

245
03065

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
LABORATORIO DE FARMACOLOGIA MARINA

Proyecto de Especialización, Maestría y Doctorado en
Ciencias del Mar del C. C. H. de la U.A.C.P. y C.



" ESTUDIO DEL SIGNIFICADO ÉCOLOGICO
DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE
LA ESPONJA MARINA APLYSINA
FISTULARIS
(ANTIBIOSIS Y AGLUTINACION) "

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS DEL MAR
(OCEONOGRAFIA QUIMICA)
P R E S E N T A :
ALFONSO MIERES HERMOSILLO

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se aporta evidencia sobre las propiedades de antibiosis y aglutinación de la esponja marina Aplysina fistularis.

Para esto se colectó, por medio de buceo autónomo, la esponja marina Aplysina fistularis en el arrecife "La Blanquilla" del Puerto de Veracruz, Veracruz.

Se realizaron las pruebas de antibiosis respectivas contra los microorganismos Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Pseudomona mendocina, Bacillus linchariformis, Alteromonas commuriae, Streptococcus pyogenes utilizando el método de difusión en disco sobre agar.

Se realizaron pruebas de aglutinación de tres tipos: en placa, en contador Coulter y en micropozas de dilución seriada con los microorganismos P. mendocina y P. putida y con eritrocitos de varias especies.

Las pruebas de antibiosis utilizando extracto metanólico de la esponja resultaron positivas contra todos los microorganismos utilizados y negativas cuando se realizaron con el agua intersticial de la esponja.

Los resultados en las pruebas de aglutinación utilizando los tres métodos fueron positivas tanto para el extracto acuoso como para el agua intersticial.

INTRODUCCION

Se conoce en la actualidad sobre fenómenos del mar a gran escala; esto ha causado que no se haya estudiado como se debe los fenómenos a microescala, que cuando se trata de seres vivos son de especial importancia.

Dentro de estos fenómenos, aquellos que involucran, de alguna manera actividad biológica provocada por sustancias químicas, son interesantes pero de las menos estudiadas. De estas actividades biológicas detectadas en organismos marinos se pueden mencionar:

- antibiosis
- ictiotoxicidad
- deterrencia
- agentes paralizantes
- agentes atrayentes
- agentes hipotensicos e hipertensicos
- agentes anticoagulantes
- agentes antiepiplónticos

Es con este enfoque, el de la ecología química, que se discute la información disponible sobre esponjas y los resultados del presente trabajo.

La ecología química de esponjas es un campo interesante de investigación, si bien es cierto que aún tiene muchos aspectos por aclarar.

En la literatura están citados dos artículos (Bergquist y Bedford 1978 , McCaffrey y Edean 1985) que representan las dos teorías más en boga sobre la función de antimicrobianos en las esponjas marinas. En forma resumida las fun-

funciones ecológicas de estos antimicrobianos serían las siguientes:

- a) función antibiótica
- b) función de aglutinación moderada para mejorar eficiencia de filtración de partículas alimenticias (incluyendo a los microorganismos).

Dada esta polémica sobre la verdadera función ecológica de los metabolitos secundarios en exudados de esponjas, surgió la idea de tratar de realizar un trabajo que aporte evidencias que sirvan para tratar de resolver esta polémica.

Por todo lo anterior se decidió centrar el presente trabajo sobre un aspecto no estudiado, el de la simultaneidad de antibiosis y aglutinación en una esponja marina, por lo que el primer objetivo del mismo es el detectar existencia o ausencia de antibiosis producida por el contacto de las bacterias marinas con el extracto de la esponja.

El segundo es detectar si existe aglutinación moderada de las bacterias marinas expuestas al contacto con el extracto de la esponja.

El tercero, el tratar de conocer la verdadera función de los exudados de esponjas marinas en relación a las bacterias marinas. Este objetivo se pretende alcanzar por medio de la consecución de los objetivos arriba mencionados y su interpretación.

Con la consecución de los objetivos del presente trabajo se espera contribuir a la disminución de las incógnitas en el campo de la función ecológica de los metabolitos secundarios de origen marino que es la meta final de la ecología química marina.

Generalidades

Desde la aparición del artículo de Nigrelli en 1959 sobre la ectonina de la esponja marina Microciona prolifera Verrill, mucho se ha avanzado en el campo del aislamiento, purificación y caracterización estructural de los metabolitos secundarios de esponjas y de otros organismos (Faulkner 1974; Minale 1978; Halstead 1985). Algunos ejemplos de estos metabolitos aparecen en el Anexo.

También se han citado sus actividades farmacológicas tales como antibióticas, antineoplásicas, antivirales etc. (Green 1977; Faulkner 1984 ; Halstead 1985). Algunos de los ejemplos de metabolitos con propiedades farmacológicas asociadas se incluyen en el Anexo .

La razón de la búsqueda de sustancias con actividad farmacológica fue esencialmente de carácter terapéutico.

Se buscaba nuevos tipos de sustancias con propiedades biológicas que pudieran aplicarse en la producción de nuevos medicamentos. Fue tanto el interés, que la empresa farmacéutica Roche fundó en los años sesentas, el Instituto Roche de Investigación de Farmacología Marina en Australia. Tres nuevas empresas están interesadas como son SUNTORY, MITSUBISHI KASEI y SEA PHARM, en la búsqueda de nuevos medicamentos, sobretudo para el tratamiento de nuevas enfermedades del siglo XX como SIDA, hipertensión, enfermedades degenerativas, cáncer entre otras.

Si bien se ha logrado un avance notable en cuanto al aislamiento, purificación y caracterización estructural de estos

metabolitos secundarios marinos (Faulkner 1974; Hinalo 1978; Faulkner 1984; Manes 1984), poco se ha avanzado en el conocimiento de su función ecológica en el medio marino. Es razonable pensar que estos metabolitos secundarios (semioquímicos) cumplan una función, puesto que su biosíntesis implica un gasto metabólico considerable. No se debe perder de vista que el origen de estos compuestos en organismos marinos no está dirigido a satisfacer las necesidades farmacológicas de la especie humana sino más bien a proporcionar ventajas adaptativas de índole ecológica que permitan a los organismos sobrevivir y perpetuar su especie en un ecosistema (Clayton 1970; Raper 1970; Barbier 1979).

Desde el punto de vista de la selección natural y la adaptación, el biosintetizar una sustancia sin aparente utilidad no proporcionaría al organismo una ventaja adaptativa y por lo tanto tendería a ser suprimida en el proceso evolutivo.

El hecho de que existan en el organismo, puede ser una indicación de una función específica. Si se considera la cantidad siempre creciente de citas de actividad biológica en organismos marinos, se llega a la conclusión de que la existencia de ésta no es un hecho aislado, sino más bien, una estrategia biológica importante de ciertos grupos de organismos en su interacción con otros organismos, que le permiten defenderse, competir por el sustrato y el alimento. La presencia y concentración de estos depende de factores como: modo de vida (móvil o sessil), su habitat, tipo de alimentación, depredadores naturales, parásitos, estructuras esqueléticas protectoras.

Afortunadamente con el advenimiento de la Ecología Química como un campo establecido desde 1971 (Whittaker y Feeny 1971) la gran cantidad de metabolitos secundarios citados se ha visto enmarcada dentro de un cuadro ecológicamente funcional (esquema de Whittaker y Feeny), donde cada sustancia se clasifica según su función ecológica específica.

La misma tendencia se ha mantenido en el campo de la Ecología Química Marina (Bakus 1986).

Temas de interés en este campo son el significado de los semioquímicos en : simbiosis, mutualismo, comensalismo, parasitismo, comunicación química, quimiorrecepción, reconocimiento de alimento, bioluminiscencia, control de crecimiento, antiepizotismo, paralización de organismos, defensa química y sucesión (Nigrelli 1959 ; Whittaker y Feeny 1971 ; Sieburth 1978 ; Rinehart 1981 ; Bakus 1986).

En la búsqueda de compuestos bioactivos de origen marino para uso medicinal, los compuestos solubles en agua no han recibido la atención que merecen. Hay considerable evidencia que compuestos macromoleculares juegan un papel importante e incluso mayor al de moléculas pequeñas.

En el medio marino el reconocimiento taxonómico entre especies es importante en las interacciones mutualistas, simbióticas, parasitarias. En este contexto los biopolímeros de alta especificidad desempeñan un papel determinante en el establecimiento de esas interacciones.

Entre ellos las aglutininas marinas son de las más interesantes (Shimizu, Kamiya 1983).

Existen citas de aglutininas en algas marinas : en algas azul-verdosas como Lyngbia majuscula (Boyd 1966) ; en algas cafés , en algas rojas Ptilota plumosa, Agardhiella tenera (Blunden 1975 ; Shlomi 1979) en el alga Cystogonium purpureum (Kamiya 1980) ; dentro del phylum Phaeophyta, varias algas del orden Fucales han sido citadas que muestran actividad contra varios tipos de células.

En el caso de invertebrados hay mayor información sobre aglutininas desde que Noguchi (1903) cita que los fluidos de animales marinos pueden diferenciar entre eritrocitos humanos.

Esto se ha debido a que existe gran interés por seguir la evolución del sistema inmune a lo largo del árbol filogenético. Bajo la idea de que los orígenes del sistema inmune había que buscarlos en organismos inferiores era natural iniciar los estudios en invertebrados.

Así se encontraron aglutininas en el antozooario Alcyonium palmatum , Pteroides spinosum que fueron específicas para humano (Bretting 1973) . En moluscos se han citado aglutininas como en Crassostrea virginica que en su hemolinfa contiene una hemaglutinina no específica (MacDade 1967 , Tripp 1966) . Otros moluscos comestibles también presentaron aglutininas en la hemolinfa como el Saxidomus giganteus que tuvo aglutininas específicas para eritrocitos humanos tipo A (Johnson 1964) , el Mytilus edulis que posee

al menos dos aglutininas que requieren calcio y son inhibidas por el ácido N-acetil-neuraminico (Brown 1968; Hardy 1976).

También en bivalvos tridactinidos se han hallado "tridacninas" que son aglutininas antigalactanas o isolectinas (Baldo 1977). En el caso de la Tridacna maxima se ha detectado la presencia de isolectinas (Baldo; 1977). La fuerte naturaleza "antigalactana" de las tridacninas ha motivado que se especule sobre su posible papel en la simbiosis entre la Tridacna y el alga Gymnodinium microadriaticum (Baldo 1975a).

Youngken (1975) ha concluido que estas almejas adquieren una parte importante de su proteína por digestión del excedente de las algas superficiales que precisamente tienen estructuras galactanas en su superficie (Uhlenbruck 1977). También se sospecha que en otros moluscos, las algas juegan un papel similar y que es muy posible que estas sustancias antigalactanas y otros biopolímeros de carbohidratos específicos jueguen papeles cruciales como determinantes en la asociación de algas simbiotas a hospedero. Otra actividad interesante de las tridacninas es su poder mitogénico contra linfocitos humanos; generalmente las aglutininas que se unen a galactosa son mitogénicas.

Entre los artrópodos, el caso de Limulus polyphemus es el más conocido. Su hemolinfa contiene una aglutinina que es específica hacia el ácido N-acetil-neuraminico y el ácido glucurónico (Valth 1979); también la aglutinación es inhibida por N-acetil-glucosamina, lo que indica que el grupo N-acetil es importante en el receptor. Esta aglutinina está bien caracterizada (Findstad 1972; Kaplan 1977).

La langosta americana Homarus americanus posee a-

glutininas. También se ha observado que las aglutininas de la langosta asisten en la fagocitosis de eritrocitos por hemocitos de la langosta (Hall 1974).

En los equinodermos también se han aislado aglutininas como en la estrella de mar Asterias forbesi (Findstad 1972) y en erizos de mar.

Los protocordados, dada su posición filogenética característica única, han sido objeto de investigación intensiva. En las ascidias Styela barrosparti, Ciona intestinalis, Styela plicata y Halocynthia hilgendorfi se ha detectado actividad aglutinante (Fuke 1972).

En peces existen varias citas de aglutininas como en los géneros Salmo, Salvelinus (Kothbauer 1975), Tandanus (Baldo 1973), Tachysurus (DiConza 1970), Pleuronectes (Fletcher 1969) y Lophosetta (Kamiya 1980). Las secreciones mucosas de algunos peces pueden jugar un papel importante en su defensa contra células extrañas ; pero esto en ocasiones puede resultar contraproducente pues parásitos de los peces pueden aprovechar esta característica y así detectar a su hospedero (O'Rourke 1961). La aglutinina WF-2 de Lophosetta maculata aglutina fuertemente a una levadura marina Metchnikovia reukafii y a una bacteria marina Micropooyolus marinus (Kamiya 1980).

Dentro de esta búsqueda general de aglutininas se llega a las esponjas. Las esponjas de alguna manera han estado ligadas a los estudios de agregación celular desde los experimentos clásicos de Wilson (Wilson 1907). A raíz de éstos, varios estudios sobre este fenómeno de reagregación de células disociadas de

esponja se han realizado (Galstoff 1925 , Humphreys 1960 ,
Humphreys 1967, Margoliash 1965, Muller 1973, Honkart 1973).
Entre las esponjas a las que se les ha estudiado sus aglutininas
se encuentran Axinella polipoides , Geodia cydonium ,
Verongia aucheri , Pseudoceratina orassa , Callispongia fallax ,
Suberites domuncula , Aaptos papillata y Halichondria panicea.

Generalidades sobre Porifera

De manera sucinta se puede decir sobre las esponjas que son metazoarios sedentarios, que se alimentan por filtración a través de poros, de ahí el nombre del phylum, Porifera. Esencialmente constan de tres capas de células, el pinacodermo, mesohilo y el coanodermo, formado por células flageladas, los coanocitos; éstos generan un flujo de agua unidireccional que hace fluir el agua circundante através del sistema de canales de la esponja hacia la cámara de coanocitos, donde en el collar de tentáculos del mismo quedan retenidas las partículas orgánicas más pequeñas, base de la alimentación del organismo. En el mesohilo se encuentran células móviles llamadas amebocitos o arqueocitos, una matriz de colágena y espículas que forman propiamente el esqueleto.

Desde el Cámbrico hay registro fósil de esponjas, aunque propiamente su evolución continua, principia realmente en el Paleozoico. El que persistan actualmente demuestra su éxito con un nivel de organización sencillo.

La clasificación del phylum esencialmente está formada por cuatro grandes clases: Calcarea, Hexactinellida, Sclerospongiae y Demospongiae, siendo la más numerosa e importante esta última abarcando el 95% de las esponjas conocidas. Esponjas de esta clase habitan desde regiones polares hasta tropicales, aguas dulces, salobres y marinas, someras intermareales y profundas.

Todas las esponjas estudiadas son capaces de reproducción sexual. También existen algunas con reproducción asexual de varios tipos como regeneración a partir de fragmentación, formación de protuberancias, gemulas e incluso larvas natatorias que normalmente son el producto final de un proceso sexual. Algunas son ovíparas y otras vivíparas, de espermatogénesis sincrónica o asincrónica (Bergquist 1978).

Descripción del Área de Estudio

La esponja Aplysina fistularis fue colectada en Mayo de 1987 en la zona arrecifal cercana al Puerto de Veracruz, Veracruz.

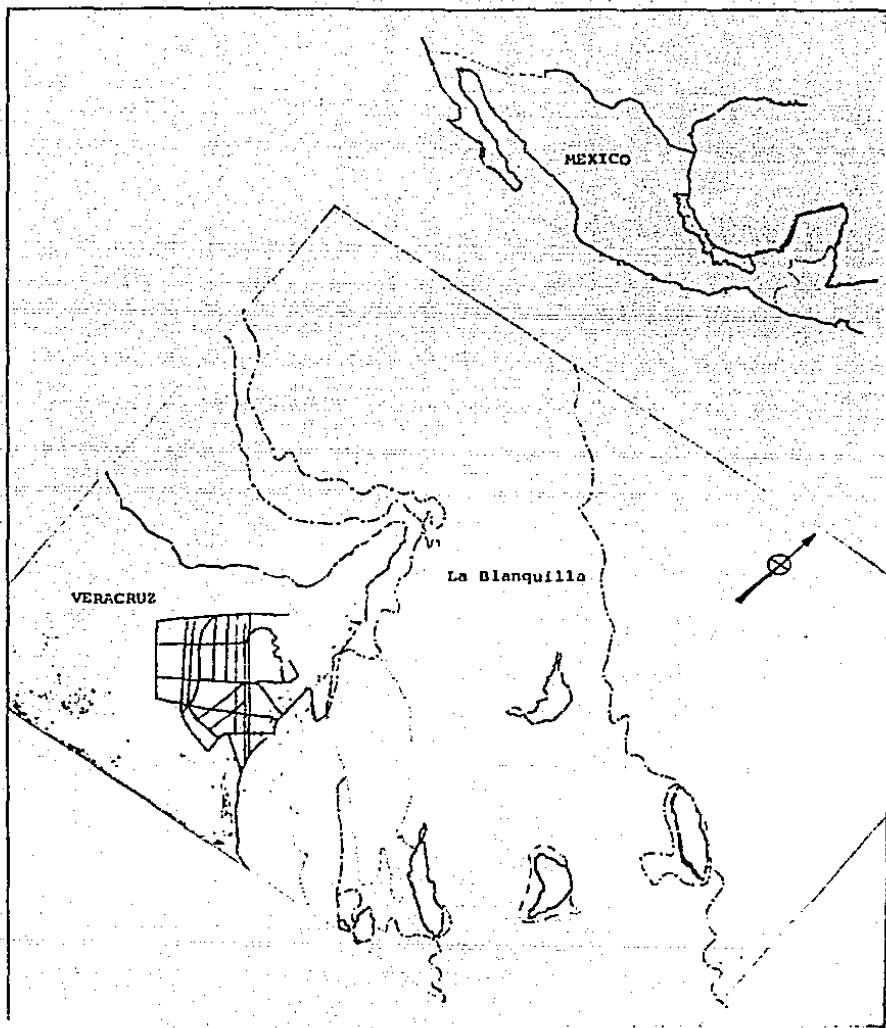
La esponja fue colectada por medio de buceo autónomo en las cercanías del arrecife "La Blanquilla" junto con otras esponjas que pasaron a formar parte de la colección del Laboratorio de Farmacología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

El arrecife "La Blanquilla" se encuentra ubicado en las coordenadas 19° 13' 35" latitud N y 98° 06' 00" longitud W, aproximadamente a 2 millas hacia el NE del Puerto de Veracruz, Veracruz.

La colecta se concentró en la región SW y NW del arrecife.

En la región central del arrecife existe una profundidad promedio de 1.2m con abundancia de madreporas y una predominancia hacia la periferia de Acropora. El pasto marino Thalassia se halla hacia el N del arrecife.

Los datos físico-químicos citados por varios autores (De La Lanza Espino 1965, Suárez Caabro 1965, Arena Fuentes 1966, Díaz Garcés 1966, Flores Coto 1967, Green Macías 1968) arrojaron las profundidades más comunes que van de 0-30m, temperaturas de 24-29 en grados celcius, salinidades de 4.2-4.9 en partes por mil con datos de transparencia con disco Secchi de 6-24.



M E T O D O L O G I A

Estategia

La manera de abordar el tema de investigación es por medio del planteamiento de la siguiente hipótesis de trabajo, la cual incluye dos supuestos a saber:

- a) los compuestos contenidos en el extracto de la esponja tienen una función antibiótica contra bacterias marinas
- b) los compuestos contenidos en el extracto de la esponja tienen una función de aglutinación de bacterias marinas

La estrategia de la investigación es la siguiente:

- i) detectar la antibiosis del extracto contra bacterias marinas sugerida por la hipótesis a) que para ser aceptada, deberá ser positiva
- ii) detectar si existe aglutinación moderada de bacterias marinas que han estado en contacto con el extracto de la esponja, sugerida por la hipótesis b) que para ser aceptada, deberá ser positiva

Identificación de la esponja

El espécimen trabajado resultó ser la esponja marina Apiysina fistularis. Se escogió de entre 30 especies de esponjas

este espécimen porque en las pruebas de antibiosis realizadas inmediatamente después de su colecta en el campo, mostró pruebas positivas de antibiosis lo cual era importante para la realización de este trabajo.

La identificación se basó en sus características morfológicas así como también en la estructura de su red de esponjina. La presencia de antibiosis en esta esponja ayudó en su identificación; la preservación de la esponja se realizó por medio de congelamiento en hielo seco, con el fin de preservar lo mejor posible sus propiedades biológicas.

Extracción Acuosa

El método para preparar el extracto acuoso de la esponja se describe a continuación:

- corte de la esponja en trozos de 1 cm.
- remover piedrecillas y epibiontes
- suspender los trozos de esponja en solución de agua de mar artificial sin calcio ni magnesio, con EDTA y 2-mercaptoetanol en proporción 1:3(peso/volumen). Pasar 70 grs. y suspender en 210ml .
- homogeneizar la suspensión durante 1 min. en frío (0 grados celcius).
- filtrar la suspensión homogeneizada a través de papel filtro
- agitar el filtrado durante 1:30 horas en frío (0 grados celcius)
- centrifugar a 20 000 g (16 000 rpm) en frío (0-4 grados celcius)

-separar el sedimento y rescatar el sobrenadante

El sobrenadante fue el extracto acuoso de la esponja y tuvo un color rojo vino. Este extracto se mantuvo en refrigeración durante todo el periodo de pruebas que fue dos meses sin perder sus propiedades.

La solución de agua de mar artificial sin calcio ni magnesio, con EDTA y 2-mercaptoetanol se preparó de la manera siguiente:

- 7mM de sulfato de sodio
- 0.2 mM bicarbonato de sodio
- 20 mM de Tris-HCl
- 10mM de cloruro de potasio
- 540 mM de cloruro de sodio
- 20 mM de EDTA
- 10 mM de 2-mercaptoetanol

(Mueller 1978, Mueller 1981)

Detección de Antibiosis

El método de detección de antibiosis escogido para este estudio fue el método de difusión en disco de agar por no requerir de grandes cantidades de material antibiótico, ser de costo reducido y la detección de antibiosis es cualitativa o cuantitativa si se quiere.

El método se basa en la difusión que experimenta una sustancia o extracto impregnado en un disco de papel filtro sobre la superficie del agar en una caja de Petri que previamente ha sido inoculada con el microorganismo contra el que se quiere probar la sustancia antibiótica; al poner a incubar este medio, el microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos con actividad antimicrobiana; esto se nota como un halo de inhibición alrededor del disco indicando ésto una prueba positiva de antibiosis. Este método (Cooper, 1963) es el que se ha utilizado con éxito en el Laboratorio de Farmacología Marina para estudios de antibiosis en esponjas marinas.

Se preparó un extracto metanólico de la esponja Aplysina fistularis a partir de 30 gramos de esponja húmeda, a la cual previamente se le removieron los organismos asociados, adicionando 30 ml. de metanol y homogeneizando la esponja. El extracto se filtró y posteriormente se centrifugó a 3000rpm.

Se concentraron 12 sensidiscos, con 10 gotas del extracto

cada uno.

Se prepararon cajas de Petri con medio Zobell (marino agar, medio 2216E) para la prueba de antibiosis con Pseudomona mendocina, Alteromonas cammuriae, Bacillus linchariformis, Bacillus subtilis.

Se prepararon cajas de Petri con medio de agar nutritivo para la prueba con Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes.

Se inoculó cada caja de Petri con su respectivo microorganismo por medio de la adición de 3 gotas del caldo bacteriano correspondiente, el cual se esparció asepticamente con una varilla de vidrio. Inmediatamente después se colocaron 3 sensibilizadores por caja, 2 con extracto y 1 sin el extracto y usado como testigo. Se mantuvieron en refrigeración durante 1 hora para que los compuestos antibióticos pudieran difundir. Posteriormente se incubaron a 37 grados centígrados por 24 horas.

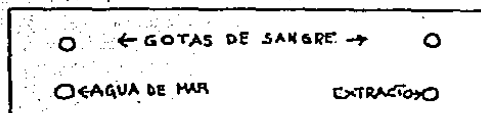
Las lecturas de los halos de inhibición se realizaron a las 24 horas.

Detección de Aglutinación

a) por hemaglutinación en placa (método Moss-Lee-Vincent),
(Iovine 1979)

Esta prueba esencialmente es de carácter cualitativo y sirve para comprobar si hay o no hemaglutinación por lo que los resultados son positivos o negativos.

En un portaobjetos limpio y desengrasado se colocan dos gotas de sangre, una a cada extremo del portaobjetos y se coloca una gota de solución de agua de mar artificial sin calcio y sin magnesio junto a una gota de sangre y una gota del extracto de la esponja al lado de la otra gota de sangre restante. Con una varilla o palillo de plástico se mezcla la gota de sangre con la gota adjunta hasta obtener un diámetro de aproximadamente 15 mm.



aglutinación (-)
control

aglutinación (+)

Se toma el portaobjetos y se mueve sobre sus dos ejes planos para favorecer la mezcla. Se lee el resultado. La lectura se realizó aproximadamente a los 20 segundos y no debe leerse demasiado tarde porque la desecación puede ocasionar una falsa lectura. La lectura se realizó a simple vista y con la ayuda de un microscopio.

b) con micro-pozas de dilución seriada

Se preparó una solución de eritrocitos humanos al 2% de la siguiente manera:

- i) Se obtuvo sangre fresca de sujetos sanos y se le adicionó EDTA para evitar la coagulación (relación de 1:5 en vol/vol)
 - ii) Se centrifugó y se eliminó el suero sobrenadante y los leucocitos
 - iii) Se lavó los eritrocitos con solución PBS (buffer salino de fosfatos) y se volvió a centrifugar. Esta operación se realizó dos veces más
- Se colocaron en las primeras pozas, las (A), de cada una de las hileras horizontales, 50 microlitros de extracto a probar. Se probaron el extracto acuoso de la esponja y el agua intersticial. Se hicieron las pruebas por triplicado
 - Se agregaron 25 microlitros de solución PBS a cada una de las pozas de las hileras horizontales restantes
 - Se tomaron 25 microlitros de la poza (A) y se transfirieron a la poza siguiente, lográndose así una concentración de extracto exactamente diluida a la mitad
 - Se tomaron 25 microlitros del segundo pozo (B) y se transfirieron al tercer pozo (C) lográndose así otra disminución de la concentración a la mitad de la anterior
 - Se siguió así sucesivamente hasta el décimo pozo
 - Se colocaron 25 microlitros de la suspensión de eritrocitos anteriormente preparada en cada una de las pozas de la placa de

dilución seriada

Se colocaron en las pozos 11 y 12 los controles + y - que se prepararon de la siguiente manera:

pozo 11

pozo 12

25 microlitros de PBS

50 microlitros de PBS

25 microlitros de extracto

25 microlitros de eritrocitos 25 microlitros de eritrocitos

Inhibición de Aglutinación

Se prepararon soluciones acuosas 100 mM de los siguientes azúcares:

lactosa

galactosa

alfa-glucosa

beta-glucosa

ácido glucurónico

manosa

fucosa

N-acetil-galactosamina

alfa-metil-manósido

D-glucosamina

N-acetil-D-glucosamina

ácido D-galacturónico

Los pozos se llenaron de la siguiente manera:

- Se hicieron diluciones sucesivas de cada una de las soluciones 100 mM de los azúcares, de tal manera que en cada pozo hay 25 microlitros de solución de azúcar diluida.
- Se agregó 25 microlitros de solución de extracto diluida 1:10 para facilitar la aparición de la inhibición de la aglutinación, a cada uno de los pozos.
- Se agregaron 25 microlitros de la suspensión de eritrocitos al 2 % . Se llenaron los pozos 11 y 12 de la misma manera que en la prueba anterior.

c) por Contador Coulter

El aparato contador Coulter es muy usado en microbiología principalmente para el conteo de células y es una técnica muy en boga actualmente (Kubitzchek 1969; Hobson 1970).

En principio el aparato, mide el cambio en la diferencia de potencial (o de la intensidad de corriente según el modelo) entre electrodos sumergidos en la suspensión a cuantificar; cuando una célula pasa entre los dos electrodos, que están situados a corta distancia uno del otro, formando una abertura (usualmente de 30 micras, rango de los microorganismos) se aumenta la resistividad del espacio del espacio entre los dos electrodos, lo cual se traduce en un aumento de voltaje que se registra en el aparato. Esto ocurre cada vez que una célula pasa entre los electrodos. Se hacen pasar todas las células a contar por la abertura y de esta manera queda registrado en el aparato el número de veces que esto ocurre. Además tiene la capacidad de discernir entre células o partículas de un tamaño y otro. Esto es posible porque la magnitud del cambio de voltaje es directamente proporcional al tamaño o volumen de la célula. El aparato, hace en resumidas cuentas, un conteo para cada tamaño de célula.

Esta capacidad es la que interesa para el estudio que se pretende por la posibilidad de detectar si ha habido una aglutinación de bacterias debida al extracto de esponjas, que se notaría como una disminución en el límite inferior de la gráfica de número de células contra tamaño celular (Kubitzchek 1969).

Se cultivaron los microorganismos Pseudomonas mendocina y

Pseudomonas putida separadamente en caldo marino y posteriormente se diluyeron en agua de mar artificial hasta tener una densidad poblacional de 300-600 millones de células por ml. Esta concentración se determinó por interpolación en la escala de Macfarland.

Se colocó separadamente en tres matraces Erlenmeyer la suspensión bacteriana de Pseudomona mendocina (250 mL). A un matraz se le adicionó una pequeña cantidad de extracto 2.5 mL. (1%) del extracto acuoso de la esponja; a otro matraz se le agregó 2.5 mL. del agua intersticial; y al tercero solo se le agregó 2.5 mL. de agua de mar artificial que sirvió como control o de referencia. Lo mismo se realizó con la otra cepa bacteriana Pseudomona putida.

A cada matraz se le determinaron conteos bacterianos en intervalos de 10 en 10 del dial seleccionador de tamaño del contador Coulter. Las lecturas por intervalo fueron 10. Esto se realizó transfiriendo un determinado volumen de la suspensión bacteriana correspondiente al volumen de un recipiente especial para el conteo.

Mientras se hacía el conteo de una determinada suspensión, las otras permanecían en refrigeración, esto para minimizar el crecimiento bacteriano antes del conteo.

Los parámetros de los diales del contador Coulter durante las determinaciones fueron los siguientes: Ganancia 5, Amperaje 1, Apertura 1.

RESULTADOS

Pruebas de Antibiosis

Los resultados positivos de antibiosis en el extracto metabólico y la ausencia de antibiosis en el agua intersticial indican que la localización de los metabolitos responsables están en el tejido de la esponja y que no son secretados al medio.

El espectro de acción de la antibiosis fue tanto para Gram (-) como Gram (+) de las bacterias probadas.

Es de bastante significado ecológico el que haya habido pruebas positivas contra el género Pseudomona que es un género común en el medio marino y que además es responsable de infecciones en peces. Las implicaciones ecológicas que estos resultados tienen se discuten más ampliamente en la sección siguiente. A continuación se muestran los resultados obtenidos en la tabla siguiente:

Tabla de Diámetros del Halo de Inhibición
(método de Difusión en Placa de Agar)

	Extracto metabólico	Agua intersticial
S. aureus	4.4,4.4 prom. 4.4	-
S. pyogenes		-
P. mendocina	1.3,1.2 prom. 1.25	-
A. commuris	1.4,1.4 prom. 1.4	-
B. subtilis	2.5,2.0 prom. 2.25	-
B. linchariformis	2.3,2.0 prom. 2.15	-

Datos del diámetro del halo de inhibición en cm (sensidivo 0.6cm)

Pruebas de Aglutinación

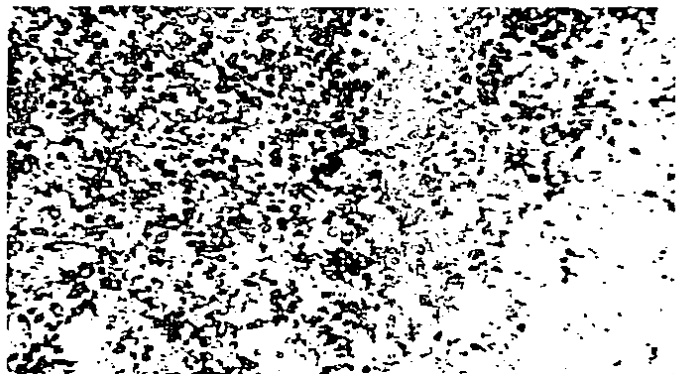
a) por placa (portaobjetos)

Se probó el poder hemaglutinante tanto del extracto acuoso de la esponja así como el del agua intersticial, contra varios tipos de eritrocitos. Los resultados de tales pruebas aparecen en la tabla siguiente:

Tabla de Resultados de Pruebas de Hemaglutinación

Tipo de eritrocito	Extracto acuoso		Agua intersticial	
	Resultado	Título	Resultado	Título
humano, A	+	N.D.	+	N.D.
humano, B	+	N.D.	+	N.D.
humano, O	+	N.D.	+	N.D.
canino	+	16	+	8
bovino	-		-	
felino	+	2	+	16
gamo	+	8	+	16
coyote	+	4	+	8
ratón	+	4	+	4
rata	+	4	+	4
hamster	+	4	+	4
conejo	+	8	+	8
equino	+	8	+	8
gallina	+	4	+	N.D.

N.D. = no determinado.



Eritrocitos sin Aglutinar



Eritrocitos Aglutinados

b) en micropozas de dilución seriada

Los resultados positivos de aglutinación tanto de eritrocitos de varias especies como de las bacterias del género Pseudomona son significativos. Por un lado muestran que la capacidad de aglutinación de las aglutininas de la esponja es de amplio espectro, lo cual sería de esperarse si una de las funciones de las aglutininas en la esponja es aglutinar células que sirvan de alimento.

También muestra que hay cierta selectividad que se detecta por el título diferente que se encontró, lo cual es importante pues abre la posibilidad de la simbiosis entre células ajenas a la esponja y ésta, mediada por aglutininas; pero a su vez trae aparejada consigo las bases del inicio de un parasitismo vía el mismo mecanismo. Además si se compara los resultados de antibiosis y aglutinación se infiere que existe una separación de estas dos actividades en al menos dos entidades químicas distintas, localizándose los compuestos antibióticos exclusivamente en el tejido de la esponja. Estos resultados se discuten más ampliamente en la siguiente sección.

Este estudio con los eritrocitos humanos es más detallado, pues el método de micropozas de dilución seriada es un método más preciso, reproducible y cuantitativo que el método del portaobjetos.

Tabla de Resultados de Hemaglutinación

Dilución	TIPO A1	TIPO A2	TIPO B	TIPO O
1/2	+	+	+	+
1/4	+	+	+	+
1/8	+	+	+	+
1/16	+	+	+	+
1/32	-	-	-	+
Título	16	16	16	32
UHA/ml	640	640	640	1280
Actividad esp.	7272	7272	7272	14544

Nota: se utilizó en la primera poza de la serie de dilución extracto de la esponja diluida 1:10.

Cálculos

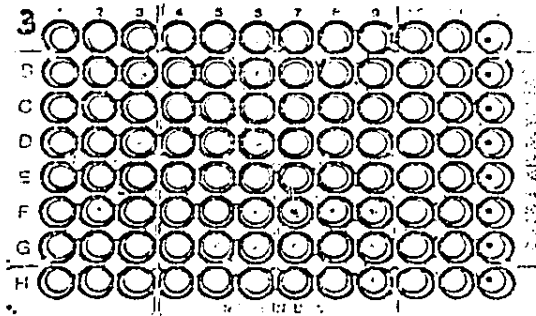
Título = Inverso de la mínima dilución que causa hemaglutinación

UHA = Unidad de Hemaglutinación

UHA/ml = Título x 40

Actividad específica = UHA/ml/miligramo de proteína del extracto/ml de extracto.

Nota: se realizaron pruebas extras de hemaglutinación sin extracto y en su lugar se utilizó solución salina con calcio y magnesio 2 mM, esto con el objeto de eliminar la posibilidad de que la hemaglutinación fuera debida a la presencia de estos dos cationes. Los resultados de tales pruebas eliminaron dicha posibilidad.



Pozas de microtitulacion seriala

Tabla de Conteo Bacteriano por Umbral
 Microorganismo prueba: *S. mendocina*
 conteo promedio

umbral	control	extracto acuoso	agua intersticial
10-10	14813	2008	329
20-20	3352	431	426
30-40	2837	896	316
40-50	98	89	145
50-60	257	557	249
60-70	132	16	78
70-80	51	470	17
80-90	53	929	50
90-100	67	-	2

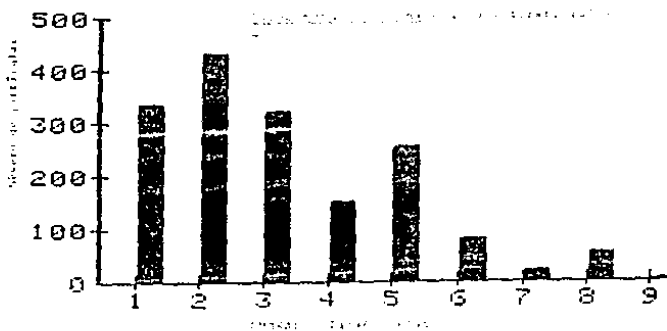
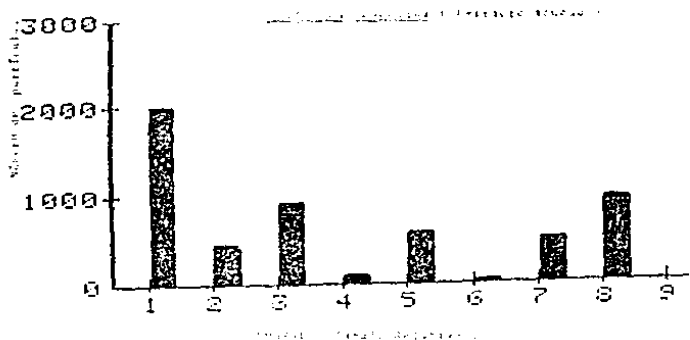
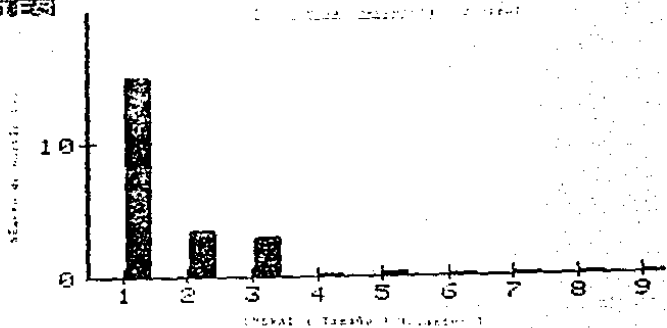
Microorganismo prueba: *P. putida*
 conteo promedio

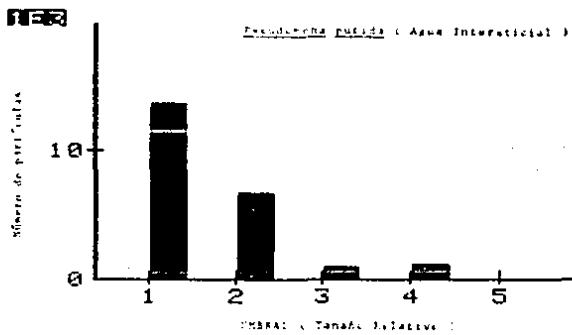
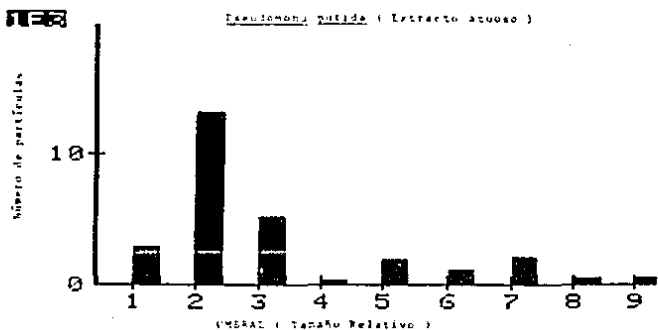
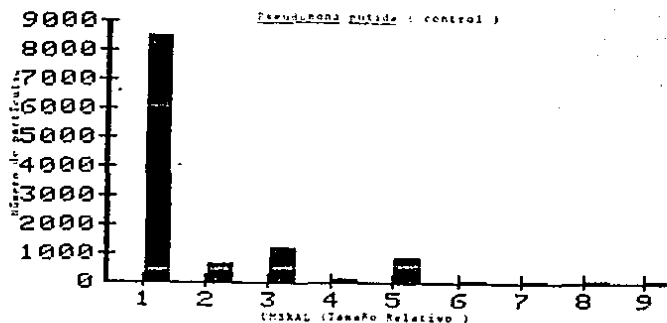
umbral	control	extracto acuoso	agua intersticial
10-20	8510	2734	13745
20-30	582	13213	6620
30-40	1215	5014	703
40-50	24	161	1007
50-60	816	1806	-
60-70	5	968	-
70-80	7	1980	-
80-90	56	416	-
90-100	2	341	-

Nota: los conteos para cada microorganismo se realizaron en un día, siendo el orden del conteo el siguiente: control, extracto

acuoso, agua intersticial. Los promedios fueron obtenidos de 10 réplicas para cada rango de umbral en cada experimento.

1983





D I S C U S I O N

Los resultados positivos de antibiosis y aglutinación sugieren la coexistencia entre estas dos propiedades en la esponja Aplysina fistularis. Lo más importante de estos resultados, más que ellos mismos, es la serie de preguntas que plantea el poseer estas dos propiedades. Preguntas tales como :

- ¿qué papel juegan en los mecanismos de defensa del organismo?
- ¿cuál es la importancia en cuanto a la alimentación del mismo?
- ¿tienen alguna influencia en las relaciones de simbiosis con otros organismos?
- ¿qué función desempeñan los factores de aglutinación en la morfogénesis, diferenciación celular y en la conservación de la identidad de la esponja?
- ¿promueven el crecimiento del organismo?
- ¿sitven de transporte para ciertas moléculas ,tal vez carbohidratos?

son algunas de las preguntas que pueden hacerse.

Uno de los más claros significados de las sustancias con propiedades de antibiosis, en su más amplia acepción, es en mecanismos de defensa.

Siendo los peces uno de los principales depredadores en sistemas arrecifales, no debería sorprender la presencia de compuestos ictiotóxicos en esponjas.

Esta situación pudiera quedar mejor establecida si se toma en cuenta un concepto de ecología química en sistemas terrestres, particularmente usado en la relación de herbivoría en plantas. Este concepto es el de "aparencia" (Feeny 1975). La aparencia queda definida como la "vulnerabilidad de un organismo a ser descubierto por sus enemigos". La aparencia de un organismo en un ecosistema dado, es una función compleja de muchas variables como:

- naturaleza de las especies vecinas
 - densidad de poblaciones
 - tamaño y forma del organismo
 - adaptaciones para búsqueda del hospedero por parte del depredador o parásito
- por mencionar solo algunas.

La naturaleza sedentaria y sésil, los colores vivos así como el crecimiento vertical de algunas de las esponjas, quedando más descubiertas al proyectarse en la masa de agua, las hacen más conspicuas, es decir más "aparentes" y por lo tanto más susceptibles a ser detectadas por depredadores; esto ejerce una fuerte presión de selección hacia la evolución de variedades productoras de compuestos defensivos. Es notorio que de dos especies de esponjas colectadas en Puerto Escondido, Oaxaca (Aplysina sp. y Niphates sp.) una, la Aplysina de crecimiento vertical y muy conspicua presentó antibiosis

en tanto que la Niphates de crecimiento en forma incrustante, semicubierta por sedimento y poco conspicua no presentó antibiosis (Hieres, observación personal), lo cual apoya la aseveración anterior.

Hechos como el que las esponjas que no poseen aleloquímicos presentan cuerpos más duros o secretan mucus abundantemente, esponjas no tóxicas que se encuentran poco expuestas en los trópicos pero más expuestas en regiones más templadas (Green 1977, Bakus 1981) apoyan lo arriba mencionado.

Existen otros hechos como la continua producción de toxinas y el aumento de 10 a 100 veces más antibiótico en una lesión producida artificialmente en A. fistularis, que vuelven a reafirmar esto.

En A. fistularis se ha citado la presencia de dos metabolitos secundarios antimicrobianos en aguas superficiales y su desaparición en la misma especie en profundidades de 5-15 m. (Thompson et al 1983, Thompson 1985). ¿Acaso refleja esto una diferencia en los niveles de infección potencial y/o depredación o más bien una respuesta fisiológica a la profundidad?. Algunas esponjas cripticas son tóxicas para los peces (Green 1977, Bakus 1981). ¿Significa esto una característica ancestral no deseada del genoma? o ¿sugiere que la esponja es criptica en algunas regiones y expuestas en otras o es algún subproducto metabólico accidental?

Un aspecto muy importante en la ecología de las esponjas y otros organismos bentónicos son las interacciones con otros competidores.

La competencia por el sustrato en un sistema arrecifal es incluso mayor que por alimento por lo que la permanencia en este se ve siempre amenazada.

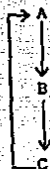
En comunidades limitadas por el espacio-sustrato como lo son la mayoría de las comunidades bánticas marinas someras existen "jerarquías" en los organismos en cuanto a sus capacidades competitivas. Esto se ha observado en corales y balanos (Dayton 1971; Lang, 1973, Porter 1974). Esta dominancia competitiva está bien establecida en comunidades epibiónticas marinas (Sutherland y Karlson 1977, Quinn 1982). En una comunidad estrictamente jerárquica, donde la especie "A" desplaza a la especie "B" y "B" desplaza a la especie "C" y en donde no hay marcados eventos perturbadores y/o depredadores, como lo puede ser el habitat arrecifal criptico, el resultado final sería un monopolio del sustrato por parte de la especie "A" y una baja diversidad. El hecho de encontrar diversidades mayores bajo las mismas condiciones anteriores indica de alguna manera que hay algún mecanismo que no permite que una especie de jerarquía menor o algo inferior sea desplazada por una especie de jerarquía mayor. Es conocido el caso de la esponja Siphonodyetion coralliphagum que crece en medio de coral vivo y en cuya base se nota una zona de zooides muertos. Esta es provocada por el mucus que se acumula precisamente en la base y que se conoce posee una sustancia que mata a los pólipos, la siphonodiotidina (Sullivan 1983).

La existencia y posesión de aleloquímicos por parte de las esponjas ciertamente provee tal mecanismo. Jackson y Buss (1975) sugirieron para este tipo de habitat no una estructura

jerárquica sino una "red competitiva" en donde la especie "A" desplaza a la especie "B" y la especie "B" desplaza a la especie "C" pero la especie "C" desplaza a la especie "A".



jerarquía competitiva



red competitiva

Las esponjas es uno de los grupos que presentan una gran variedad de colores llamativos. Con respecto al significado del color en las esponjas se ha pensado en tres razones:

- a) para foto-protección
- b) para ser reconocida como especie tóxica
- c) coloración fortuita

(Litchfield 1976).

Se ha observado en la esponja Haliciona que las partes expuestas a la luz están más pigmentadas que las partes que no lo están ; este fenómeno también se ha observado en Aplysina

fistularis.

En comunidades en la Antártica, en donde la depredación de esponjas es principalmente por estrellas de mar, Dayton (1971) notó que aquellas esponjas más coloridas nunca eran consumidas por éstas. Ejemplo de estas esponjas son Latrunoula apicalis Cuerdas, Dendrilla membranosa, Isodictya erinacea que son amarillas. Estas esponjas no tienen espículas o tienen muy pocas. El problema es que si se considera que las estrellas de mar carecen de capacidad visual, esto implica más bien una quimiorrecepción que una percepción visual; esta quimiorrecepción de algún metabolito que le indique toxicidad o que incluso la sustancia que imparte el color sea el agente nocivo; se conoce que la especie lotrocota birotulata produce un exudado colorido, mal oliente, que en agua es evitado por los peces (Green 1977).

Randall y Hartmann (1968) observaron peces que comen esponjas en las Indias Occidentales, no encontraron evidencia contundente de la relación color y el rechazo o la evasión. Por otro lado de observaciones in situ con luz de sumergible se nota que a mayores profundidades se observan los colores más intensos en las esponjas; presumiblemente a esas profundidades las esponjas se vean en distintos tonos de gris, tal vez las rojas se vean negras lo cual ya les daría cierta protección.

La observación de que algunas esponjas coloridas son tóxicas y otras no pudiera explicarse por medio del mimetismo Batesiano en el que algunas esponjas no tóxicas toman la coloración de alguna esponja tóxica para así recibir alguna protección gratuita por parecerse al modelo tóxico.

Estas discusiones llevan implícitas cierta interpretación

humana de la percepción del color y no considera que los peces pudieran tener otro rango de percepción.

Muchas esponjas viven en asociación con otros organismos, desde microorganismos como bacterias, microalgas azul-verdosas y zooxanthellae hasta poliquetos, anfipodos y oflúridos; las asociaciones reportadas van desde simbiosis, mutualismo, comensalismo y parasitismo.

¿Qué relación existe entre defensa química y estas asociaciones? o en otras palabras, ¿quién protege a quién?

Se ha citado que los coantidos de colores vivos y tóxicos protegen a la esponja que los alberga; por otro lado se ha sugerido que los anfipodos, poliquetos reciben protección física y química por parte de la esponja.

Una de las asociaciones más controvertidas y polémicas es la que involucra microorganismos y esponjas. Se sabe que los microorganismos son productores por excelencia de sustancias antibióticas (Waksman 1945). También se sabe que ciertos microorganismos viven aparentemente en simbiosis con la esponja. Por ende se puede pensar en que los productores de los agentes antibióticos son los microorganismos asociados. Esto pudiera ser factible y se conoce el caso de la bacteria marina Pseudomona bromoutilis aislada de Thalassia que produce el compuesto antimicrobiano 2-(3',5'-dibromo-2-hidroxifenil)-3,4,5-tribromopirrol (Burkholder 1966). En la esponja Aplysina fistularis y Aplysina cauliformis se han aislado compuestos bromados como el 2-(3',5'-dibromo-1-hidroxil-4'-ceto-ciclohexadien-

1'-il)acetamida entre otros (Ver Anexo).

Esto apoyaría la noción de que los microorganismos probablemente sean los productores; pero por otro lado (Jakowska y Nigrelli 1960) se ha visto que bacterias aisladas de una esponja con propiedades antibióticas no inhibieron a los microorganismos que el extracto de la esponja había inhibido, de lo que dedujeron que no eran las bacterias probablemente las productoras del compuesto antibiótico sino la esponja.

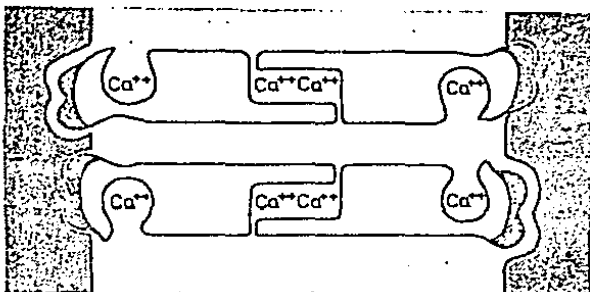
Esto sugiere que un posible mecanismo de simbiosis entre esponja y sus bacterias asociadas sea precisamente la resistencia que presentan éstas a los compuestos antimicrobianos en la esponja.

En cuanto a los aspectos relativos a la aglutinación en esponjas son de los menos estudiados sobre todo desde el punto de vista ecológico.

Los primeros estudios de aglutinación usando células de esponjas se realizaron para tener un dispositivo experimental sencillo que sirviera de modelo para el estudio de la agregación celular en general (Humphreys 1960) y que han servido de base para las teorías que explican las causas de fenómenos de desarrollo (Lilien 1969). Esto se explica porque las esponjas son organismos multicelulares de relativamente vaga organización de células embrionarias y diferenciadas que pueden ser fácilmente disgregadas. Además el uso de agua de mar como medio de suspensión reduce las potenciales complejidades en caso de usar suero o plasma en investigaciones con células de vertebrados

(Kuhns 1974).

De esos estudios se descubrió la existencia de un "factor de agregación" en la esponja Microciona prolifera, que requería cationes divalentes de calcio y magnesio para ser estable y para que se reagregaran las células de la esponja; estos factores de agregación median aproximadamente de 100-300 Angstroms de diámetro (Humphreys 1967). Estos factores de agregación (FA) son liberados en solución cuando se somete a la esponja a disociación química en agua de mar sin calcio ni magnesio. Sin la presencia de estos FA las células de esponja no se reagregan. Se ha sugerido el siguiente modelo para explicar tales observaciones (Kuhn 1974).



Estos FA presentan especificidad en cuanto a las células que agregan. Esto es, aglutinan preferencialmente a las células de la esponja donadora del factor de agregación. Esta capacidad se demostró al realizar experimentos en mezclas de células de varias esponjas en suspensión junto al factor de agregación a estudiar (Kuhn 1974). La extensión de esta especificidad puede estar relacionada a diferencias taxonómicas y posiblemente a diferencias entre tipos celulares (Leith y Steinberg 1972). Se ha sugerido que los factores de agregación funcionan en la membrana de células de esponjas intactas que serían el equivalente a hormonas en vertebrados (Rasmussen 1970).

Por otro lado si pensamos en la evolución filogenética de las esponjas, de seres unicelulares a multicelulares dos mecanismos esenciales se deben haber desarrollado: en primer lugar un sistema de reconocimiento específico de tejidos ubicado en la superficie celular y en segundo lugar un mecanismo de defensa contra invasores extraños.

Podemos identificar como elementos del primer sistema a los factores de agregación; en cuanto al segundo mecanismo y circunscribiéndose por el momento al caso de los injertos de esponjas, existen evidencias de tal mecanismo como el citado por Muller (Muller 1976) en la esponja Iroinia muscorum que sintetiza un factor que inactiva el factor de agregación de la esponja Geodia cydonium o el de la esponja Hymenocidon perleve que también secreta un factor similar (Curtis 1979).

Es un hecho conocido que en Geodia ocurre un inmunorreconocimiento xenogénico que da origen a reacciones necróticas a los tres días de haber hecho el injerto de otra esponja en Geodia. Además al mismo tiempo de la aparición de necrosis en los injertos, casi simultáneamente se sintetiza el inhibidor del factor de agregación y el FA disminuye. Todo esto apoya la suposición sobre que las reacciones de histocompatibilidad en esponjas son al menos parcialmente ocasionadas por una interrelación controlada entre el factor de agregación y el inhibidor del factor de agregación (Curtis y Van der Vyver 1971).

Las células bacterianas libres son elementos ubicuos en todas las aguas naturales, aunque constituyen solo una porción minoritaria de los recursos alimenticios disponibles a los invertebrados marinos filtradores (Jorgensen 1966). Las bacterias marinas están presentes en muy baja abundancia y contribuyen a la biomasa de la plataforma continental y aguas oceánicas con una porción más bien reducida (Hobbie 1972). Cuando llegan a estar presentes en grandes cantidades como para formar parte importante del plancton, generalmente se encuentran adheridas a partículas de detritus y no como células libres (Seki y Kennedy 1969): solo los filtradores de partículas gruesas pueden explotar este recurso alimenticio. Solo los miembros del phylum Porifera tienen una malla con un tamaño de malla lo suficientemente pequeño como para retener por filtración materia particulada en el rango de las bacterias, esto es, de 0.2 a 1.0 micras.

La esponja es un filtro viviente cuya anatomía consiste de un

sistema complejo de canales y una superficie ultrafiltrante constituida por las microvellosidades de los collares de coanocitos con un espaciamiento de 0.2 micras (Jorgensen 1966). Reilwig en un estudio de las esponjas marinas de agua templada Haliciona permollis y Suberites flocus determinó una eficiencia de retención de bacterias de un 77%, considerando una densidad de bacterias de 740,000 mil células por mL.

Asumiendo ciertos parámetros citados en la literatura como el de 10 millones de células bacterianas equivale a 1 microgramo de materia orgánica (ZoBell 1963), 15 litros de agua filtrada por ml. de oxígeno consumido (Jorgensen 1966) y una combustión de 0.8 mg. de materia orgánica por ml. de oxígeno consumido, estima que la esponja obtendría de los 63 microgramos de materia orgánica por litro unos 9.7 microgramos por litro una vez descontado el gasto metabólico. Este excedente podría mantener una tasa de crecimiento de la esponja de 50-60% por año (Reilwig 1973). Reilwig concluye que los requerimientos nutricionales de la esponjas pueden quedar enteramente cubiertos en aguas costeras de alto contenido orgánico (Reilwig 1974). También afirma que el 77% de eficiencia de retención de bacterias es bajo en comparación al 96% en eficiencia en esponjas tropicales si se toma en cuenta las densidades bacterianas encontradas por las esponjas tropicales como de 40 000 células por mL, que según la curva de % de retención vs. concentración de células citada por Reilwig, debería ser más baja. No encuentra ninguna explicación en base a diferencias anatómicas que explique esa menor eficiencia de las esponjas de aguas templadas con respecto a las tropicales.

De estas consideraciones se ve que las esponjas obtendrían

una gran ventaja si por algún mecanismo pudieran incrementar su eficiencia de filtración. Bergquist (1972) ha sugerido que la retención de partículas en el rango de tamaño de las bacterias debe ser a nivel del coanocito, donde el mucus que llena los espacios entre el collar de tentáculos atrapa a las bacterias que luego son ingeridas por el coanocito (Bergquist, 1972). Antes de ser digeridas, las bacterias han recorrido la totalidad del sistema inhalante, tiempo durante el cual cualquier compuesto antibacteriano que pudiera difundir en la corriente inhalante podría tener algún efecto. Bergquist y Bedford (1978) han planteado la posibilidad de que en este canal inhalante los compuestos antibacterianos provoquen una aglutinación moderada de las bacterias inactivadas, incrementando así el tamaño de la partícula a ser atrapada por el collar de coanocitos. El resultado final sería un incremento en la eficiencia de retención de las partículas bacterianas (Bergquist y Bedford 1978). En su planteamiento atribuyen de alguna manera propiedades aglutinantes a los agentes antimicrobianos.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre Aplysina fistularis se encontró antibiosis en el extracto metabólico y no en el agua intersticial. La aglutinación se presentó tanto en el extracto acuoso como en el agua intersticial. Lo que se puede interpretar como una localización exclusiva de los agentes antimicrobianos en el tejido de la esponja. Esto en primera instancia no apoya la tesis de Bergquist y Bedford en cuanto a asignar a los agentes antimicrobianos propiedades aglutinantes. Los datos de

aglutinación obtenidos en el agua intersticial apoyan la predicción de Bergquist y Bedford sobre la aglutinación moderada que debería presentarse en el sistema de canales. El que exista aglutinación en los canales implica la existencia de aglutininas solubles en los mismos. La existencia de aglutininas solubles ha sido puesta de manifiesto (Barondes 1964).

Es desventajoso para la esponja la secreción de aglutininas que se pierden en la corriente exhalante , pero no tanto puesto que quedan retenidas junto con las bacterias en los aglomerados bacterianos formados; la pérdida resulta mínima, existiendo tal vez un reciclamiento de las mismas.

En cierta forma, la existencia de aglutininas en esponjas, en particular en el sistema de canales, es razonable, ya que como se mencionó anteriormente, la alimentación de la misma depende en gran medida de su eficiencia en la retención de bacterias del agua de mar que filtra.

Para fundamentar más solidamente estas hipótesis sería de incuestionable valor el poder estudiar la variación de las propiedades de aglutinación de la esponja ,en particular de bacterias marinas, en función de la estación del año y mejor aún, en función de distintas concentraciones bacterianas en el agua circundante.

De acuerdo con los argumentos arriba expuestos se esperaría un aumento en el título de la aglutinación en condiciones de escasa población bacteriana, para aumentar la eficiencia de filtración ya que en esas condiciones es vital capturar el poco alimento

existente. De la misma forma se esperaría un descenso en los títulos de aglutinación en condiciones de relativamente mayor concentración bacteriana, en donde ya no sería tan crítico que se tuviera una alta eficiencia de filtración. Los datos de Reising (1974) sobre eficiencia de filtración en esponjas de aguas templadas con mayores concentraciones bacterianas con respecto a los de esponjas tropicales con menor concentración de bacterias, están de acuerdo a este razonamiento. Desafortunadamente no se puede atribuir esas diferencias en eficiencia de filtración a cambios en los títulos de las aglutininas porque no se hicieron esas determinaciones en esos estudios.

De estas consideraciones se desprende la necesidad de realizar mayores investigaciones en la relación entre la cantidad de aglutininas en esponja y los niveles bacterianos en el agua de mar.

Por otro lado el papel que juegan las aglutininas marinas en el mantenimiento de simbiosis es un tema interesante. El aislamiento de una bacteria marina que requiere obligatoriamente metabolitos de la esponja de la cual se aisló, puede ser el primer caso citado de tal posibilidad. Esta bacteria marina, Pseudomona insculta se aisló de la esponja Halichondria panicea solo pudo crecer en presencia de una lectina de la esponja y no con otras lectinas; además esta promoción de crecimiento por parte de la lectina de H. panicea no tuvo efecto en el crecimiento de otras bacterias aisladas de otras esponjas; esto sugiere fuertemente a este hecho interespecífico, como una posible base para el mantenimiento de una simbiosis entre

la esponja Halichondria panicea y la bacteria marina Pseudomona insolita. El que el factor de agregación y esta lectina sean moléculas diferentes, apunta hacia una variedad de aglutininas con diversas funciones biológicas. (Muller 1981)

Toda vez que se observó la posible coexistencia entre antibiosis y aglutinación, en la esponja Aplysina fistularis, algunas cuestiones saltan a la vista:

- ¿qué relación guardan entre sí?
- ¿cómo varían con respecto a las densidades de poblaciones bacterianas en el mar?
- ¿son complementarias, es decir, sinergistas o por el contrario son antagonistas?
- ¿la concentración de sustancias antibióticas responde directamente al nivel de microorganismos patógenos en el agua de mar filtrada o tiene un espectro de acción más amplio dirigido contra epibiontes y depredadores?
- ¿la aglutinación varía de una manera indirectamente proporcional a la concentración de microorganismos en el agua de mar?
- ¿qué papel juegan en el mantenimiento de la simbiosis con cianobacterias o zooxantelias?
- ¿son de alguna manera responsables del fenómeno conocido como "blanqueo de corales y esponjas" que se caracteriza por la pérdida de las zooxantelias simbiotes?

son preguntas muy interesantes de responder.

La aparente separación de actividades (aglutinación y antibiosis) en al menos dos entidades químicas distintas (derivados bromados y lectinas) sugiere una mayor flexibilidad, pudiendose manifestar individualmente sin que necesariamente se presente la otra, lo cual resulta ser ventajoso para la esponja en determinada situación como cuando exista una alta densidad de bacterias patógenas conviene tener un alto nivel de antibiosis y bajo de aglutinación.

En síntesis, la importancia de estos resultados de A. fistularis con toda esta información referida, es que establece en primer lugar la coexistencia entre antibiosis y aglutinación, lo que trae como corolario que el estudio de propiedades biológicas como antibiosis, aglutinación deben estudiarse simultáneamente con el objeto de entender, con un enfoque ecológico su interrelación.

Las conclusiones del presente trabajo se pueden resumir en las siguientes consideraciones:

- 1) Se reporta por primera vez aglutinación en esta esponja
- 2) De los resultados obtenidos se infiere que la coexistencia entre antibióticos y aglutinación es posible en Aplysina fistularis
- 3) Los factores antibióticos y aglutinantes en Aplysina fistularis son dos entidades químicas distintas y presentes en sitios presumiblemente distintos dentro de la esponja
- 4) La técnica de detección de aglutinación (usando eritrocitos de varios tipos) en portaobjetos y en micropozos para dilución seriada es práctica, sencilla, reproducible y económica como para adoptarla como técnica de rutina para la detección de actividad de aglutinación en organismos marinos.
- 5) Los agentes antimicrobianos en Aplysina fistularis pueden inhibir a bacterias del género Pseudomonas lo cual sugiere que pueden actuar como tales ante las ubicuas bacterias marinas de ese género .
- 6) Las lectinas o aglutininas de la esponja Aplysina fistularis muestran signos de poder de aglutinación de bacterias del género Pseudomonas lo cual sugiere que pueden actuar como tales ante las ubicuas bacterias marinas de ese género .

- 7) La detección de poder de aglutinación en el agua intersticial es una evidencia que apoya la tesis de Bergquist y Bedford sobre la existencia de agentes aglutinantes en los canales de la esponja como una estrategia que mejora la eficiencia de filtración de bacterias en suspensión en el agua de mar y su alimentación.
- 8) La necesidad de ampliar y continuar estos estudios a otras esponjas con el fin de aclarar algunas de las interrogantes surgidas en torno a su relación con los niveles de antibiosis en otras esponjas y en relación a las densidades poblacionales bacterianas en el medio oceánico.
- 9) Debido a la propiedad de aglutinar eritrocitos y bacterias las lectinas de origen marino pueden ser usadas en tipificación de sangre y bacterias. Por sus propiedades mitogénicas podrían ser usadas para la producción de linfocitos. También aglutinan células de ciertos tipos de cáncer lo que es importante en la elaboración de equipos de diagnóstico. Debido a la propiedad de fijarse a determinados azúcares pueden usarse como soporte de cromatografía de afinidad. Por la misma causa se pueden usar en citología en la visualización de estructuras celulares usando lectinas marcadas.
- 10) Debido a la especificidad de la aglutinación de células de esponjas se sugiere usar este tipo de criterio con fines quimiotaenómicos.

B I B L I O G R A F I A

- ARENAS, F. V. 1966. "Hidrografia y Plancton en el Arrecife " La Blanquilla", Veracruz, Veracruz." Tesis Profesional Facultad de Ciencias. UNAM. 28 pag.
- BAKUS, G. J., THUN, M. 1979. "Bioassays on the Toxicity of Caribbean Sponges." Colloq. Int. C.N.R.S. VOL 291: 417-422.
- BAKUS, G. 1981. " Chemical Defense Mechanisms and Fish Feeding Behaviour on the Great Barrier Reef, Australia". Science 211: 497-499.
- BAKUS, G. 1986. "Chemical Ecology of Marine Organisms: An Overview". Journal of Chemical Ecology vol. 12, #5: 951-987.
- BALDO, B. A. 1973. Immunology. 25:813-826.
- BALDO, B. A., UHLENBRUCK, G. 1975a. "Purification of Tridacnin, a Novel Anti-beta-(1-6)-digalactobiose Precipitin from the Hemolymph of Tridacna maxima (Roding) " Febs. Letters vol. 55:25-28.
- BALDO, B. A., UHLENBRUCK, G. 1975b. In: "Advances in Experimental Medicine and Biology" (Hildeman, W.H., Benedict, A.A. Eds.) vol 64:3-11. Plenum Press, N.Y.
- BALDO, B. A., UHLENBRUCK, G., STEINHAUSEN, G. 1977. Comp. Biochem. Physiol. A56:343-351
- BARBIER, M. 1979. " Introduction to Chemical Ecology " pags. 1-98. Longman.
- BARONDES, S. H. 1984. "Soluble Lectins: A New Class of Extracellular Proteins". Science vol. 223: 1259-1264.
- BASLOW, M. H. 1977. "Porifera". In: " Marine Pharmacology: A Study of Toxins and other Biologically Active Substances of Marine Origin". pags 86-99. Krieger, R.E. Publishing Company, Huntington, N.Y.
- BERGQUIST, P. 1972. "Phylum Porifera". In " Textbook of Zoology. Invertebrates" 76-103. Marshall A.J. y Williams W.D. (ed). London and Basingstoke: MacMillan.
- BERGQUIST, P. 1978. "Sponges". Hutchinson of London 267 pag.
- BERGQUIST, P., BEDFORD, J. J. 1978. " The incidence of Antibacterial Activity in Marine Demospongiae: Systematics and Geographic Considerations". Marine Biology vol 46.:215-221.
- BLUNDEN, G., ROGERS, D. J., FARNHAM, W. F. 1975. Lloydia 38:162-168
- BOYD, W. C., ALMODOVAR, L. R., BOYD, L. G. 1966. Transfusion 6: 82-83
- BRETTING, RENWRANTZ. 1973. Z. Immunitaetsforsch. 145:242-249
- BROWN, R., ALMODOVAR, L. R., BHATIA, H. M., BOYD, W. C. 1968. "Blood Group Specific Agglutinins in Invertebrates" J. Immunol. vol 100 No. 1 :214-216.
- BURKHOLDER, P. R., RUETZLER, K. 1969. "Antimicrobial Activity of Some Marine Sponges" Nature (London) vol 222: 983-984
- CLAYTON, R. B. 1970. "The Chemistry of Non-Hormonal Interactions :Terpenoid Compounds in Ecology". In: "Chemical Ecology" (Simeone y Sandheimer Eds.) pags 235-280. Academic Press.
- COOPER, K. E. 1963 "The Theory of Antibiotic Inhibition Zones" In : "Analytical Microbiology" (Kavanaugh, F. Ed.) Academic Press pp 1-87
- CURTIS, A. S. G., VAN DER VYVER, G. 1971. J. Embryol. Morph. vol 26:295-312.
- CURTIS, A. S. G. 1979. In: " Biology and Systematics of Colonial Organisms" (Larwood, G., Rosen, B. R. ,Eds.) pag 39-48. Academic

- Press. Nueva York.
- DAYTON, P. K. 1971. "Competition, Disturbance and Community Organization: The Provision and Subsequent Utilization of Space in a Rocky Intertidal Community". *Ecol. Monog.* vol. 41: 351-389.
- DE LA LANZA, G.E. 1965. "Estudio Preliminar de Algunos Factores Físicos y Químicos de las Aguas Costeras de Veracruz, Veracruz" Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM, pags. 6-8.
- DIAZ, G. 1966. "Estudio Preliminar de la Sistemática y Distribución de la Flora Marina del Arrecife La Blanquilla, Veracruz. Tesis profesional Facultad de Ciencias, UNAM. 78 pag.
- DICONZA, J. J. 1970. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 48: 515-523.
- FAULKNER, D. J., ANDERSEN, R. J. 1974. "Natural Products Chemistry of the Marine Environment". In: "The Sea" vol 5 (Goldberg, E. Ed.) pp 679-714.
- FAULKNER, D. J. 1984. "Marine Natural Products: Metabolites of Marine Algae and Herbivorous Marine Mollusks." *Nature Products Reports* pp 251-280.
- FEENEY, P. 1975. "Plant Apparency and Chemical Defense". In: "Recent Advances in Phytochemistry". vol 10 "Biochemical Interactions Between Plants and Insects" (Wallace, J. W., Mansell, R. I. Eds.) Plenum Press, Nueva York, London.
- FINDSTAD, C. L., LITMAN, G. W., FINDSTAD, J., GOOD, R. A. 1972. "The Evolution of the Immune Response XIII. The Characterization of Purified Erythrocyte Agglutinins from Two Invertebrate Species" *J. Immunol.* vol. 108 No. 6 : 1704-1711
- FLETCHER, T. C., GRANTE, P. T. 1969. *Biochem. J.* 115: 65
- FLORES, COTO, C. 1967. "Contribución al Conocimiento de las Apendicularias del arrecife La Blanquilla, Veracruz, Veracruz." Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM 55 pags.
- FUENTES, V. L. E. 1981. "Estudio Taxonómico de las Esponjas Marinas del Area de Veracruz, Veracruz, México." Tesis profesional Facultad de Ciencias, UNAM, pags 12-14.
- FUKE, M. T., SUGAI, T. 1972. *Biol. Bull* 143: 140-149
- GALSTOFF, P. S. 1925. "Regeneration after Dissociation (An Experimental Study on Sponges). I. Behaviour of Dissociated Cells of Microciona prolifera under Normal and Abnormal Conditions." *J. Exptl. Zool.* vol 42: 183-221.
- GAMBERLY, CH., UHLENBRUCK, G., RENWRANTZ, L. 1974. "Blood Group Like Substances in Some Marine Invertebrates. IV. H- and A- Like Substances, Agglutinins and Precipitins: Their Distribution in *Cerianthus* sp." *Mar. Biol.* vol. 26: 369-377.
- GREEN, G. 1968. "Contribución al Conocimiento de la Sistemática y Ecología de las Esponjas del Arrecife de La Blanquilla, Veracruz, Veracruz, México" Tesis profesional Facultad de Ciencias, UNAM. 102 pags.
- GREEN, G. 1977. "Sinopsis Taxonómica de Trece Especies de Esponjas del Arrecife La Blanquilla, Veracruz, Veracruz, México." *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.* VOL. 4 (1): 79-98.
- GREEN, G. 1977. "Ecology of Toxicity in Marine Sponges" *Marine Biology* vol 40: 207-215.
- HALL, J. L., ROWLANDS, D. T. Jr. 1974. "Heterogeneity of Lobster Agglutinins. II. Specificity of Agglutinin-Erythrocyte Binding". *Biochemistry* vol 13 No. 4: 828-832
- HALSTEAD, B. 1985. "Poisonous and Venomous Animals of the World". The

- Darwin Press, Princeton, Nueva Jersey. 1325pag.
- HARDY, S. W., FLETCHER, T. C., GERRIE, L. M. 1976. *Biochem. Soc. Trans.* vol 4 : 473-475
- HENKART, P., HUMPHREYS, S., HUMPHREYS, T. D. 1973. "Characterization of Sponge Aggregation Factor. A Unique Proteoglycan Complex." *Biochemistry* vol 12: 3045-3050.
- HOBBIE, J. E., HOLM-HANSEN, O., PACKARD, T. J., POMEROY, L., SHELDON, R. W., THOMAS, J. P., WIEBE, W. J. 1972. "A Study of the Distribution and Activity of Microorganisms in Ocean Waters" *Limnol. Oceanogr.* vol. 17(4):544-545.
- HOBSON, P. N., MANN, S. O. 1970. "Applications of the Coulter Counter in Microbiology" In: "Automation, Mechanization and Data Handling in Microbiology" (Baillie Ann. Gilbert, R. J. Eds.) Academic Press London-New York, pp.95-105
- HUMPHREYS, T., HUMPHREYS, S., MUSCONA, A. A. 1960. "Rotation Mediated Aggregation of Dissociated Sponge Cells" *Biol. Bull.* vol 119: 294.
- HUMPHREYS, S. T., HUMPHREYS, S., MUSCONA, A. A. 1960. *Biol. Bull.* vol 119-294.
- HUMPHREYS, T. 1967. "The Cell Surface and Specific Cell Aggregation". In: "The Specificity of Cell Surfaces" (Davies y Warron Eds.). Prentice Hall, inc., Englewood Cliffs, New Jersey, pages 195-210.
- IOVINE, E., SELVA, A. A. 1979. "Determinación de Grupos Sanguíneos en el Laboratorio en la Clínica: Metodología, Analítica, Fisiopatología e Interpretación Semiológica" 2a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Junio 831/Buenos Aires.
- JACKSON, J. B. C., BUSS, L. 1975. "Allelopathy and Spatial Competition among Coral Reefs [Invertebrates]" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* VOL. 72:5160-5163.
- JAKOWSKA, S., NIGRELLI, R. F. 1960. "Antimicrobial Substances from Sponges" *Annals of the New York Academy of Sciences.* vol. 90. Art. 3: 913-916.
- JOHNSON, H. M. 1964. "Human Blood Group A1 Specific Agglutinin of the Butter Clam *Saxidomus giganteus*" *Science* vol 146: pages. 546-549.
- JORGENSEN, C. B. 1966. "Biology of Suspension Feeding" Pergamon Press. London.
- KAMIYA, H., SHIMIZU, Y. 1980. *Biochim Biophys Acta* 522: 171-178
- KAPLAN, R., LI, S. S., KEHOE, J. M. 1977. "Molecular Characterization of Limulin, A Static Binding Lectin from the Hemolymph of the Horseshoe crab, *Limulus polyphemus*" *Biochemistry* vol 16 No. 19: 4297-4303.
- KOTHBAUER, H., SCHENKEL-BRUNNER, H. 1975. *Comp. Biochem Physiol* A50:27-29
- KUBITSCHKEK, H. E. 1969. "Counting and Sizing Microorganisms with the Coulter Counter". In "Methods in Microbiology" vol 1 (Norris, J. R., Ribbons, D. W. Ed.) Academic Press pp 593-610.
- KUHNS, W. J., WEINBAUM, G., TURNER, R., DURSER, M. M. 1974. "Sponge Aggregation: A Model for Studies on Cell-Cell Interactions". *Annals New York Academy of Sciences* vol. 234, junio 1974:58-74.
- LANG, J. 1973. "Interspecific Aggregation by Scleractinian Corals 2." *Bull. Mar. Sci.* vol. 23: 260-279.
- LEITH, A., STEINBERG, M. 1972. *Biol. Bull.* vol. 143: 468.
- LEWIS, S. M. 1982. "Sponge-zooanthids Associations: Functional Interactions" *Smithson. Contrib. Mar. Sci.* vol 12:465-474.

- LILJEN, J.E. 1969. "Toward a Molecular Explanation for Specific Cell Adhesion" in: "Current Trends in Developmental Biology Vol. 4" (Moscona, A.A., Manory, A. Eds.) Academic Press Inc. New York N.Y.
- LITCHFIELD, C. 1976. In: "Aspects of Sponge Biology" pag. 29. (Harrison, F.W., Cowden, A.R. Eds.) Academic Press, N.Y. London, San Francisco.
- LYMAN, J., FLEMING, R.W. 1940. "Composition of Sea Water". J. of Mar. Res. 3: 134-148
- MANES, L.V., BAKUS, G., CREWS, P. 1984. "Bioactive Marine Sponge Norditerpene and Norsesiterpene Peroxides" Tetrahedron Lett. vol. 25: 931-934.
- MARGOLIASH, E., SCHENK, J.R., HARGIE, M.P., BUROKAS, S., RICHTRE, W.R., BARLOW, G.H., MOSCONA, A.A. 1985. "Characterization of Specific Cell Aggregation Materials from Sponge Cells". Biochem. Biophys. Res. Commun. vol 20: 383-388
- MCCAFFREY, E.J., ENDEAN, R. 1985 "Antimicrobial Activity of Tropical and Subtropical Sponges" Mar. Biol. 89: 1-8
- MCDADE, J.E., TRIPP, H.R. 1967. J. Invertebr. Pathol. vol 9: 523-530.
- MINALE, L. 1978. "Terpenoids from Marine Sponges". In: "Marine Natural Products vol. 1 Cap 4". (Scheuer, P.J. Ed.) Academic Press pp 175-240
- MULLER, W.E.G., ZAHN, R.K. 1973. "Purification and Characterization of a Species-Specific Aggregation Factor in Sponges". Exp. Cell Res. vol 80: 95-104.
- MULLER, W.E.G., MULLER, I., KURELEC, B., ZAHN, R.K. 1976. "Species Specific Aggregation Factor in Sponges IV. Inactivation of the Aggregation Factor by Mucoid Cells from Another Species" Exp. Cell Res. vol. 98: 31-40
- MULLER, W.E.G., MULLER, I., PONDELJAK, V., KURELEC, B., ZAHN, R.K. 1978. "Species Specific Aggregation Factor in Sponges: Isolation, Purification and Characterization of the Aggregation Factor from Suberites domuncula". Differentiation 10: 45-53.
- MULLER, W.E.G., ZAHN, R.K., KURELEC, B., LUCU, C., MULLER, I., UHLENBRUCK, G. 1981. "Lectin, a Possible Basis for Symbiosis Between Bacteria and Sponges." Journal of Bacteriology vol. 145 #1 : 548-558.
- NIGRELLI, R.F., JAKOWSKA, S., CALVENTI, I. 1959. "Ectyontin, An Antimicrobial Agent from the Sponge Microciona prolifera (Verrill)" Zoologica, N.Y. 44:173-175.
- NOGUCHI, H. 1903. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 34:265
- OPPENHEIMER, C.H., ZOBELL, C.E. 1952. "The Growth and Viability of Sixty Three Species of Marine Bacteria as Influenced by Hydrostatic Pressure." J. of Mar. Res. 11: 10-19
- O'ROURKE, F.J. 1961. "Presence of Blood Antigens in Fish Mucus and its Possible Parasitological Significance" Nature vol 18: 943.
- PORTER, J.W. 1974. "Community Structure of Coral Reefs on Opposite Sides of the Isthmus of Panama." Science, vol 186: 543-545.
- QUINN, J.F. 1982. "Competitive Hierarchies in Marine Benthic Communities". Oecologia vol : 129-135.
- RANDALL, J.E., HARTMAN, W.D. 1968. "Sponge Feeding Fishes of the West Indies" Mar. Biol. vol 1: 216-225.
- RAPER, J.R. 1970. "Chemical Ecology among Lower Plants" in: "Chemical Ecology" (Simeone y Sondheimer Eds.) pag. 21-42. Academic Press
- RASMUSSEN, HOWARD. 1970. "Cell Communication, Calcium Ion and Cyclic Adenosine Monophosphate" Science 170: 404
- REISWIG, H.M. 1973. "Population Dynamics of Three Jamaican

- Demospongiae". Bull. Mar. Sci. 23:191-226
- REISWIG, H.M. 1974. "Bacteria as Food for Temperate Water Marine Sponges". Can. J. Zool. vol 53:582-589.
- RINEHART, K.L. Jr., SHAW, P.D., SHIELD, L.S., GLOER, J.B., HARBOUR, G.C., KOKER, M.E.S., SAMAIN, D., SCHWARTZ, R.E., TYMIK, A.A., WELLER, D.L., CARTER, G.J., MUNRO, M.H.G., BAKUS, G.J. 1981. "Marine Natural Products as Sources of Antiviral, Antimicrobial, and Antineoplastic Agents" Pure and Applied Chemistry 53:795-817
- SARA, M., VACELET, J. 1973. "Ecologie des Demosponges" in: "Traite de Zoologie. III Spongiaires" pgs. 462-576. (Grasse, P.P.) Paris: Masson, 1973.
- SEKI, H., KENNEDY, O.D. 1969. "Marine Bacteria and Other Heterotrophs as Food for Zooplankton in the Strait of Georgia during the Winter". J. Fish Res. Board Can. 26:3165-3173
- SIEBURTH, J.M. 1978. In: "Sea Microbes" Cap. 5 pp108-109
- SHIOMI, K., KAMIYA, H., SHIMIZU, Y. 1979. Biochim Biophys Acta 576:118-127.
- SHIMIZU, Y., KAMIYA, H. 1983. "Bioactive Marine Polymers" In: chap 7 of "Marine Natural Products" (Scheuer, P. Ed.) vol 5: pgs. 391-427
- STENPIEN, M.F., RUGGIERI, G.D., NIGRELLI, R.F., CECIL, J.T. 1970. In: "Food-Drugs from the Sea" (Younken, H.W. Jr. Ed.) PAGES 295-305, Marine Technology Society, Washington, D.C.
- SUAREZ, C.J. 1965. "Datos Meteorologicos, Hidrograficos y Planctonicos del Litoral de Veracruz, Veracruz".
- SULLIVAN, B., FAULKNER, D.J., WEBB, L. 1983. "Siphonodictidine, a Metabolite of the Burrowing Sponge Siphonodictyon sp. that Inhibits Coral Growth." Science vol 221:1175-1176
- SUTHERLAND, J.P., KARLSON, R.H. 1977. "Development and Stability of the Fouling Community at Beaufort, North Carolina." Ecol. Monogr. vol 47: 425-446.
- THOMPSON, J.E., BARRON, K.D., FAULKNER, D.J. 1983. "Localization of Two Brominated Metabolites, Aerothionin and Homoerothionin in Spherulic Cells of the Marine Sponge Aplysina fistularis (Verongia thiona)" Acta Zool. vol 64(4): 199-210.
- THOMPSON, J.E. 1985. "Exudation of Biologically-Active Metabolites in a Sponge (Aplysina fistularis) II. Biological Evidence". Mar. Biol. vol 88: 23-26.
- TRIPP, M.R. 1966. J. Invertebr. Pathol. vol 8: 478-484.
- UHLENBRUCK, G., STEINHAUSEN, G., BALDO, B.A. 1977. Comp. Biochem. Physiol. B56, pags. 329-333.
- VAITH, P., UHLENBRUCK, G., MUELLER, W.E.G., HOLZ, G. 1979. Dev. Comp. Immunol. vol 3: 399-416.
- VUILLEMIN, C. 1889. "Notes e Memoires" 18th. Sess., pag 525. C.R. Ass. Fr. Avance Sci., Paris.
- WAKSMAN, S.A. 1945. "Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances". Commonwealth Foundation, N.Y.
- WALKER, R.P., THOMPSON, J.E., FAULKNER, D.J. 1980. "Sesterterpenes from Spongia idia". J. Org. Chem. vol 45: 4970-4972.
- WALKER, R.P., THOMPSON, J.E., FAULKNER, D.J. 1985. "Exudation of Biologically Active Metabolites in a Sponge (Aplysina fistularis) II. Chemical Evidence". Mar. Biol. vol 88: 27-32.
- WHITTAKER, R.H., FEENEY, P.P. 1971. "Allelochemicals: Chemical Interactions between Species". Science 171:757-770.
- WILSON, H.V. 1907. "On Some of Coalescence and Regeneration in Sponges" J. Exptl. Zool. vol 5: 245-258.

WILSON, H. V. 1910. "Development of Sponges from Dissociated Tissue Cells". Bull. Bur. Fisheries vol 30: 1-30.

YOUNGKEN, H. W., SHIMIZU, Y. 1975. In "Chemical Oceanography" (Riley, J. P., Skirrow, G., Eds.) vol 4: 269-317. Academic Press, London (2nd Edition).

ZOBELL, C. E. 1963. "Domain of the Marine Microbiologist". In: "Symposium on Marine Microbiology" (Oppenheimer, C. H., Thomas, C. C., Eds.) Springfield, Illinois pp 3-24

ANEXO

Preparación del Agua de Mar Artificial (Lyman y Fleming , 1940)

1) fluoruro de sodio	0.15 g
2) cloruro de estroncio, hexahidratado	1.20 g
3) ácido bórico	1.30 g
4) fosfato de potasio	4.50 g
5) bromuro de potasio	4.80 g
6) bicarbonato de sodio	9.60 g
7) cloruro de potasio	33.00 g
8) nitrato de amonio	36.00 g
9) cloruro de calcio	30.00 g
10) cloruro de magnesio	248.00 g
11) cloruro de sodio	1,175.00 g
12) sulfato de sodio	
agua	20.00 litros

Se disuelven por separado cada una de las sales y se mezclan en el orden indicado.

Preparación de Medio Peptonado ZoBell tipo 2216 (Oppenheimer-ZoBell 1952.)

- Extracto de levadura	1.0 g
- Bacto peptona	5.0 g
- Cloruro férrico (1.2%)	1.0 ml
- Agua de mar artificial	200.00 ml
- Agua destilada(pH 7.5-7.6)	800.00 ml
- Agar bacteriológico	15.00 g

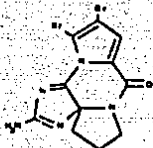
Esterilización a 121 grados celcius y 15 lb/pulg cuadrada durante 20 minutos.

Preparación de la Escala de Turbidez de MacFarland

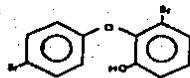
Tubo	Acido sulfúrico 1%	Cloruro de Bario 1%	Densidad (# de células X mL)
1	9.9 ml	0.1 ml	300 millones
2	9.8 ml	0.2 ml	600 millones
3	9.7 ml	0.3 ml	900 millones
4	9.6 ml	0.4 ml	1200 millones
5	9.5 ml	0.5 ml	1500 millones
6	9.4 ml	0.6 ml	1800 millones
7	9.3 ml	0.7 ml	2100 millones
8	9.2 ml	0.8 ml	2400 millones
9	9.1 ml	0.9 ml	2700 millones
10	9.0 ml	1.0 ml	3000 millones

ANEXO 1.

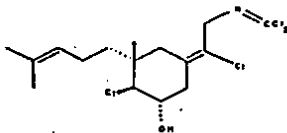
Algunos Metabolitos Secundarios de Esponjas y Otros Organismos Marinos



Phalloia flabellata (esponja)
4,5- dibromofalloidina
anticancerígeno



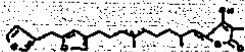
Dysidea herbacea (esponja)
2-(4-bromoferanil)-3-bromotereno
vs. Gram + y Gram -



Pseudotrypsinolide (esponja)

ANEXO 2.

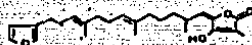
Algunos Metabolitos Secundarios de Esponjas y Otras Organismos Marinos



Ircinia-1 y -2

Ircinia-1 y -2

vs. *Rhizococcus* sp., mc. 1 (T/ml)
vs. *S. aureus* (C 5 G/ml)



Ircinia variabilis

variabilina

antibiotica



Spongia nitens

Nitonina

vs. *Myxobacterium* sp.



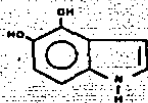
Ircinia fasciculata

fasciculatina

vs. *S. aureus*

ANEXO 3.

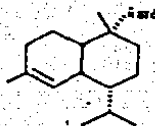
Algunos Metabolitos Secundarios de Esponjas y Organismos Marinos



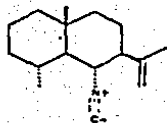
Agelas sp. (esponja)
 6-hidroxiindol
 antibiótico



Polyfibrospongia maynardi (esponja)
 3-(2-aminoetil)-5,6-dibromoindol
 antibacteriano

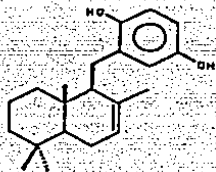


Helicondria sp.
 helicondria
 antimicrobiano



Acanthella acuta
 acanthellina-1
 antibacteriano

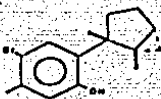
Algunos Metabolitos Secundarios de Esponjas y Otros Organismos Marinos



Isorenieral

— Dictyoportis zanzaroides (alga café)

Fungicida



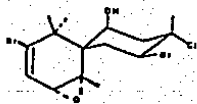
Laurencia Intermedia (alga)

Laurelinteral

vs. *S. aureus*

vs. *M. smegmatis*

vs. *C. albicans*

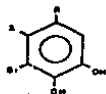


Laurencia filiformis

prepaciferol

vs. *S. aureus* (10-100 ppm)

vs. *M. smegmatis*



C_6H_3BrClO

C_6H_3BrClO

Rhodowella laris (alga Rhodowellaceae)

Gemithella dentata "

Rhodowella confervoides "

vs. *M. subtilis*

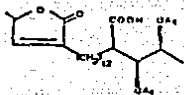
vs. *E. coli*

vs. *Serratia pelagica*

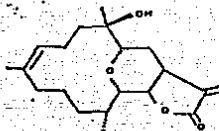
vs. *Serratia maritima*

vs. *Vibrio physoclonum*

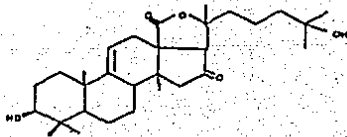
Algunos Metabolitos Secundarios de Esponjas y Otros Organismos Marinos



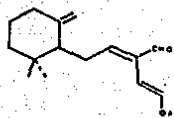
Pteroporella guadalupensis (spongia)
 2-(13-carboxyl-14,15-diacetoxyl-norbornene)-3-pentanolide
 antibiótico



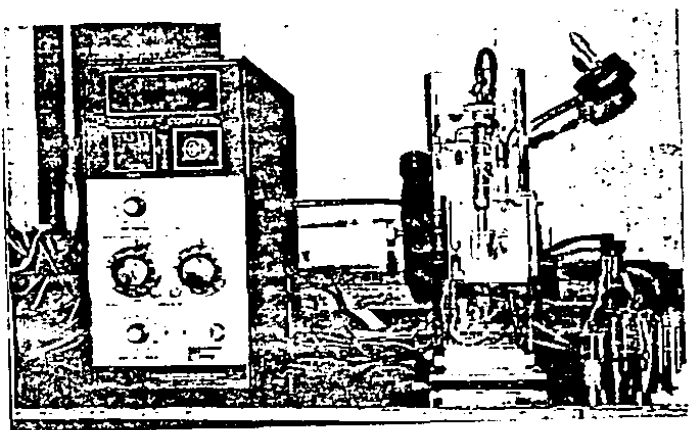
Simicic acidosa (spongia)
 simicicina
 antibiótico



Stichopus jamaicensis (holozouza)
 melastana A
 antifúngico



Onchidella binneyi (epistobrancia)
 onchidela
 w: E. aureus



Aparato Coulter