, Especies de esponjas muestreadas. (c) Bacterias en agar marino.	22
Figura 4: a) Corte histológico donde se observan las diferentes capas que componen el cuerpo del animal, pinacodermo (flecha), mesohilo (asterisco) y coanodermo (blanco), Barra= 179 μ m. (b-c) Vista aumentada del pinacodermo y mesohilo, respectivamente, Barra= 38 μ m. (d) Microfotografía de coanodermo. Nótese las células ameboides (flecha) que rodean a los coanocitos, Barra= 8 μ m.	18
Figura 5: Cortes histológicos de tejido transversal de <i>Aplysina</i> sp. teñidos con tinción de Gram. (a) mesohilo y (b) sección pinacodermo. Barra= 8 μ m.	20
Figura 6: Crecimiento de las bacterias en diferentes medios sólidos, (a) agar peptona, (b) TSA, (c) agar LB.	20
Figura 7: Exclusión competitiva en: (a) <i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11 contra <i>V. vulnificus</i> ; (b) <i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17 contra <i>V. harveyi</i> ; (c) <i>Vibrio</i> sp. cepa 19 contra <i>V. parahaemolyticus</i> ; (d) <i>Vibrio</i> sp. cepa 19 contra <i>P. aeruginosa</i> . Fuente: Propia	21
Figura 8: Porcentajes de supervivencia de zoeas sometidas a 24 horas de exposición con cepas bacterianas aisladas de la esponja <i>Aplysina</i> sp. 11 (<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11), 14 (<i>V. agarivorans</i>), 15 (<i>Vibrio</i> sp. cepa 15), 19 (<i>Vibrio</i> sp. cepa 19).	25
Figura 9: Porcentajes de supervivencia de zoeas tratadas con bacterias aisladas de esponja <i>Aplysina</i> sp y desafiadas con <i>V. harveyi</i> . 11 (<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11), 14 (<i>V. agarivorans</i>), 15 (<i>Vibrio</i> sp. cepa 15),	26
Figura 10: Bacteria <i>V. agarivorans</i> . (a) actividad normal de la bacteria, (b) actividad agarolítica intensificada después del desafío en postlarvas de camarón.	27
Figura 11: Porcentajes de colonización de <i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11, <i>V. agarivorans</i> , <i>Vibrio</i>	29

sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18, *Vibrio* sp. cepa 19, de bacterias luminiscentes y de la flora bacteriana natural en postlarvas de camarón *P.vannamei*

Figura 12: Microfotografías de hepatopáncreas de organismos inoculados con bacterias patógenas presuntivas. (a) postlarvas del grupo control, (b) animales inoculados con bacteria 14sp, (c) camarones inoculados con bacteria 19sp. Nótese el deterioro del epitelio del hepatopáncreas (flecha). Barra = 179 μm . 30

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1: Actividad antibacterial de bacterias asociadas a <i>Aplysina</i> sp frente a <i>P. aeruginosa</i>	22
Tabla 2: Exclusión competitiva de bacterias aisladas de <i>Aplysina</i> sp frente a <i>Aeromonas</i> sp.	22
Tabla 3: Prueba de inhibición de bacterias aisladas de <i>Aplysina</i> frente a <i>Vibrio vulnificus</i>	23
Tabla 4: Bioactividad de bacterias asociadas a <i>Aplysina</i> frente a <i>V. parahemolyticus</i>	23
Tabla 5: Actividad antibacteriana de las cepas aisladas de <i>Aplysina</i> sp. frente a <i>V. herveyi</i>	24
Tabla 6: Supervivencia de zoeas en los 5 tratamientos luego de 24 horas de exposición	26
Tabla 7: Índices histológicos de las postlarvas de camarón inoculadas con bacteria <i>V. agarivorans</i> y <i>Vibrio</i> sp. cepa 19, y el control sin bacteria.	28

RESUMEN

La búsqueda de nuevos bioproductos antibacterianos cobra gran importancia debido al inevitable desarrollo de la resistencia a los antibióticos tanto en producción animal como en salud humana. Más de 15.000 productos naturales con potencial farmacéutico se han obtenido de un pequeño grupo de organismos marinos. Las esponjas marinas son animales sésiles cuyas estrategias de defensa están ligadas a metabolitos, los cuales pueden ser producidos por bacterias simbiotas. En Ecuador las investigaciones sobre esponjas y su microflora son inexistentes. En este estudio se abordó el análisis de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina* sp colectada en el islote El Pelado-Ayangue (provincia de Santa Elena, Ecuador) y evaluación como posibles probióticos. Se aislaron 19 bacterias cultivables, mayoritariamente de los géneros *Bacillus*, *Pseudoalteromona*, *Pseudovibrio* y *Vibrio*. Entre ellas 13 mostraron bioactividad *in vitro* contra bacterias patógenas de interés acuícola. Seis bacterias se ensayaron en dos bioensayos *in vivo* en larvas de *Penaeus vannamei*. En el estadio de zoeas, la bacteria fue aplicada antes de un desafío con la cepa patógena *Vibrio harveyi*. En un segundo bioensayo, fueron aplicadas en postlarvas poseedoras de una fuerte carga de vibrios luminiscentes, a fin de evaluar su capacidad de desplazar una posible microflora patógena bien establecida en el animal.

Pseudovibrio sp. cepa 11, *Vibrio* sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18, poseen potencial probiótico. Estas cepas aumentaron la supervivencia de las zoeas y mostraron capacidad de desplazar los vibrios luminiscentes de las postlarvas. Dos cepas, *Vibrio agarivorans* y *Vibrio* sp. cepa 19, exhibieron cualidades patogénicas, causando mortalidad en zoeas y lesiones en postlarvas. Los resultados obtenidos indican el potencial de las bacterias asociadas a esponjas marinas. Esta es la primera vez que en Ecuador se estudian las bacterias de esponjas como probióticos para uso acuícola.

ABSTRACT

The discovery of new antibacterial bioproducts, becomes very important due to the inevitable development of antibiotic resistance in both animal production and human health. Over 15,000 natural products with pharmaceutical potential have been obtained from a small group of marine organisms. Marine sponges are sessile animals whose defense strategies are linked to metabolites, which can be produced by symbiotic bacteria. In Ecuador, studies on microflora associated to sponges are nonexistent. In this study was addressed the analysis of bacteria associated with sponge *Aplysina* sp collected in Pelado-Ayangue island (Santa Elena province, Ecuador) and evaluation as potential probiotic. Nineteen culturable bacteria strains were isolated, majority of the genera *Bacillus*, *Pseudoalteromona*, *Pseudovibrio* y *Vibrio*. Among them, 13 exhibited *in vitro* bioactivity against pathogenic bacteria of aquaculture interest. Six bacteria were tested in two *in vivo* bioassays in *Penaeus vannamei* larvae. In zoea stage, the bacteria were applied before a challenge test with *Vibrio harveyi* as pathogenic strain. In a second bioassay they were applied in postlarvae strongly loaded with luminescent vibrios in order to assess their ability to displace a possible pathogenic bacterium well established in animals.

Pseudovibrio sp. strain 11, *Vibrio* sp. strain 15, *Pseudovibrio* sp. strain 17, *Pseudovibrio* sp. strain 18, exhibited probiotic features. These strains increased the survival of zoeas and showed ability to displace the luminescent vibrios of the postlarvae. Two strains, *Vibrio agarivorans* and *Vibrio* sp. strain 19, exhibited pathogenic traits, causing mortality in zoeas and injuries in postlarvae. The results indicate the potential of bacteria associated to marine sponges. This is the first time in Ecuador that sponge bacteria are studied as probiotics for aquaculture use.

1.- INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos antibacterianos cobra gran importancia debido al inevitable desarrollo de la resistencia a los antibióticos tanto en producción animal como en salud humana, por ello el estudio de nuevas y poco exploradas fuentes se vuelve importante en el proceso de encontrar compuestos biológicamente activos que se puedan utilizar como nuevos antibióticos (Penesyán *et al.*, 2011). Los ecosistemas marinos tienen una inmensa diversidad de organismos poseedores de agentes químicos, que constituyen una fuente única de compuestos que podrían dar lugar nuevos fármacos. En la actualidad más de 15.000 productos naturales que incluyen numerosos compuestos con potencial farmacéutico se han obtenido de un pequeño grupo de plantas, animales y microbios marinos, pero aún queda mucho por investigar en este campo (Ravichandran *et al.* 2007; Ebada *et al.*, 2010; White *et al.*, 2012).

Las esponjas marinas constituyen un importante componente de las comunidades bentónicas, ya sea en términos de abundancia y diversidad, como en su habilidad para influir en los procesos bentónicos o pelágicos (Gili & Coma, 1998). En la actualidad se han realizados diversos estudios generando dos corrientes de investigación. Una sobre la gran cantidad de microorganismos que se encuentran asociados a ellas, los que tendrían valor tanto para la ecología como para la biotecnología, y la otra que estudia a las esponjas como una fuente rica en metabolitos secundarios biológicamente activos (Hentschel *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Penesyán *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2001).

La diversidad conocida de bacterias asociadas a esponjas comprende especies de diversos filos como Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Cianobacterias, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, espiroquetas, entre otros, incluyendo un nuevo candidato a filo "Poribacteria" que incluye bacterias específicas de ellas (Taylor *et al.*, 2007). Las secuencias que representan los filos bacterianos se han recopilados en las bibliotecas genéticas de ADN ribosomal 16s, las más frecuentes pertenecen a los filos Actinobacteria, Acidobacteria, y Chloroflexi (Taylor *et al.*, 2007).

La biología de la relación bacteria-esponja ha despertado gran interés entre los investigadores que estudian los organismos marinos como fuentes de productos naturales. Ello porque los compuestos antimicrobianos que se han aislados de esponjas pueden provenir de las bacterias asociadas, y esto ha llevado a la suposición de que simbiontes microbianos desempeñan un papel en la defensa de su esponja hospedera. Por ejemplo, las dicetopiperazinas, compuestos con actividad antibiótica y reguladores de producción hormonal y crecimiento, son producidos por *Micrococcus* sp. asociadas con la esponja *Tedania ignis* (Webster *et al.*, 2001). Algunos compuestos juegan un papel en la defensa del organismo hospedero contra la colonización microbiana no deseada, como es el caso de la bacteria *Pseudovibrio* sp., que gracias a la producción de ácido tropodietico (ATD) inhibe eficazmente a una amplia gama de bacterias marinas de diferentes grupos filogenéticos (Penesyan *et al.*, 2011).

Es ampliamente aceptado que las técnicas basadas en el cultivo son en algunos casos inadecuadas para el estudio de la diversidad de bacterias a partir de muestras ambientales, debido a que muchas bacterias no pueden ser cultivadas utilizando técnicas tradicionales (Kamke *et al.* 2010; Cassler *et al.*, 2008). La clonación y secuenciación de genes por análisis de ADNr 16s, así como el estudio de la bioquímica, aportan datos que pueden ser usados para describir la composición completa de la comunidad microbiana (Webster *et al.*, 2001). Esto puede ayudar en la manipulación experimental de las condiciones de cultivo para proporcionar el entorno adecuado para el crecimiento de bacterias específicas (basándose en información de sus congéneres) (Webster *et al.*, 2001). El análisis de ADNr 16s utilizando bancos de genes, ha extendido enormemente el conocimiento sobre la riqueza filogenética de bacterias asociadas a esponjas (Webster *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007; Kamke *et al.*, 2010). Si bien el conocimiento sobre la diversidad microbiana en esponjas ha mejorado, la bioactividad que estos organismos poseen está muy poco estudiada (Taylor *et al.*, 2007).

En Latinoamérica los estudios sobre esponjas son escasos y se centran mayormente en la identificación de las especies. En cuanto a los metabolitos que se pueden encontrar en ellas, solo unos cuantos se asocian a las bacterias que se presentes en estos animales o a las propiedades que ellas puedan tener (Hardoim *et al.*, 2009; Mora-Cristancho *et al.*, 2009;

Águila-Ramírez *et al.*, 2011; Alcolado, 1999; Kazanjian & Fariñas, 2006; López-Legentil *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2012)

Las enfermedades bacterianas que afectan a los cultivos de peces y camarones, principalmente las vibriosis, generan grandes pérdidas económicas a la industria acuícola (Dorsey & Robertson, 2013; Porubcan, 1996). Las restricciones que existen frente al uso de antibióticos, los tiempos de carencia de los mismos y la inevitable generación de resistencia de los organismos patógenos, motivan la búsqueda de nuevas alternativas para el control de estos microorganismos. Las investigaciones en esta materia apuntan a la identificación de nuevos fármacos y de tratamientos alternativos que permitan disminuir la prevalencia de estas enfermedades. Las esponjas son una fuente de metabolitos secundarios usados como mecanismos de defensa, los cuales pueden ser producidos por la bacterias que en ellas habitan. Estas bacterias especializadas en la defensa de su hospedero pueden constituirse en buenos candidatos a posibles probióticos para el control de patógenos en acuicultura.

En Ecuador las investigaciones asociadas a esponjas y su microflora son inexistentes. Este proyecto forma parte de la tesis post doctoral de la doctora Jenny Rodríguez. En este estudio abordaremos el análisis y evaluación como posibles probióticos de la flora microbiana asociada a esponjas marinas recolectadas en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena. Se aislaron y purificaron las bacterias cultivables. Se realizó la caracterización bioquímica y molecular, se probó su bioactividad con ensayos *in vitro* frente a bacterias patógenas y ensayos *in vivo* en zoeas y postlarvas del camarón *Penaeus vannamei*. Esta es la primera vez que en Ecuador se estudia la potencialidad de bacterias de esponjas como probióticos para uso acuícola.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Analizar la flora microbiana asociada a esponjas marinas recolectadas en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena, Ecuador, y evaluar su bioactividad en la búsqueda de candidatos a probióticos para uso acuícola.

2.2.- Objetivos específicos

- Colectar esponjas marinas de la familia *Aplysinidae*
- Analizar las diferentes estructuras del organismo
- Aislar cepas bacterianas asociadas a esponjas marinas
- Determinar la bioactividad antibacteriana de las bacterias aisladas
- Determinar el potencial probiótico de las bacterias mediante pruebas *in vivo* en zoeas y postlarvas de camarón *P. vannamei*

3.- ANTECEDENTES

3.1.- Esponjas marinas

El phylum Porifera constituye uno de los grupos de invertebrados más diverso y abundante, con aproximadamente 8.350 especies. Es un componente importante en una gran variedad de ambientes acuáticos, principalmente marinos (Vega *et al.*, 2012). Se compone de organismos bentónicos sésiles, se desarrollan a diferentes profundidades, son multicelulares simples y filtradores. Poseen numerosos y pequeños poros en la superficie del cuerpo, sus canales les permiten filtrar grandes cantidades de agua, el tamaño puede variar de 1 cm a 2 m de longitud, su forma y coloración es variable. Las células de las esponjas se disponen en tres capas (Fig 1): El pinacodermo la capa exterior, cuyas células se llaman pinacocitos; El mesohilo la capa intermedia, formada por una matriz gelatinosa con células ameboides que segregan el esqueleto; El coanodermo la capa interna, con células denominadas coanocitos que producen la corriente de agua y obtienen el alimento por filtración para luego fagocitarlo (Bergquist, 1978).

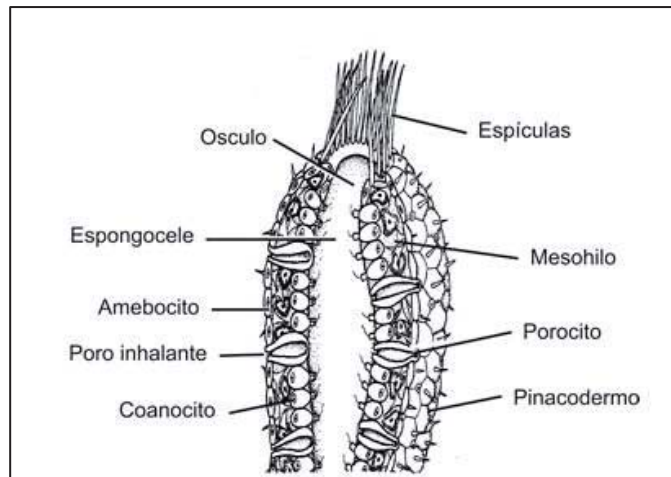


Figura 1: Morfología de esponja. Bergquist (1978)

Son los principales filtros de los cuerpos de agua, dejan el agua expulsada esencialmente estéril. Utilizan microorganismos procariontes como la principal fuente de alimentación, los cuales son atrapados por fagocitosis. Las diferentes relaciones simbióticas

entre las esponjas y los microorganismos pueden contribuir tanto a la salud de la esponja como a su alimentación, lo que podría indicar que existe un proceso selectivo que favorece a bacterias particulares (Enticknap *et al.*, 2006; Hardoim *et al.*, 2009; Hentschel *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2008)

Generalmente los animales marinos y principalmente los invertebrados son organismos capaces de sintetizar muchos compuestos bioactivos. Esto como una estrategia de adaptación a las condiciones ambientales extremas del mar y como una estrategia de defensa, especialmente los invertebrados sésiles y de cuerpo blando, como las esponjas. Solo aquellos organismos capaces de resistir sus defensas físicas y químicas podrían ser capaces de depredarlas (Müller *et al.*, 2004). Chaves-Fonnegra *et al.* (2005) proponen que la capacidad de las esponjas de competir por el sustrato, inhibir el asentamiento de epibiontes, producir efectos disuasorios sobre predadores, es provocada por las sustancias químicas que no tiene relación con el crecimiento y reproducción (Metabolitos secundarios). Los efectos ecológicos de los metabolitos secundarios dependen del ambiente físico y biológico en el que habitan los organismos (Puyana *et al.*, 2002). El aumento de las condiciones de estrés de los animales pueden provocar el incremento de la exudación de compuestos utilizados en defensa (Chaves-Fonnegra *et al.*, 2005).

3.2.- Las esponjas como fuentes de productos naturales

Las esponjas son una fuente importante de productos naturales, el interés farmacológico en las esponjas comenzó en los inicio de la década del 50 (Hentschel *et al.*, 2002; Ravichandran *et al.* 2007). El aislamiento de compuestos bioactivos de las esponjas ha sido ampliamente revisado (Águila-Ramírez *et al.*, 2011; Enticknap *et al.*, 2006; Hentschel *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2008; Ravichandran *et al.* 2007). Más de 15.000 productos marinos han sido descritos y cada año cientos de nuevos compuestos son descubiertos (Ravichandran *et al.* 2007; Ebada *et al.*, 2010; White *et al.*, 2012). Las esponjas se encuentran entre los principales productores de productos naturales (más del 30%).

En la última década los extractos de diversas esponjas se han estudiado ampliamente, *Halicondria* sp y *Petromica ciocolyptoides* poseen actividad antimicótica

(Mora-Cristancho *et al.*, 2007); *Ircinia felix* y *Verungula rigida* presentan actividad antibacteriana (Sepčić *et al.*, 2010) al igual que *Aplysina lacunosa* (Kazanjian & Fariñas, 2006); *Topsentia ophiraphidites* tiene propiedades hemolíticas y la especie *Myrmekioderma styx* demuestra actividad hemoaglutinante (Sepčić *et al.*, 2010). Los metabolitos secundarios son los principales responsables de estas actividades como en el caso de *Aplysina lacunosa* que posee saponinas, alcaloides, taninos y polifenoles, compuestos conocidos por su actividad antibacteriana (Kazanjian & Fariñas, 2006).

La mayoría de las sustancias bioactivas descubiertas se han clasificados como antiinflamatorios, antitumorales, inmunosupresores, neurosupresores, antivirales, antifúngicas, anticoagulantes, antibióticas o “antifouling”. La composición química de los productos comprende derivados de aminoácidos, esteroides, alcaloides, péptidos cíclicos, ácidos grasos, peróxidos, entre otros (Ravichandran *et al.* 2007). Las esponjas marinas tienen un potencial para proveer futuras drogas contra importantes enfermedades. Existen 11 géneros de esponjas que producen compuestos bioactivos y de ellos tres *Haliclona*, *Petrosia* y *Discodemia*, son conocidos por producir compuestos antimalaria, antitumorales y antiinflamatorios (Ravichandran *et al.* 2007). Hay metabolitos que poseen un rol dual, están involucrados directamente en la defensa y además participan en la activación de mecanismos de defensa (Müller *et al.*, 2004).

La familia *Aplysinidae* ha sido ampliamente estudiada por su abundancia (principalmente en el Caribe y en el Mediterráneo), la diversidad química y la gran cantidad de microorganismos asociados que posee (Schmitt *et al.*, 2005; Hentschel *et al.* 2002; Bergquist & Cook, 2002). Por lo general poseen un color amarillo, pero su coloración puede variar principalmente por la presencia de cianobacterias en el pinacodermo o por la oxidación de sus pigmentos; el mesohilo es homogéneo con gran presencia de colágeno (Bergquist & Cook, 2002). En esta familia se han identificado más de 100 diferentes metabolitos bromados con actividad citotóxica, antibacteriana y antidepredadora (Weiss *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997).

3.3.- Bacterias asociadas a esponjas marinas

Un análisis global mostró que las esponjas de diferentes océanos contienen una armadura microbiana filogenéticamente compleja y altamente específica, que probablemente está asociada permanentemente con la esponja, a menos que sean perturbadas por factores de estrés ambiental (Enticknap *et al.*, 2006; Fieseler *et al.*, 2004). Las esponjas albergan un gran número de bacterias, hasta el 40% del volumen del tejido (Enticknap *et al.*, 2006; Fieseler *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2008) y en algunos casos se evidencia una transmisión vertical de bacterias simbiotas (Enticknap *et al.*, 2006). Las esponjas en relación a su carga bacteriana se pueden dividir en dos: esponjas de alta y de baja abundancia microbiana. Una Alta abundancia proporciona una densa y diversa comunidad de microorganismos, con densidades de hasta 10^{10} células por gramos de peso húmedo de esponja, en contraste con la baja diversidad encontrada en esponjas de poca abundancia cuyas concentraciones no superan los 10^6 células por gramo (Enticknap *et al.*, 2006; Hentschel *et al.*, 2006; Weisz *et al.*, 2008).

Las relaciones simbióticas están involucradas en la adquisición de nutrientes, el suministro de fotosintatos a partir de simbiotas fotoautótrofos, la nitrificación; la fijación de nitrógeno, la fijación de carbono fotosintético, la estabilización del esqueleto, procesamiento de residuos metabólicos, y la producción de metabolitos secundarios, tales como antibióticos, compuestos antifúngicos, y compuestos que impiden la depredación o el asentamiento de epibiotas. Este último aspecto es de particular interés farmacéutico y biotecnológico, ya que muchos productos naturales derivados de esponja, de hecho pueden ser de origen microbiano (Enticknap *et al.*, 2006; Hentschel *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2008). Los compuestos alcaloides bromados que se encuentran en la esponja *Aplysina aerophoba*, pueden ser producidos por bacterias debido a que son ellas las que poseen las enzimas que unen los elementos halógenos para formar estos compuestos (Sacristan-Soriano *et al.*, 2011).

Thakur *et al.* (2003), sugirió que los animales marinos y sus microorganismos simbióticos producen compuestos bioactivos como defensa frente a atacantes, la esponja sintetiza compuestos que proporcionan protección contra microorganismos agresores y el simbiote produce metabolitos secundarios que actúan como antibióticos o como agentes

citoestáticos. Especies de *Bacillus* muestran actividad bactericida frente a bacterias del “fouling”, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio fischeri* (Kanagasabhapathy *et al.*, 2005), bacterias del género *Pseudovibrio* producen, ATD un compuesto antibacteriano (Penesyán *et al.*, 2011), *Pseudoalteromona tunicata* produce inhibición extracelular que impide el asentamiento y crecimiento de fouling (Kanagasabhapathy *et al.*, 2005). Las bacterias Nitrospiras de la esponja *Aplysina aerophora* son las responsables de la segunda etapa de nitrificación (Off *et al.*, 2010). Mora-Cristancho *et al.* (2009) probaron la capacidad antagónica de bacterias asociadas a esponjas en superficies con diferente grado de invasiones de “fouling” y De Rosa *et al.*, (2003) aislaron bacterias como fuentes de péptidos cíclicos. En algunos casos el aumento de las concentraciones normales de las bacterias simbiotas puede producir la muerte del organismo hospedero y no se conoce si las esponjas son capaces de regularlas (Thacker & Starnes, 2003).

Varios estudios han examinado la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a una esponja usando enfoques basados en el cultivo, que revelan que las comunidades microbianas pueden ser muy diferentes. Khan *et al.* (2012) analizaron *Actinobacterias* asociadas a tres esponjas de diferentes especies, pero solo se pudo cultivar los pertenecientes a una. Este género es importante porque constituye una fuente de compuestos activos. La población bacteriana está compuesta principalmente por bacterias extracelulares que están encerradas dentro de la matriz y que están físicamente separadas del agua de mar por las membranas del animal (Hentschel *et al.*, 2002).

3.4.- Valoración de las bacterias marinas asociadas a invertebrados y sus bioproductos en acuicultura

En la mayoría de los casos un aumento de la productividad acuícola se ve acompañado de un impacto ecológico, como es el caso de una mayor variedad de patógenos y de la resistencia bacteriana. Esto debido en parte al uso indiscriminado de agentes quimioterapéuticos (Balcázar *et al.* 2006). La introducción de antibacterianos altera el equilibrio de las bacterias con el medio ambiente, porque se ejerce una presión selectiva, se mata a las bacterias sensibles y se favorece la persistencia de aquellas que son resistentes (Levy, 1987). El mal uso de antibióticos trae como consecuencia un problema ecológico y

de salud pública, esto debido a que los organismos no solo generan resistencia, sino que también pueden transferir tal condición a otros (Levy, 1998).

En la actualidad la acuicultura requiere el uso de métodos alternativos o complementarios para el control de patologías, que sean amigables con el ambiente y beneficiosos para la salud y el bienestar del animal (Gatesoupe, 1999). Una de estas estrategias es la utilización de probióticos, existe evidencia suficiente para señalar que su uso mejora la respuesta inmunitaria de los organismos tratados (Dorsey & Robertson, 2013; Martínez *et al.*, 2012). Los orígenes de las cepas probióticas actualmente utilizadas no son solo marinos, sino que muchos provienen de cepas bacterianas aplicadas en humanos (Sihag & Sharma, 2012). El interés farmacológico en productos naturales de origen marino ha enfocado las investigaciones en el potencial bioactivo de invertebrados marinos y en algunos casos de sus simbioses, es por ello que las esponjas han sido ampliamente estudiadas en la última década en búsqueda de nuevos compuestos activos (Águila-Ramírez *et al.*, 2011).

Los probióticos, “Organismos vivos que otorgan beneficios saludables al individuo cuando son suministrados” (FAO & WHO, 2001), en algunos sistemas de cultivo han reducido la mortalidad y disminuido la necesidad de antibióticos (Gatesoupe, 1999; Dorsey & Robertson, 2013; Viera & Tavares, 2012), aumentando la protección no específica frente a enfermedades (Panigrahi & Azad, 2007). La selección de organismos candidatos a probióticos se basa en la actividad antagonista *in vitro* y en los resultados de colonización y crecimiento en el mucus del intestino de los animales (Irianto & Austin, 2002; Vine *et al.*, 2004; Vershuere *et al.*, 2000).

La relación entre los microorganismos presentes en el medio de cultivo y los organismos cultivados es compleja, debido a la influencia que los primeros ejercen en la microbiota de estos últimos (Vieira & Tavares, 2012). Por ello la inclusión de microorganismos benéficos en el cultivo puede favorecer su desarrollo. Estos microorganismos pueden ser aplicados en el alimento pelletizado (Makridis *et al.*, 2000; Carnevali *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 1995), en el alimento vivo (Gatesoupe, 1994), o en el medio de cultivo (Balcázar *et al.*, 2006; França *et al.*, 2008; El-Sersy *et al.*, 2006).

En la industria acuícola se utilizan probióticos para lograr diversos efectos: aumento de respuesta inmune en truchas (Nikoskelainen *et al.*, 2003), tilapia (Zhou *et al.*, 2010), carpa (Wang *et al.*, 2010), bagre (Queiroz & Boyd, 1998), camarón (Gullian *et al.*, 2004); incremento en la supervivencia en truchas (Kim & Austin., 2006); disminución de mortalidades y control de enfermedades en camarones (Balcázar *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009), en ostión (Riquelme *et al.*, 1996), en ostras (Gibson *et al.*, 1998) y ranas (França *et al.*, 2008).

Muchos de los microorganismos utilizados provienen de los mismos organismos cultivados (Balcázar *et al.*, 2006; França *et al.*, 2008), pero también existen trabajos donde se estudian los simbioses de diversos invertebrados como posibles probióticos como es el caso de la anémona de mar, estrella de mar, caracol turbante, erizo de mar (León *et al.*, 2010) y caracol pala (Pérez & Aranda, 2012).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Localización geográfica del estudio

La investigación se realizó en los laboratorios de microbiología y genética del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL). Ubicado en la comuna de San Pedro, de la parroquia Manglaralto, de la Provincia de Santa Elena, Ecuador, a 170 Km de Guayaquil; Latitud 1°57'' y Longitud Este 80°43''. Durante los meses de septiembre de 2012 y octubre de 2013.

4.2.- Materiales biológicos

Las esponjas se recolectaron en el Islote el Pelado, comuna de Ayanque, Santa Elena, Ecuador (01°55, 9' S – 80°47,2' W). Las 19 cepas bacterianas a evaluar se obtuvieron a partir de extractos acuosos de esponjas marinas (familia *Aplysinidae*), sembrados en agar marino, y fueron seleccionadas morfológicamente. Los principales géneros de las bacterias corresponden a *Bacillus*, *Pseudoalteromona*, *Pseudovibrio* y *Vibrio*.

Las cepas patógenas utilizadas en las pruebas *in vitro*, se obtuvieron del cepario del laboratorio de microbiología de CENAIM (cepa de *Vibrio harveyi*, cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, cepa de *Vibrio vulnificus*, cepa de *Aeromonas sp.* y cepa de *Pseudomonas aeruginosa*). La cepa probiótica, *Vibrio alginoliticus* (ILI), se utilizó como control, en los ensayos de exclusión competitiva.

Los nauplios y postlarvas de camarón *P. vannamei* se obtuvieron del laboratorio AquaLab, ubicado en la comuna de Ayanque, provincia de Santa Elena.

4.3.- Métodos

4.3.1.- Colección de muestras de esponjas *Aplysina sp.*

Para coleccionar las esponjas se empleó un equipo de buceo autónomo. La profundidad aproximada de la colecta fue de 10 a 20 m. De cada esponja se extrajo aproximadamente

500g, los que fueron introducidos en bolsas plásticas con agua del medio, registrándose la fecha, hora y ubicación, siendo trasladadas, en neveras de polietileno a temperatura ambiente, al laboratorio de Microbiología de CENAIM-ESPOL.

4.3.2.- Análisis histológico

Se realizaron cortes histológicos transversales y longitudinales en las esponjas con el fin de poder determinar las diferentes estructuras del organismo y la disposición de las bacterias dentro de ellas. Se utilizó tinción de Gram, para detectar bacterias Gram negativas y Gram positivas.

4.3.3.- Técnicas microbiológicas

4.3.3.1.- Aislamiento bacteriano

Las muestras de esponjas se lavaron con solución salina estéril al 2% para remover arena y detritus, los endobiontes y epibiontes visibles del tejido se retiraron manualmente. Con ayuda de un bisturí se picó la muestra en pequeños trozos los que se maceraron y diluyeron en solución salina al 2%, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo estériles, las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} se sembraron en placas de agar marino (Difco). La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de difusión en medio sólido, incubando por 12 horas a 28°C, luego de la incubación se seleccionó por diferencias morfológicas cada cepa y se purificó, mediante siembra por estrías, en placas individuales.

4.3.3.2.- Reactivación y conservación de bacterias

Para determinar las mejores condiciones de cultivo de las cepas aisladas, se verificó el crecimiento en diferentes medios sólidos utilizando la técnica de siembra por estrías. Los medios probados fueron: agar de soya tripticase (TSA), agar Luria-Bertani (LBA), agar nutritivo (NA), agar peptona (PA) y agar Mueller-Hinton (M-HA). Estos se prepararon en agua de mar filtrada.

El medio que permitió el mayor crecimiento se utilizó para la conservación de las cepas y para las pruebas de exclusión competitiva. Para la conservación las cepas se

resuspendieron en medio para congelar (al 2% de NaCl y 15% de glicerol) y se almacenaron en alícuotas de 500 µl a -20 °C, se verificó su concentración cada dos semanas durante dos meses.

4.3.4.- Determinación *in vitro* de la bioactividad antibacteriana

Para la prueba de exclusión competitiva se utilizó el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, con algunas modificaciones. Se utilizó medio peptona (Difco) según indicaciones del fabricante agregando agar al 2.5% en placas Petri de 4 mm de espesor. Se prepararon las cepas de bacterias de esponjas y probióticas, se sembraron 2 colonias en medio peptona (Difco) preparado con agua de mar filtrada y evaluando turbidez con Mcfarland para obtener concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 . Las cepas patógenas crecieron en medio LB al 2% de salinidad a una concentración final de 10^7 , por 6 horas.

Cada placa se inoculó con 200 µl de la suspensión de bacteria patógena repartiéndola por la superficie. Se perforaron 4 pozos de 6 mm de diámetro en los que se depositó 70 µl de cada suspensión bacteriana de esponja a distinta concentración y de la cepa control (a concentración 10^7). Las placas se incubaron durante la noche a 28 °C observando el comportamiento de las bacterias midiendo la zona de inhibición de los pozos.

4.3.5.- Determinación *in vivo* del potencial probiótico de las bacterias

4.3.5.1.- Evaluación de la toxicidad de las posibles bacterias probióticas en zoeas de camarón *P. vannamei*.

Los objetivos del bioensayo fue evaluar *in vivo* la inocuidad de las cepas bacterianas aisladas de esponjas sobre zoeas de camarón y determinar el grado de competencia entre las posibles cepas probióticas y el agente patógeno *V. harveyi*. Las cepas bacterianas a evaluar se seleccionaron según su desempeño en las pruebas de exclusión competitiva.

4.3.5.1.1.- Preparación de inóculos bacterianos

Cultivos preservados en -80 °C, se repicaron 1/100 en 100 ml de caldo peptona (Difco) con agua de mar, incubado durante 6 horas a 28°C con agitación constante. La concentración se determinó evaluando turbidez con Mcfarland, ajustando la dosis a una

concentración de 10^5 Bacterias/ml. La concentración final se corroboró con siembra en agar marino (Difco).

4.3.5.1.2.- Diseño experimental

El diseño fue con 5 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento (Fig. 2). La densidad utilizada fue de 10 y 20 zoeas en 10 ml de agua de mar estéril, en el primer y segundo experimento respectivamente, distribuidas aleatoriamente. Las cepas bacterianas utilizadas se seleccionaron en base a los resultados de exclusión competitiva, además de un control negativo (sin ningún inóculo) y un control positivo (inoculación con el patógeno *V. harveyi*).

En 5 placas de cultivo celular de seis pozos (Nunc) se sembraron zoeas y se inoculó una bacteria por placa, a una concentración de 10^5 , y se alimentó con microalgas (*Chaetoceros* sp.). Las postlarvas se mantuvieron en incubadora a 30 °C, con luminosidad constante. A partir de las 12 horas de exposición se evaluó la sobrevivencia y el comportamiento, retirando los organismos muertos y alimentando nuevamente. A las 24 horas de exposición se inoculó, tres pozos de cada placa, con un cultivo de la bacteria patógena *V. harveyi*. Luego de 12 horas de exposición se realizó el conteo final de organismos.

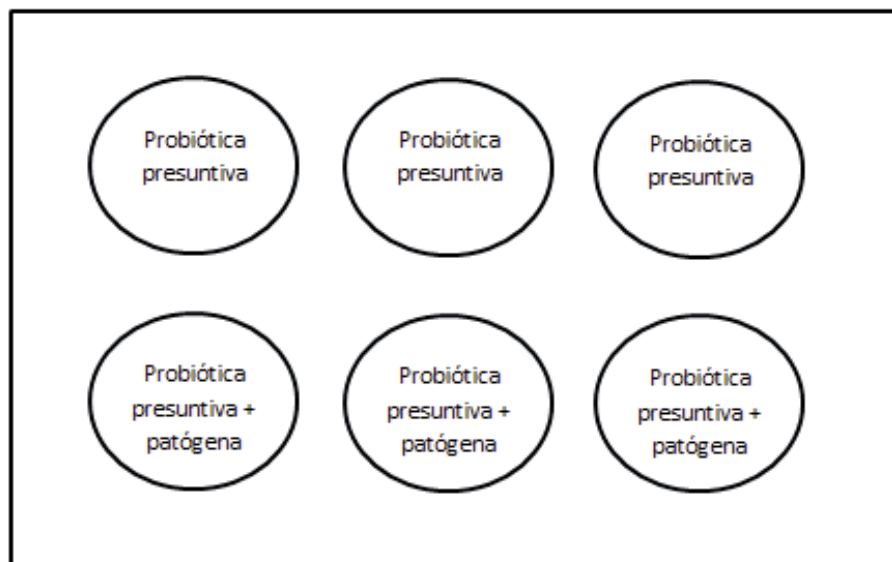


Figura 2: Diagrama de disposición de bacterias en placas

4.3.5.2.- Estudio de interacción *in vivo* entre posibles bacterias probióticas y bacterias luminiscentes, en postlarvas de camarón *P.vannamei*

El objetivo del bioensayo fue determinar la capacidad competitiva *in vivo* de las cepas bacterianas aisladas de esponjas en postlarvas de camarón con un alto contenido de bacterias luminiscentes (10^7 UFC), utilizando el método de inmersión. La concentración de bacterias luminiscentes se determinó por muestreos microbiológicos.

4.3.5.2.1.- Preparación del inóculo bacteriano

Se realizaron cultivos de la bacteria probiótica presuntiva, de 12 horas de crecimiento en agar Peptona (Difco) con agua de mar, utilizando el método de rayado. Se resuspendió el cultivo en solución salina 0.85% NaCl estéril, a un volumen final de un litro. La concentración se determinó en base a los datos de espectrofotometría, ajustando la concentración final de 10^7 bacterias/ ml por réplica, la concentración final se corroboró con la siembra de diluciones en agar marino (Difco).

4.3.5.2.2.- Diseño experimental

El diseño fue completamente aleatorio con 7 tratamientos y 5 réplicas por tratamiento. La densidad utilizada fue de 100 animales en 900 ml de agua de mar, filtrada y irradiada con UV, distribuidos aleatoriamente. Las bacterias utilizadas fueron las cepas con actividad biológica, además de un control sin bacteria.

Las postlarvas se aclimataron por 24 horas, con aireación constante y alimentación cada 6 horas con balanceado comercial (50% de proteínas). Se realizó una única inoculación bacteriana, con un volumen de 100 ml, para llegar a una concentración final de 10^6 . El tiempo de exposición fue de 48 horas.

Pasadas las 48 horas se realizó un análisis microbiológico con un gramo de postlarvas maceradas y diluidas en solución salina al 2%, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo estériles, las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} se sembraron en placas de agar marino (Difco). Las interacciones entre bacterias se calcularon contabilizando las UFC/g de postlarvas, en base a características morfológicas.

4.3.5.2.3.-Análisis histológico

La histología de las postlarvas de camarón se realizó utilizando el método descrito por Bell & Lightner (1988), se fijaron en Davidson alrededor de 40 animales por tratamiento. Una muestra de cinco camarones por tratamiento se observó para determinar el estado sanitario de los camarones, se elaboró un índice histológico que consideró la severidad de las lesiones (valores de 1 a 4) y el número de tejidos afectados (hepatopáncreas, branquias, músculo, epitelio del estómago, tejido conectivo, epitelio del intestino y apéndices). El valor promedio de las lesiones por animal se normalizó dividiéndolo por el máximo valor de severidad.

4.3.7.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los bioensayos, fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, a un nivel de confianza del 95%. La determinación de diferencias significativas en relación con el control se realizó con el Test de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Los datos se utilizaron bajo principios de normalidad y homogeneidad de varianzas.

5.- Resultados

En acuicultura, los probióticos constituyen una alternativa para el control de patologías. Los organismos marinos, en especial las esponjas, poseen comunidades bacterianas simbiotas con múltiples actividades biológicas, capaces de impedir el crecimiento de bacterias potencialmente peligrosas o sintetizar metabolitos usados por la esponja huésped como mecanismos de defensa. En este estudio se tomaron muestras de una esponja de la familia *Aplysinidae*, se aislaron bacterias para evaluar su utilidad como bacterias probióticas para el cultivo del camarón *P. vannamei*.

5.1.- Recolección de esponjas y aislamiento bacteriano

Se realizaron dos muestreos, en los cuales las esponjas extraídas contaban con similares características morfológicas: coloración violácea, un promedio de 5 mm de diámetro de los ósculos, superficie rugosa, altura de 5 a 6 cm (Fig. 2a y Fig. 2b). Se aislaron 19 cepas bacterianas. La selección de las bacterias se basó en sus diferencias morfológicas de forma, coloración, tamaño y superficie (Fig. 2c).



Figura 2: a y b, Esponjas recolectadas. (c) Bacterias en agar marino. Fuente: Propia

5.2- Análisis histológico esponja *Aplysina* sp.

A partir de los cortes histológicos transversales y longitudinales se identificó las diferentes secciones del animal (Fig. 4), el pinacodermo, el mesohilo y el coanodermo. La

tinción de Gram permitió determinar la presencia de bacterias y su disposición dentro del cuerpo del animal (Fig. 5a) y en la superficie externa (Fig. 5b).

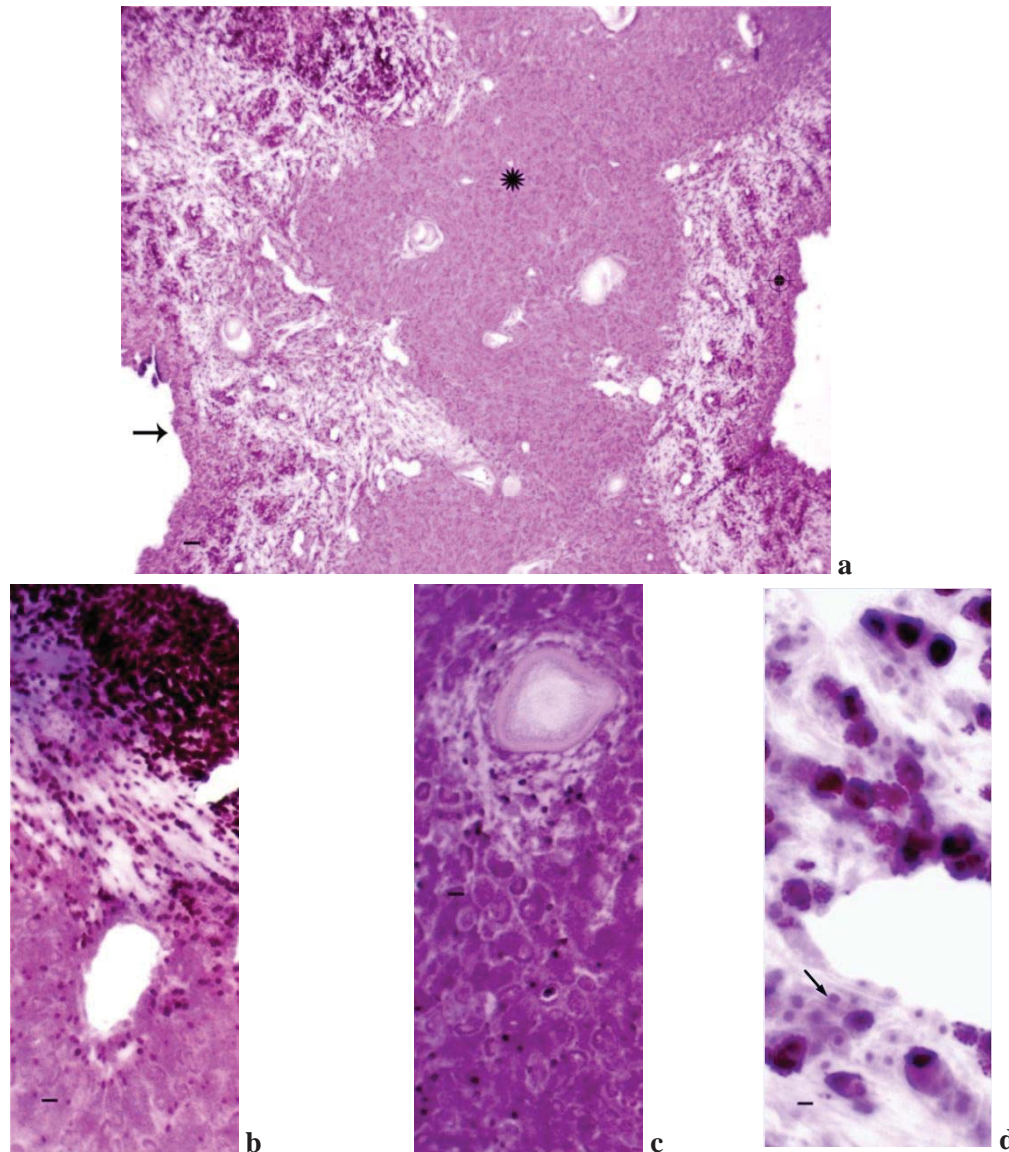


Figura 4: a) Corte histológico donde se observan las diferentes capas que componen el cuerpo del animal, pinacodermo (flecha), mesohilo (asterisco) y coanodermo (blanco), Barra= 179 μm . (b-c) Vista aumentada del pinacodermo y mesohilo, respectivamente, Barra= 38 μm . (d) Microfotografía de coanodermo. Nótese las células ameboides (flecha) que rodean a los coanocitos, Barra= 8 μm . Fuente: Propia.

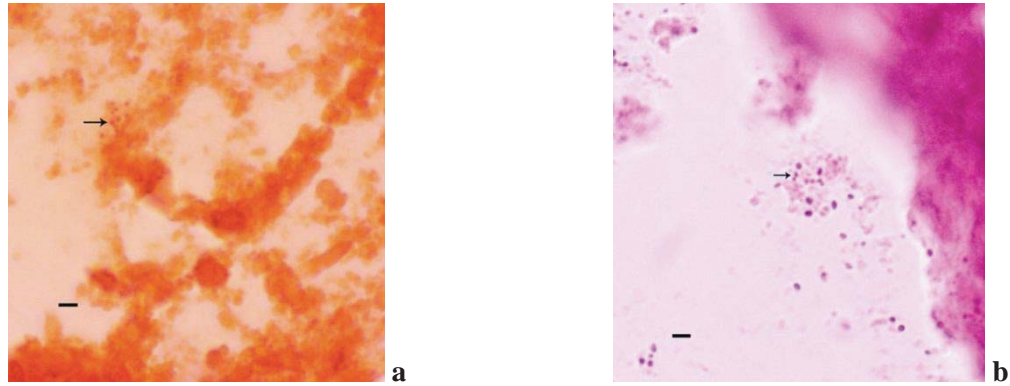


Figura 5: Cortes histológicos de tejido transversal de *Aplysina* sp. teñidos con tinción de Gram. (a) mesohilo y (b) sección pinacodermo. Barra= 8 μ m. Las flechas señalan grupos de bacterias. Fuente: Propia.

5.3.- Activación de cepas bacterianas

Las 19 cepas bacterianas aisladas de *Aplysina* sp. se probaron en 5 medios sólidos de cultivo, los mejores resultados de crecimiento se lograron con el agar peptona preparado con agua de mar filtrada (Fig. 6).

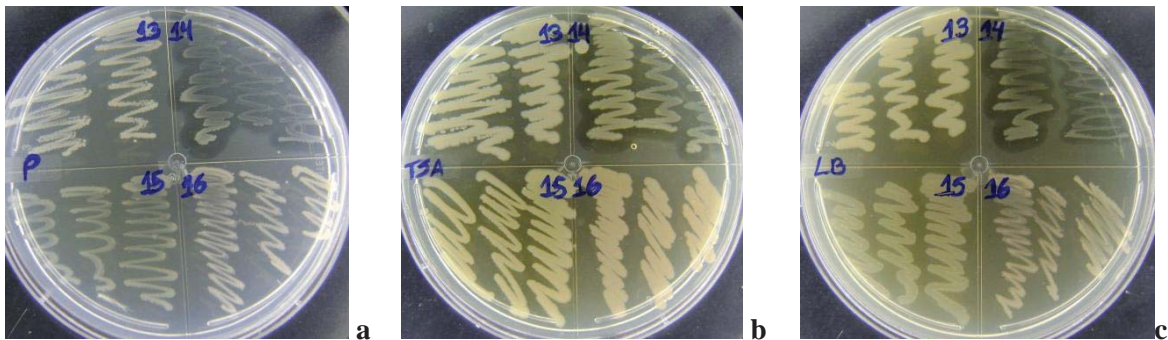


Figura 6: Crecimiento de las bacterias en diferentes medios sólidos, (a) agar peptona, (b) TSA, (c) agar LB. Fuente: Propia.

5.4.- Pruebas de exclusión competitiva

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de esponjas de competir con bacterias patógenas (Fig. 7). De las 19 cepas aisladas, 13, el 68 %, mostraron actividad frente al menos una de las cepas patógenas desafiadas. La

mayor actividad se registró contra *P. aeruginosa* (ver tabla 1) y el 31 % presentó actividad frente a bacterias del género *Vibrio* (ver tablas 3, 4 y 5).

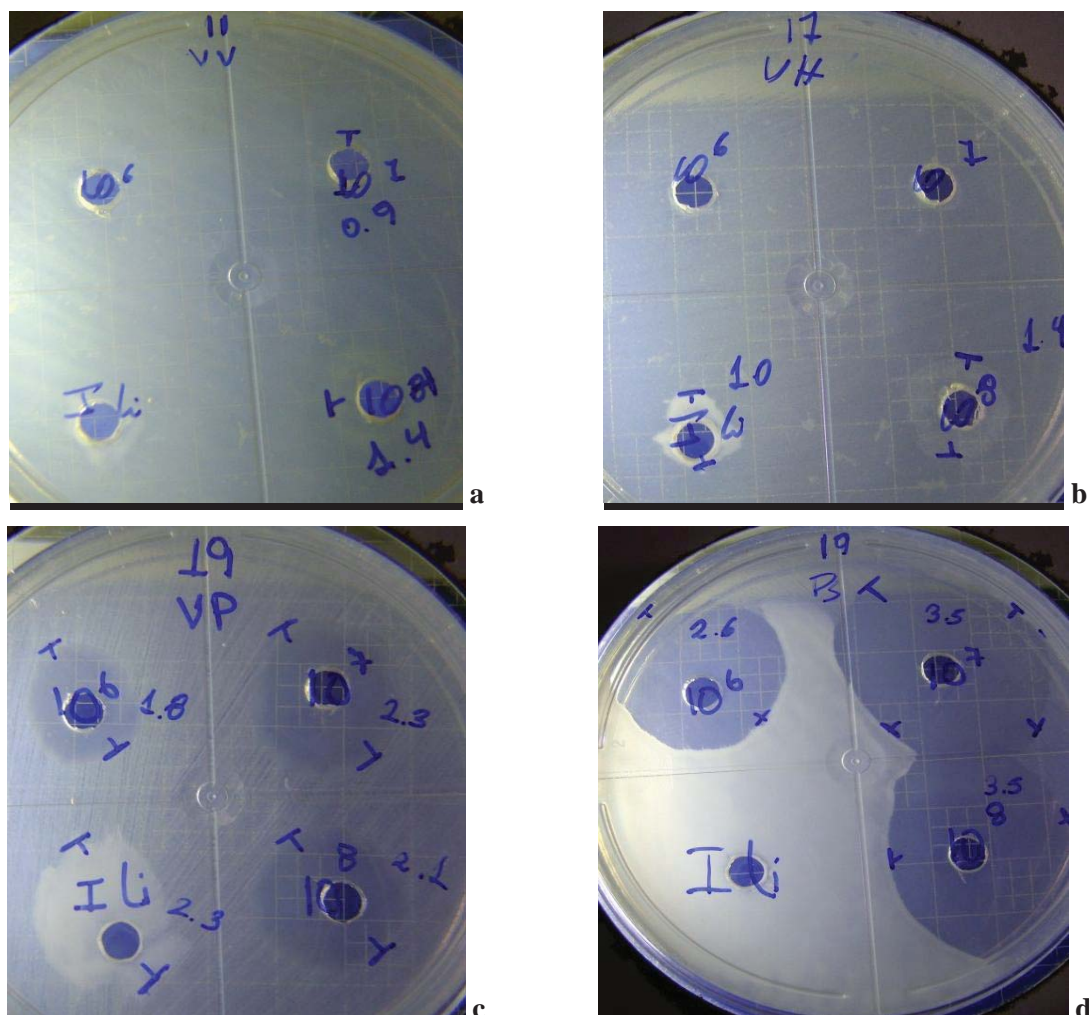


Figura 7: Exclusión competitiva en: (a) *Pseudovibrio* sp. cepa 11 contra *V. vulnificus*; (b) *Pseudovibrio* sp. cepa 17 contra *V. harveyi*; (c) *Vibrio* sp. cepa 19 contra *V. parahaemolyticus*; (d) *Vibrio* sp. cepa 19 contra *P. aeruginosa*. Fuente: Propia

Trece bacterias mostraron actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa* (Tabla 1), para las tres concentraciones bacterianas ensayadas 10^6 , 10^7 y 10^8 bacterias/ml, con un promedio de 10, 12 y 14 mm de diámetro de inhibición, respectivamente. Las bacterias que presentaron mayor actividad fueron *Pseudovibrio* sp. cepa 8, *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18 y *Vibrio* sp. cepa 19.

Tabla 1: Actividad antibacterial de bacterias asociadas a *Aplysina* sp frente a *P. aeruginosa*

Bacteria	Zonas de inhibicion (mm)		
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 2	12	12	12
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 6	12	14	21
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 7	0	0	11
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 8	11	11	12
<i>Pseudoalteromona luteoviolacea</i>	8	10	9
Cepa 10	10	12	12
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11	10	13	16
<i>Bacillus</i> sp.	10	10	12
<i>Vibrio agarivorans</i>	10	10	11
<i>Vibrio</i> sp. cepa 15	9	10	10
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	7	15	17
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	11	14	15
<i>Vibrio</i> sp. cepa 19	20	23	23
ILI	-	39	-

A concentraciones superiores a 10⁷ bacterias /ml, cinco de las bacterias probióticas presuntivas demostraron inhibir el crecimiento de *Aeromonas* sp. La mayor actividad se registró en las bacterias *P. luteoviolacea*, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18 y *Vibrio* sp. cepa 19 (Tabla 2).

Tabla 2: Exclusión competitiva de bacterias aisladas de *Aplysina* sp frente a *Aeromonas* sp.

Bacteria	Zonas de inhibicion (mm)		
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
<i>P. luteoviolacea</i>	0	5	8
Cepa 10	0	0	12
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	0	0	10
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	0	9	11
<i>Vibrio</i> sp. cepa 19	0	10	11
ILI	-	13	-

Seis bacterias aisladas actuaron contra *V. vulnificus*, la mayoría a concentraciones superiores a 10^7 bacterias/ml (Tabla 3). Solo la bacteria cepa 10 actuó a 10^6 bacterias/ml. El promedio de halo de inhibición fue de 2, 6 y 12 mm para las diferentes concentraciones.

Tabla 3: Prueba de inhibición de bacterias aisladas de *Aplysina* frente a *V. vulnificus*

Bacteria	Zonas de inhibicion (mm)		
	10^6	10^7	10^8
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 2	0	0	12
<i>P. luteoviolacea</i>	0	0	7
Cepa 10	13	14	14
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11	0	9	14
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	0	0	13
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	0	10	12
ILI		10	

Seis de las bacterias analizadas presentaron actividad contra *V. parahemolyticus*, en las tres concentraciones probadas (Tabla 4). El promedio de las zonas de inhibición fue de 7 mm para 10^6 , 12 mm para 10^7 y 13 mm para 10^8 . La actividad más alta la presento la bacteria *Vibrio* sp. cepa 19, seguida por *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *Pseudovibrio* sp. cepa 17 sp y *Pseudovibrio* sp. cepa 18 sp.

Tabla 4: Bioactividad de bacterias asociadas a *Aplysina* frente a *V. parahemolyticus*

Bacteria	Zonas de inhibicion (mm)		
	10^6	10^7	10^8
<i>P. luteoviolacea</i>	0	8	8
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11	10	11	14
<i>Vibrio</i> sp. cepa 15	0	13	11
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	10	11	13
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	9	11	14
<i>Vibrio</i> sp. cepa 19	12	15	15
ILI	-	20	-

Contra *V. herveyi* actuaron seis bacterias probióticas presuntivas, a concentraciones superiores a 10^7 bacterias/ml (Tabla 5). En promedio presentaron una zona de inhibición de 6 mm para 10^7 y 11 mm para 10^8 . Las bacterias que tuvieron mayor actividad fueron *Vibrio* sp. cepa 19, *V. agarivorans* y *Pseudovibrio* sp. cepa 11.

Tabla 5: Actividad antibacteriana de las cepas aisladas de *Aplysina* sp. frente a *V. herveyi*

Bacteria	Zonas de inhibicion (mm)		
	10^6	10^7	10^8
<i>P. luteoviolacea</i>	0	0	8
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11	0	8	11
<i>V. agarivorans</i>	0	10	13
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	0	0	12
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	0	0	10
<i>Vibrio</i> sp. cepa 19	0	15	13
ILI	-	11	-

5.5.- Evaluación de la toxicidad de las posibles bacterias probióticas en zoeas de camarón *P. vannamei*

En este bioensayo se evaluó la supervivencia de zoeas de camarón inoculados con las bacterias *Pseudovibrio* sp5, *V. agarivorans*, *Vibrio* sp1 y *Vibrio* sp2, se utilizó un control sin bacterias. Además en la segunda parte del ensayo se evaluó la interacción de las bacterias frente a un agente patógeno *V. harveyi* (Fig. 8).

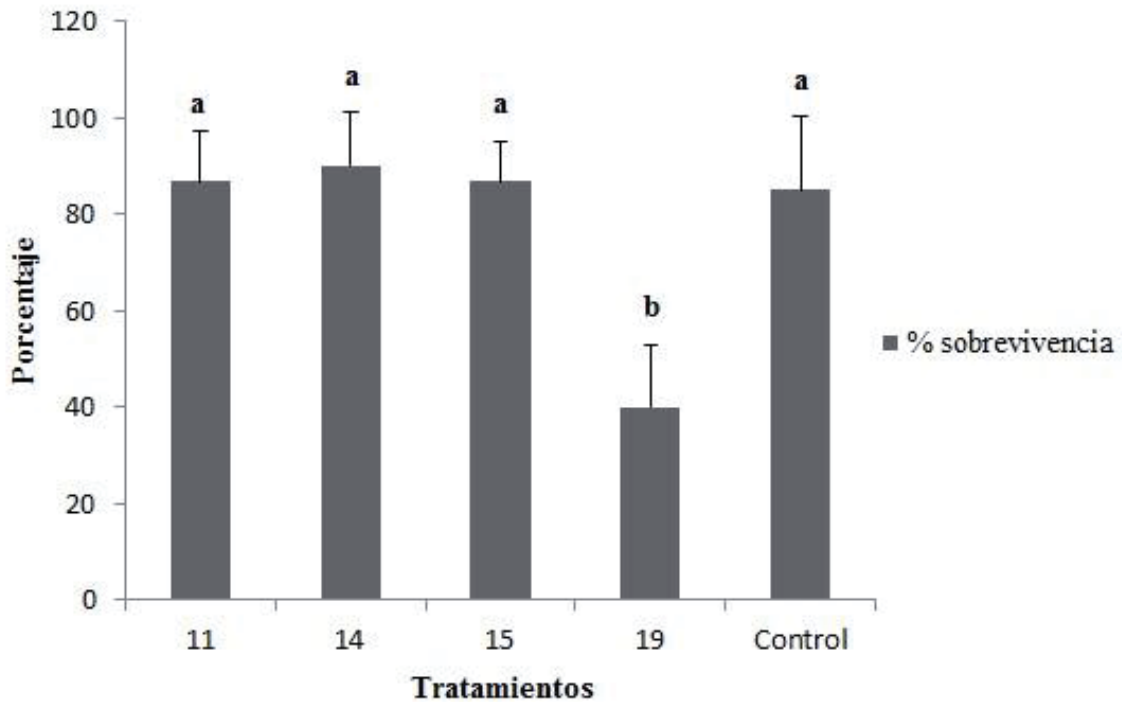


Figura 8: Porcentajes de supervivencia de zoeas sometidas a 24 horas de exposición con cepas bacterianas aisladas de la esponja *Aplysina* sp. 11 (*Pseudovibrio* sp. cepa 11), 14 (*V. agarivorans*), 15 (*Vibrio* sp. cepa 15), 19 (*Vibrio* sp. cepa 19).

El primer día de ensayo, donde los nauplio solo fueron inoculados con la bacteria probiótica presuntiva, murió el 60% de los organismos expuestos a la bacteria *Vibrio* sp. cepa 19. Este tratamiento se descartó para el desafío con *V. harveyi*. En los tratamientos restantes, tres de los seis pozos tratados con la bacteria probiótica presuntiva, se inocularon con la bacteria patógena a una concentración de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml, (Fig. 9). No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre, las zoeas tratadas con bacterias aisladas y las zoeas tratadas y desafiadas con *V. harveyi* ($p > 0.05$). Si hubo diferencias entre las mortalidades del grupo control desafiado y no desafiado con la bacteria patógena ($p < 0.05$).

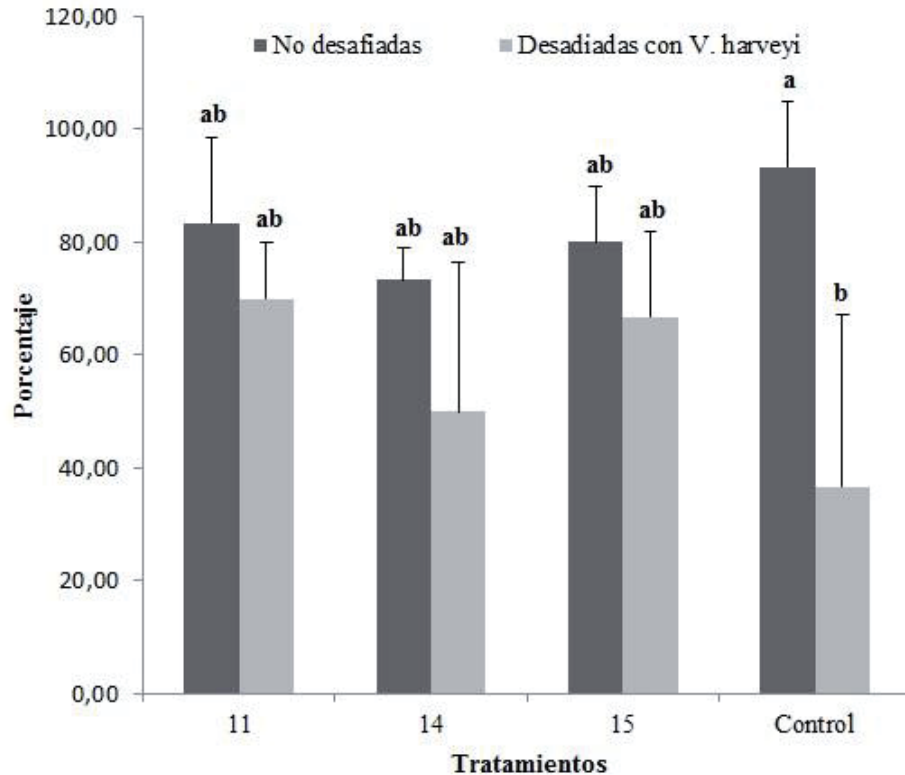


Figura 9: Porcentajes de supervivencia de zoeas tratadas con bacterias aisladas de esponja *Aplysina* sp y desafiadas con *V. harveyi*. 11 (*Pseudovibrio* sp. cepa 11), 14 (*V. agarivorans*), 15 (*Vibrio* sp. cepa 15).

Se realizó un segundo ensayo exponiendo zoeas a las bacterias *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *Vibrio* sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17 y *Pseudovibrio* sp. cepa 18, más un control sin bacterias. La supervivencia de las zoeas después de 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, no mostraron diferencias significativas con respecto al control ($P > 0.05$), los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Supervivencia de zoeas en los 5 tratamientos luego de 24 horas de exposición

Tratamiento	Sobrevivencia
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 11	98.0 ± 3.3
<i>Vibrio</i> sp. cepa 15	98.4 ± 3.6
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 17	97.4 ± 3.0
<i>Pseudovibrio</i> sp. cepa 18	96.9 ± 3.8
Control	96.9 ± 4.1

5.6.- Estudio de interacción *in vivo* entre posibles bacterias probióticas y bacterias luminiscentes, en postlarvas de camarón *P.vannamei*

Las seis bacterias seleccionadas por su resultado en exclusión competitiva se probaron en postlarvas de camarón con altas concentraciones de bacteria luminiscentes (10^7 UFC/ml). No se excluyó del experimento a la bacteria *Vibrio* sp. cepa 19 que mostro altos porcentajes de mortalidad en el desafío con zoeas. Los tratamientos no mostraron diferencias en la supervivencia luego de 48 horas de exposición, si existieron diferencias en los porcentajes de concentraciones bacterianas (Fig. 11).

Una de las características de *V. agarivorans*, es que tiene la capacidad de hidrolizar el agar, actividad que luego del desafío con postlarvas, se intensificó. La diferencia en la intensidad de la actividad se aprecia en la figura 10.

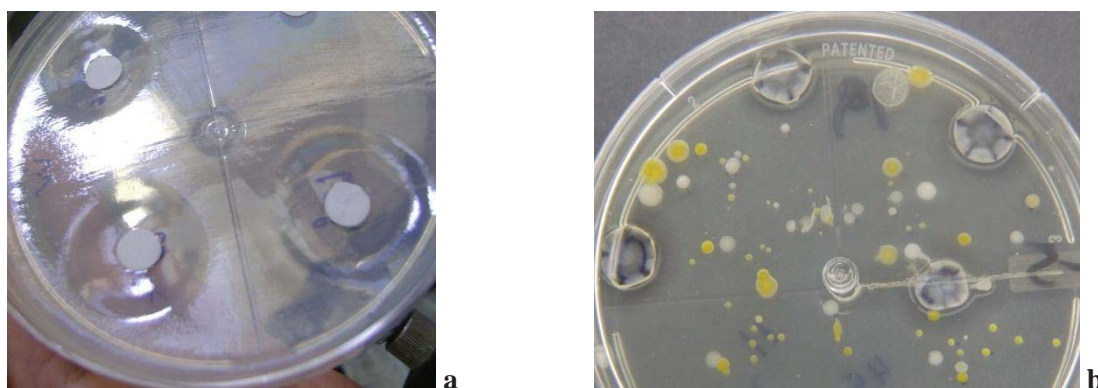


Figura 10: Bacteria *V. agarivorans*. (a) actividad agarolítica normal de la bacteria, (b) actividad agarolítica intensificada después del desafío en postlarvas de camarón.

El análisis histológico de los animales, luego de 48 horas de exposición a bacterias probióticas presuntivas, mostro presencia de deterioro del hepatopáncreas de las postlarvas expuestas a las bacterias *V. agarivorans* y *Vibrio* sp. cepa 19 (Fig. 12). Se estimaron los índices histológicos de las postlarvas (Tabla 7) en base al reporte histológico con igual ponderación de las lesiones. Las principales lesiones asociadas a agentes infecciosos bacterianos se presentaron en el intestino, branquias, hepatopáncreas y músculo.

Tabla 7: Índices histológicos de las postlarvas de camarón inoculadas con bacteria *V. agarivorans* y *Vibrio* sp. cepa 19, y el control sin bacteria.

	Índice histológico
Tratamiento control	0,05 ± 0,06
<i>Pseudovibrio</i> 11	0.08 ± 0.08
<i>Pseudovibrio</i> 15	0.12 ± 0.05
<i>Pseudovibrio</i> 17	0.05 ± 0.07
<i>Pseudovibrio</i> 18	0.0
<i>V. agarivorans</i>	0,19 ± 0,13
<i>Vibrio</i> sp. cepa 19	0,21 ± 0,14

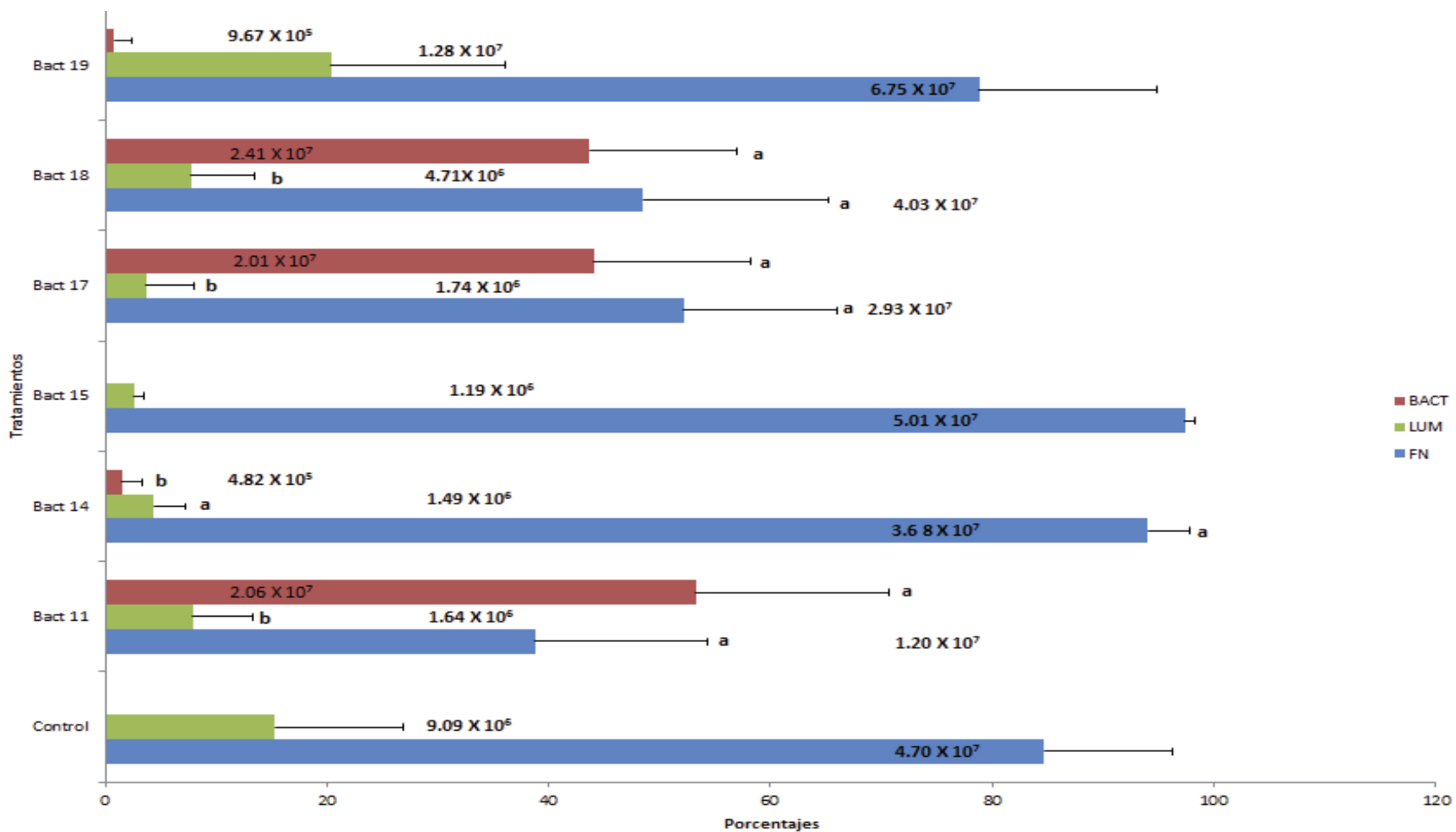


Figura 11: Porcentajes de colonización de *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *V. agarivorans*, *Vibrio* sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18, *Vibrio* sp. cepa 19, de bacterias luminiscentes y de la flora bacteriana natural en postlarvas de camarón *P.vannamei*

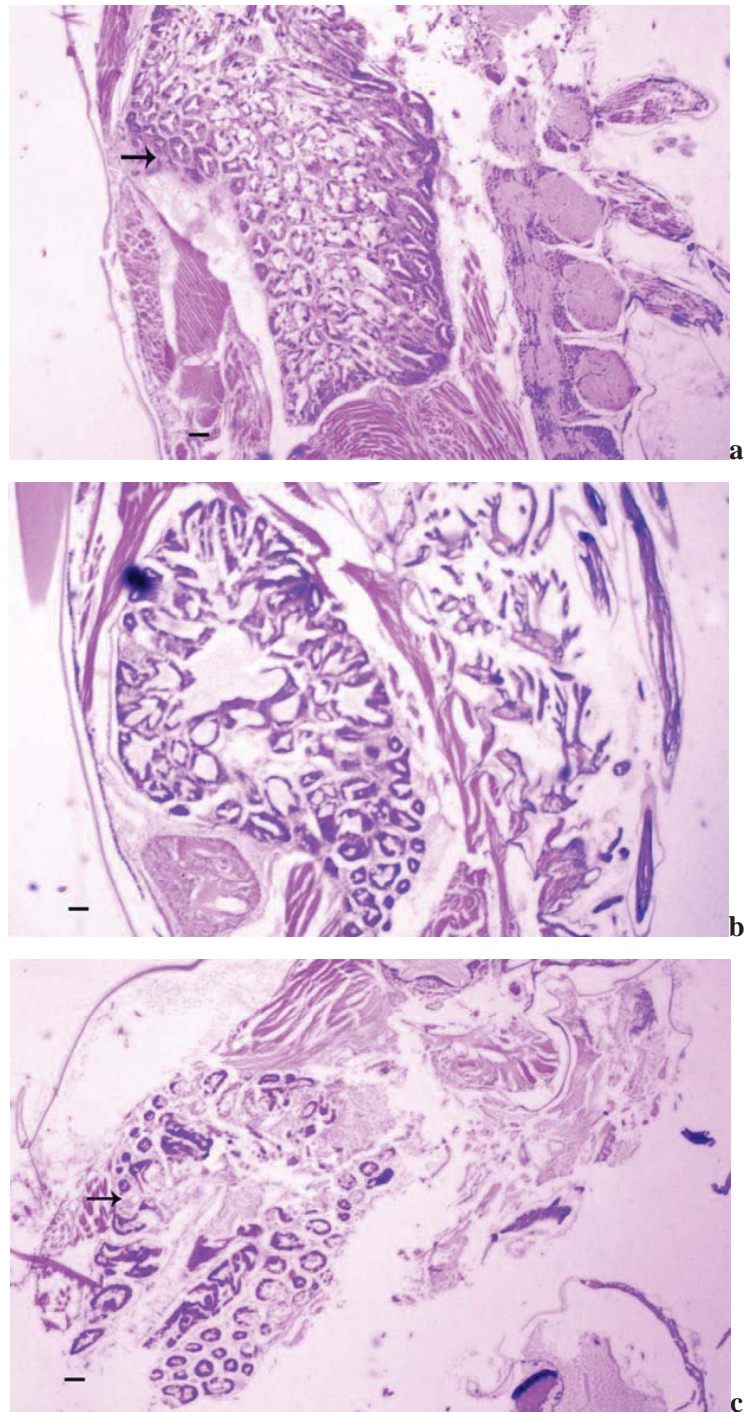


Figura 15: Microfotografías de hepatopáncreas de organismos inoculados con bacterias patógenas presuntivas. (a) postlarvas del grupo control, (b) animales inoculados con bacteria 14sp, (c) camarones inoculados con bacteria 19sp. Nótese el deterioro del epitelio del hepatopáncreas (flecha). Barra = 179 μ m.

6.- Discusión

Los cortes histológicos permitieron identificar las capas en las que se divide el cuerpo de la esponja y sus distintas estructuras. Se pudo apreciar los coanocitos rodeados de células con forma ameboide (Fig 4), que según Mackie & Singla (1983) permiten la transferencia de alimentos. La determinación de bacterias dentro de las estructuras del animal no fue totalmente elucidada (Fig 5), morfológicamente no estaban bien definidas y la tinción de Gram no permitió determinar claramente si eran Gram + o Gram -. Esto pudo deberse a que la preservación se realizó en etanol y no en Davidson o formol. En un inicio el estudio no consideró realizar análisis histológico de las estructuras de la esponja por lo que las muestras se conservaron en etanol para los análisis genéticos, una mejor observación microscópica de las bacterias se realizará en el futuro.

El primer paso en la selección de cepas asociadas a esponjas marinas, fue aislar y caracterizar los microorganismos presentes en los extractos acuosos. Un total de 19 cepas fueron seleccionadas para las pruebas de inhibición *in vitro*. Se ensayó el crecimiento de las bacterias en distintos sustratos, para evitar resultados erróneos en las pruebas de exclusión competitiva por falta de nutrientes en el medio. El medio de cultivo seleccionado fue peptona, en el cual el 90% de las bacterias tuvieron un crecimiento óptimo. Se realizó esta actividad considerando que un alto porcentaje de las bacterias presentes en invertebrados son incultivables (Kamke et al 2010; Cassler *et al.*, 2008). Siendo el objetivo de este estudio encontrar potenciales cepas probióticas, un requisito indispensable es que estas se puedan cultivar. La bacteria *P. luteoviolacea* si bien tiene un óptimo crecimiento en diversos agares y medio líquidos, presento problemas en su conservación, a bajas temperaturas.

Las pruebas *in vitro* realizadas indicaron que una gran proporción de las bacterias asociadas a esponjas marinas aisladas en este estudio tuvieron actividad biológica, lo que coincide con las investigaciones realizadas por distintos autores donde se encontraron diversas bacterias con bioactividad y productoras de compuestos activos; *Pseudovibrio* sp. producen ATD (Penesyan *et al.*, 2011), *Pseudoalteromona tunicata* impide el asentamiento y crecimiento de “fouling” (Kanagasabhapathy *et al.*, 2005). La inhibición entre bacterias es un fenómeno natural, es una habilidad adquirida para competir por el espacio y nutrientes (Mora-

Cristancho *et al.*, 2009), y otorgando a la esponja defensa frente a patógenos, depredadores o epibiontes (Thakur *et al.*, 2003; Sacristan-Soriano *et al.*, 2011; Montalvo & Hill, 2011). El 68% de las bacterias demostraron actividad frente a *P. aeruginosa*. Esta bacteria es un importante patógeno humano responsable de infecciones respiratorias, neumonía, otitis, dermatitis entre otras (Diekema *et al.*, 1999). El 31% presentó actividad frente a bacterias de importancia acuícola como el *V. harveyi* y *V. parahemoliticus*. El primero es el responsable del síndrome de las bolitas (Zherdmant, 1996) que causa altas pérdidas en larvicultura del camarón (Porubcan, 1996). Y el segundo es el agente etiológico del síndrome de mortalidad temprana (EMS por sus siglas en inglés) en camarón Asia y México (Tran *et al.*, 2013).

Debido a la importancia que tienen para la industria camaronera el *V. harveyi* y el *V. parahemoliticus*, para los ensayos *in vivo* se seleccionaron aquellas bacterias aisladas que mostraron actividad inhibitoria frente a ellos, que coincidentemente fueron las cepas que expresaron mayor actividad frente a las 5 cepas patógenas probadas, estas fueron *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *V. agarivorans*, *Vibrio* sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18, *Vibrio* sp. cepa 19. En los ensayos biológicos para determinar la presencia de toxicidad en Zoeas, la mayoría de los tratamientos no causaron mortalidad significativa con respecto al control. La prueba demostró que *Vibrio* sp. cepa 19 tuvo actividad patógena frente a zoeas, matando el 60% de los organismos desafiados.

Los tratamientos inoculados con bacteria probiótica presuntiva, *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *V. agarivorans* y *Vibrio* sp. cepa 15 no mostraron diferencias significativas luego de ser desafiados con *V. Harveyi* (Fig 8), en contraste con el tratamiento control en el que si se observaron diferencias, estos resultados sugieren un efecto protector de las bacterias candidatas a probióticos. Aun cuando el tratamiento inoculado con *V. agarivorans* no mostró diferencias significativas de supervivencia entre zoeas desafiadas y no desafiadas, el promedio de supervivencia estuvo en 50%. Debido al reducido número de réplicas, se observó una amplia dispersión en los datos, estos ensayos deben perfeccionarse y repetirse a fin de corroborar las cualidades probióticas de *Pseudovibrio* sp. cepa 11, *Vibrio* sp. cepa 15, *Pseudovibrio* sp. cepa 17, *Pseudovibrio* sp. cepa 18; y patógenas de *V. agarivorans* y *Vibrio* sp. cepa 19.

En el análisis de interacción entre bacterias candidatas a probióticas y bacterias luminiscentes (Fig 11), se puede ver que los tratamientos inoculados con *Pseudovibrio sp.* cepa 11, *V. agarivorans*, *Vibrio sp.* cepa 15, y *Pseudovibrio sp.* cepa 17 y *Pseudovibrio sp.* cepa 18, bajaron las concentraciones de bacterias luminiscentes. Manifestando la capacidad de desplazar una microflora ya constituida. Si bien las bacterias *V. agarivorans* y *Vibrio sp.* cepa 19 mostraron comportamiento patógeno frente a zoeas; se probaron en postlarvas de camarón poseedores de altas concentraciones de bacterias luminiscentes, para constatar si eran capaces de competir contra una flora bacteriana preexistente y bien establecida. Si bien las mortalidades presentadas en los distintos tratamientos no fueron significativas, el análisis histopatológico de los animales tratados con *V. agarivorans* y *Vibrio sp.* cepa 19 mostraron un deterioro en los órganos digestivos de los animales (Fig 12), los daños más graves se presentaron en branquias, hepatopáncreas y músculo.

Las diversas cualidades presentadas por las bacterias aisladas, tanto antibacterianas como antiepióntes, indican fuertemente el rol que poseen en las estrategias de defensa de las esponjas y en su comportamiento comunitario. Dentro de este punto es curioso el hecho de que la cepa de *V. agarivorans* aumentara la intensidad de su acción agarolítica luego de estar en contacto con postlarvas de camarón. Los resultados obtenidos dan cuenta de la importancia del estudio de las bacterias asociadas a esponjas marinas y el posible uso de sus cualidades para la acuicultura. Los resultados indican que las bacterias *Pseudovibrio sp.* cepa 11, *Vibrio sp.* cepa 15, *Pseudovibrio sp.* cepa 17, *Pseudovibrio sp.* cepa 18 tienen un potencial probiótico debido a que no ocasionan mortalidades y su aplicación aumenta la supervivencia de postlarvas de camarón. Las cepas bacterianas aisladas de *V. agarivorans* y *Vibrio sp.* cepa 19, tienen comportamiento patógeno dañando los órganos digestivos de las postlarvas.

7.- Conclusión

Un total de 13 cepas bacterianas aisladas de *Aplysina* sp. demostraron tener actividad biológica frente a por lo menos un agente patógeno. Dos bacterias aisladas mostraron ser patógenas para zoeas y postlarvas de camarón *P. vannamei* afectando el sistema digestivo de los organismos.

Se aislaron cuatro cepas con potencial probiotico, tres de ellas pertenecientes al género *Pseudovibrio* y una perteneciente al género *Vibrio*. Estos resultados indican el gran potencial de la microflora de las esponjas como fuente de bacterias útiles para la acuicultura y otras actividades.

8.- Recomendaciones

Estandarizar las pruebas de infección bacteriana en diferentes estadios larvarios para futuros desafíos internos y para otorgar servicios, utilizando las bacterias patógenas encontradas en este estudio.

Continuar las pruebas con las cepas bacterianas con potencial probiótico, con ensayos en distintos estadios de camarón.

Evaluar diferentes metodologías de conservación de bacterias, especialmente para *Pseudoalteromonas luteoviolacea*.

9.- Bibliografía

- Águila-Ramírez, R., C. Hernández-Guerrero & B. González-Acosta. 2011. potencial biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Océánides* 26(2): 31-46.
- Alcolado, P. 1999. Comunidades de esponjas de los arrecifes del archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 28, 95-124.
- Balcázar, J. L., Blas, I. D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3), 173-186.
- Bell, T. & D. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World aquaculture society. Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.
- Bergquist, P. 1978. Sponges. University of California Press. 268.
- Bergquist, P. & S. Cook. 2002. Family Aplysinidae Carter, 1875. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, Edited by John N.A. Hooper and Rob W.M. Van Soest.
- Carnevali, O., M. Zamponi, R. Sulpizio, A. Rollo, M. Nardi, C. Orpianesi, S. Silvi, M. Caggiano, A. Polzonetti & A. Cresci. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 2004; 12(4-5) 377- 386.
- Cassler M., C. Peterson, A. Ledger, S. Pomponi, A. Wright, R. Winegar, P. McCsathy & J. Lopez. 2008. Use of Real-Time qPCR to Quantify Members of the Unculturable Heterotrophic Bacterial Community in a Deep Sea Marine Sponge, *Vetulina* sp. *Microbial Ecology* 55: 384–394.

- Chaves-Fonnegra, A., M. López-Victoria, F. Parra-Velandia & S. Zea. 2005. Ecología química de las esponjas excavadoras *Cliona aprica*, *C. caribbaea*, *C. delitrix* y *C. tenuis*. Bol. Invest. Mar. Cost. 34, 43-67.
- De Rosa, S., M. Mitova & G. Tommonaro. 2003. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. Biomolecular Engineering. 20, 311-316.
- Diekema, D., A. Pfaller, R. Jones, G. Doern, P. Winokur, A. Gales & M. Beach. 1999. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. Clinical infectious diseases. 29(3), 595-607.
- Dorsey, D. & W. Robertson. 2013. Recent advances in fish diseases treatment: probiotics as alternative therapy to antibiotics in aquaculture. European journal of ocean and marine. 11, 20-27.
- Ebada, S., W. Lin & P. Proksch. 2010. Bioactive Sesterterpenes and Triterpenes from Marine Sponges: Occurrence and Pharmacological Significance. Marine Drugs. 8, 313-346.
- Ebel, R., M. Brenzinger, A. Kunze, H. Gross & P. Proksch. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. Journal of Chemical Ecology. 23(5), 1451-1462.
- El-Sersy, N., F. Abdel-Razek & S.Taha. 2006. Evaluation of various probiotic bacteria for the survival of *Penaeus japonicus* larvae. Fresenius Environmental Bulletin. 15(12A) 1506-1511.
- Enticknap, J., M. Kelly, O. Peraud & R. Hill. 2006. Characterization of a Culturable Alphaproteobacterial Symbiont Common to Many Marine Sponges and Evidence for Vertical Transmission via Sponge Larvae. Appl. Environ. Microbiol. 72(5):3724

- FAO & WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Fieseler, L., M. Horn, M. Wagner & U. Hentschel. 2004. Discovery of the novel candidate phylum 'Poribacteria' in marine sponges. *Appl Environ Microbiol* 70: 3724–3732.
- França, F., D. Dias, P. Teixeira, A. Marcantônio, M. De Stéfani, A. Antonucci, G. Rocha, M. Ranzani-Paiva & C. Ferreira. 2008. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*. 34(3), 403-412.
- Gatesoupe, F. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquatic Living Resource*. 7(1), 277-282.
- Gatesoupe, F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquacultur*. 180(1) 147-165.
- Gibson, L., J. Woodworth & A. George. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 169(1-2), 111-120.
- Gili, J. & R. Coma. 1998. Benthic suspension feeders: their paramount role in littoral marine food webs. *Trends Ecol Evol* 13:316–321
- Gullian, M. F. Thompson & J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233, 1 –14.
- Hardoim, C., R. Costa, F. Araújo, E. Hajdu, R. Peixoto, U. Lins, A. Rosado & J. van Elsas. 2009. Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Appl. Environ. Microbiol*. 75(10):3331
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker & B. Moore. 2002. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl. Environ. Microbiol*. 68(9):4431

- Hentschel, U., K. Usher & M. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 167–177.
- Irianto, A. & B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. fish dis.* 25, 333-342.
- Kamke, J., M. Taylor & S. Schmitt. 2010. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *The ISME Journal* (2010) 4, 498–508.
- Kanagasabhapathy, M., H. Sasaki, K. Nakajima, K. Nagata & S. Nagata. 2005. Inhibitory Activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes Environ.* 20, 178–185.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunose* (porifera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.* 59(3), 189-200.
- Khan, S., M. Takagi & K. Shin-Ya. 2012. Actinobacteria associated with the marine sponges *Cinachyra* sp., *Petrosia* sp., and *Ulosa* sp. and Their Culturability. *Microbes Environ.* 27 (1), 99–104.
- Kim, D. & B. Austin. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology.* 21(5), 513-524.
- León, J., L. Liza, I. Soto, M. Torres & A. Orosco. 2010. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 27(2), 215-21.
- Levy, S. 1987. Antibiotic use for growth promotion in animals: ecologic and public health consequences. *Journal of Food Protection,* 50.

- Levy, S. B., Marshall, B., Schluederberg, S., Rowse, D., & J. Davis. 1988. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(12), 1801-1806.
- López-Legentil, S., P. Erwin, T. Henkel, T. Loh & J. Pawlik. 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (porifera:Haploselerida). *Scientia marina*. 74 (3), 445-453.
- Mackie, G. & C. Singla. 1983. Studies on hexactinellid sponges. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe, 1873). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365-400.
- Makridis, P., A. Fjellheim, J. Skjermo & O. Vadstein. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International*. 8(5), 367-380.
- Montalvo, N. & R. Hill. 2011. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. *Applied and environmental microbiology*. 77(20), 7207-7216.
- Martínez, P., A. Ibáñez, O. Monroy & H. Ramírez. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*. doi:10.5402/2012/916845
- Mohamed, N., V. Rao, M. Hamann, M. Kelly & R. Hill. 2008. Monitoring Bacterial Diversity of the Marine Sponge *Ircinia strobilina* upon Transfer into Aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(13):4133.
- Mora-Cristancho, J., S. Zea & D. Gil-Agudelo. 2009. Actividad antagonica entre bacterias epibióticas aisladas de esponjas marinas del caribe colombiano y su relación con la macroepibiosis. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 38 (1), 25-38.
- Müller, W., H. Schröder, M. Wiens, S. Perovic-Ottstadt, R. Batel & I. Müller. 2004. Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II—the Benefits Approaches for

- a Sustainable Exploitation of Biodiversity (Secondary Metabolites and Biomaterials from Sponges), *Advance Access Pub.* 1(2): 133–144.
- Nikoskelainen, S., A. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen & E. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 15(5), 443–452.
- Panigrahi, M. & S. Azad. 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: The Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 429-440.
- Penesyán, A., J. Tebben, M. Lee, T. Thomas, S. Kjelleberg, T. Harder & S. Egan. 2011. Identification of the Antibacterial Compound Produced by the Marine Epiphytic Bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and Related Sponge-Associated Bacteria. *Marine Drugs*. 9, 1391-1402.
- Pérez, M. & A. Aranda. 2003. Actividad reproductiva de *Strombus gigas* (Mesogasteropoda: Strombidae) en diferentes hábitats del Arrecife Alacranes, Yucatán. *Rev. Biol. Trop.* 51(4), 119-126.
- Porubcan, R. 1996. Control de *vibrio* y virus en la acuicultura de camarón: últimos desarrollos en el manejo de estanquería y ecología microbiana. Memorias del tercer simposium internacional de nutrición acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Puyana, M., N. Victorovna, A. morales, C. Duque & S. Zea. 2002. Algunos aspectos de ecología química de las esponjas del caribe *Axinyssa ambrosia* y *Aplysina insularis*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 26(101), 565-574.
- Queiroz F & C. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*. 29(1), 67–73.
- Ravichandran, S., K. Kathiresan & H. Balaram. 2007. Anti-malarials from marine sponges. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2 (2): 33-38.

- Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi & Y. Ishida. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*. 15(2) 369-374.
- Sacristan-Soriano, O., B. Banaigs, E. Casamayor & M. Becerro. 2011. Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and environmental microbiology*. 77 (3), 862-870.
- Sakai, M., T. Yoshida, S. Astuta & M. Kobayashi. 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *Journal of Fish Disease*. 18(2), 187-190.
- Sihag, R. & P. Sharma. 2012. Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *J Fish Aquatic Sci*. 7(2), 72-103.
- Schmitt, S., U. Hentschel, S. Zea, T. Dandekar & M. Wolf. 2005. ITS-2 and 18S rRNA Gene Phylogeny of Aplysinidae (Verongida, Demospongiae). *J Mol Evol*. 60, 327–336.
- Sepčić, K., S. Kaufenstein, D. Mebs & T. Turk. 2010. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Marine drugs*. 8, 1550-1566.
- Taylor, M., R. Radax, D. Steger & M. Wagner. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 295–347.
- Thacker, R. & S. Starnes. 2003. Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. *Marine Biology*. 142, 643–648.
- Thakur, N., U. Hentschel, A. Krasko, A. Anil & W. Müller. 2003. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for chemical defense. *Aqua. Microbiol. Ecol*. 31: 77–83.

- Tran, L., L. Nunan, R. Redman, L. Mohney, C. Pantoja, K. Fitzsimmons & D. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org.* 105, 45-55.
- Vega, C., C. Hernández-Guerrero & J. Cruz-Barraza. 2012. Biogeografía de esponjas marinas (phylum porifera); estudios en el pacífico oriental. *CICIMAR Oceánides* 27(1): 35-50.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.
- Vieira, R. & L. Tavares. 2012. Use of probiotics in aquaculture.
- Vine, N., W. Leukes & H. Kaiser. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 145–152.
- Wang, G., Y. Liu, F. Li, H. Gao, Y. Lei & X. Liu. 2010. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology.* 29(3), 378- 387.
- Webster, N., K. Wilson, L. Blackall & R. Hill. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* 67: 434–444.
- Weiss, B., R. Ebel, M. Elbrächter, M. Kirchner & P. Proksch. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24:1–12.
- Weisz, J., N. Lindquist & C. Martens. 2008. Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia* 155: 367–376.
- White, J., J. Patel, A. Ottesen, G. Arce, P. Blackwelder & J. Lopez. 2012. Pyrosequencing of Bacterial Symbionts within *Axinella corrugata* Sponges: Diversity and Seasonal Variability. *PLoS ONE* 7(6): e38204. doi:10.1371/journal.pone.0038204.

- Zherdmant, M.T. 1996. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la interacción in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Zhou, X., Y. Wang & W. Li. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287(3-4), 349-353.
- Zhou, X., Y. Wang, J. Yao & W. Li. 2010. Inhibition ability of probiotic *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Engineering, Science and Technology*. 2(7), 73-80.