

03096



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
(Unidad Académica Mazatlán)

Universidad Nacional Autónoma de México



“Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de algunas esponjas marinas en condiciones de cultivo”.

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(Biología Marina)**

P R E S E N T A:

Biol. Pesq. BENJAMÍN YÁÑEZ CHÁVEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO**

**COMITÉ TUTORAL:
DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
DRA. ANA MARGARIDA TRIGO DE SOUSA ROQUE**

MAZATLÁN, SIN., JULIO DE 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



***Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
(Unidad Académica Mazatlán)***

Universidad Nacional Autónoma de México



COMITÉ TUTORAL:

Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo

Dr. Javier Carmona Jiménez

Dra. Ana Margarida Trigo de Sousa Roque

JURADO DE EXAMEN:

Presidente: Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

Secretario: Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo

Vocal: Dra. María Nuria Méndez Ubach

Suplente: Dr. Javier Carmona Jiménez

Suplente: Dra. Ana Margarida Trigo de Sousa Roque

Autorigo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM en formato electrónico e impreso el
18-06-04
Benjamín
Jaimes Chaves
P.A. *Shadas*

Dedicatoria:

"Esta tesis esta dedicada a mi familia, por el cariño y amor tan grandes que me dan, puedo sentirlo en el lugar que me encuentre, recuerden que aunque mis pasos me lleven lejos de ustedes siempre están en mi corazón".

Agradecimientos:

A mi familia Sr. Brígido Yáñez O., Teresa, Isidro, Gilberto, Isabel, David, Francisco, Guadalupe y Sara, muchas gracias por su cariño.

Al Dr. José Luis Carballo, por compartir sus conocimientos conmigo, su paciencia para orientarme en este difícil camino y sobre todo por su amistad y alegría que siempre hacen agradable el trabajar en su compañía.

A el inigualable grupo de esponjiólogos del “Laboratorio de Ecología de Eventos” los casi doc. Enrique Ávila y Cristina Vega, los casi mastas José Antonio Cruz y Héctor Nava y los casi biólogos Leonardo Camacho, Claudia Padilla y José Joel Barrón, su compañía y alegría hacen de cada día de trabajo un día de fiesta, no se les olvide que son mis hermanitos. Al capitán de Altura Juan Toto Fiscal, por llevarnos a muestrear, su buen humor hace los días de muestreo muy divertidos.

A los miembros de mi comité tutorial y también miembros de mi jurado de examen Dr. Javier Carmona Jiménez, Dra. Ana Roque, Dra. Nuria Méndez y Dra. Cecilia Vanegas, por su tiempo y conocimientos invertidos en revisar esta tesis, sus consejos y sugerencias siempre fueron muy importantes para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de generación: Héctor, Toño, Itzia, Malena, Mayra, Ramón, Manuel, Víctor, Roberto y Jorge, por su amistad.

A las secretarias del posgrado Sra. Margarita Cordero (Unidad Mazatlán) y la Sra. Norma Suazo (posgrado) por su valiosa ayuda para realizar los trámites de documentos.

A los responsables del centro de computo del ICMYL-UNAM (Mazatlán) Mat. Germán Ramírez y Lic. Carlos Suárez, por su apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Sra. María Clara Ramírez y Pedro Allende, responsables de la biblioteca “Dra. María Elena Caso” del ICMYL-UNAM (Mazatlán), por su ayuda para conseguir material bibliográfico.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado por los apoyos económicos otorgados, sin los cuales no hubiera podido realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, y a todo el personal que ahí labora por las facilidades prestadas para la elaboración de esta tesis.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	6
4. HIPÓTESIS.....	10
5. OBJETIVOS.....	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
6.1. Cultivos auxiliares para el suministro de alimento.....	12
<u>6.1.1. Cultivo de bacterias.....</u>	<u>12</u>
<u>6.1.2. Cultivo de microalgas.....</u>	<u>13</u>
6.2. Descripción de los sistemas de cultivo.....	15
<u>6.2.1. Sistema de cultivo semicontrolado.....</u>	<u>15</u>
<u>6.2.2. Sistema de cultivo en el medio natural.....</u>	<u>17</u>
6.3. Obtención de las ejemplares, fijación a los sustratos artificiales y traslado a los sistemas de cultivo.....	19
6.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas <i>Mycale cecilia</i> y <i>Dysidea amblia</i> (cultivo semicontrolado y cultivo en el medio natural).....	20
<u>6.4.1. Diseño experimental.....</u>	<u>20</u>
6.4.1.1. Cultivo semicontrolado.....	20
6.4.1.2. Cultivo en el medio natural.....	22
<u>6.4.2. Parámetros poblacionales.....</u>	<u>22</u>
<u>6.4.3. Parámetros ambientales.....</u>	<u>23</u>
6.5. Efecto de la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de la esponja <i>Dysidea amblia</i> en condiciones de cultivo semicontroladas.....	24
<u>6.5.1. Diseño experimental.....</u>	<u>24</u>

6.6. Tratamiento de la información.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia.....	27
<u>7.1.1. Parámetros físico químicos.....</u>	<u>27</u>
<u>7.1.2. Parámetros poblacionales (crecimiento y supervivencia).....</u>	<u>28</u>
7.2. Efecto de la interacción de la temperatura y la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de la esponja <i>Dysidea amblia</i> en condiciones de cultivo semicontroladas.....	32
7.3. Comparación entre los sistemas de cultivo semicontrolados y medio natural.....	34
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIONES.....	41
10. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. RESUMEN

Las esponjas marinas son fuente de metabolitos bioactivos, algunos de gran interés por su posible aplicación en la farmacología. Por lo tanto, la producción de biomasa de esponjas, para el suministro de metabolitos bioactivos, es un tema que ha cobrado importancia en la actualidad. Sin embargo, resulta muy complicado reproducir las condiciones adecuadas para el óptimo desarrollo y crecimiento de las esponjas, bajo condiciones de cultivo controlado. La temperatura es uno de los principales factores que regula la abundancia, distribución, reproducción y crecimiento de las esponjas. En este sentido, en el presente estudio se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas *Mycale cecilia* y *Dysidea amblia*, bajo condiciones de cultivo semicontroladas. Para esto se realizó un cultivo a diferentes temperaturas con las especies mencionadas. En el caso de *M. cecilia*, se establecieron dos tratamientos, uno caliente (tratamiento C) que se mantuvo a una temperatura promedio de 30.1 ± 0.097 °C, y uno frío (tratamiento F) que se mantuvo a 21.8 ± 0.088 °C (promedio \pm error estándar). En el caso de *Dysidea amblia*, se establecieron tres lotes experimentales de temperatura, uno caliente (tratamiento C) con temperatura promedio de 30.26 ± 0.077 °C, uno a temperatura ambiente (tratamiento A) con promedio de 27.68 ± 0.077 °C, y uno frío (tratamiento F) con temperatura promedio de 22.42 ± 0.077 °C.

Simultáneamente, se desarrolló un cultivo con las mismas especies en el medio natural y se comparó la eficiencia de crecimiento y supervivencia entre ambos cultivos. No se observaron diferencias en cuanto al crecimiento y la supervivencia de las esponjas cultivadas a diferentes temperaturas en los sistemas semicontrolados. El volumen de esponja en los sistemas permaneció casi constante durante el periodo de cultivo, registrándose al finalizar, un decremento de -1.03% y un incremento de 34.01% para los tratamientos C y F, respectivamente, de la esponja *M. cecilia* y un incremento de 7.34% y decrementos de -2.55% y -0.42%, para los tratamientos C, A y F, respectivamente, de la esponja *D. amblia* (incrementos o decrementos en relación al volumen inicial). La supervivencia de cada especie fue muy parecida entre los diferentes

tratamientos (42.5% y 65%, para los tratamientos C y F de *M. cecilia* y 100%, 85% y 100% para los tratamientos C, A y F, de *D. amblia*). En cambio, en el cultivo del medio natural, se observó un incremento continuo del volumen de ambas especies, observándose un mayor crecimiento en este sistema (133.54%, para *M. cecilia* y 152.5% para *D. amblia*).

Dysidea amblia, es una esponja que de forma natural incorpora partículas de arena a su tejido, por lo tanto, en un cultivo posterior, se evaluó el efecto de la adición de arena sobre el crecimiento de esta especie. Se establecieron cuatro tratamientos, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sin arena (tratamiento FSA), $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con adición de arena (tratamiento FCA), $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sin arena (tratamiento CSA) y $30 \pm 2^\circ\text{C}$ con adición de arena (tratamiento CCA). Se observó que la adición de arena tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la supervivencia de esta especie. Los tratamientos a los que se les adicionó arena (FCA y CCA) presentaron los porcentajes de supervivencia más altos (90%), comparados con los de los tratamientos sin arena (FSA y CSA), que presentaron valores de 30% y 20%. Con respecto al crecimiento, el tratamiento FCA, fue el único que favoreció en forma positiva el crecimiento, ya que los ejemplares de este tratamiento presentaron un incremento continuo durante el periodo de cultivo, finalizando con un incremento de 40.76%, con respecto al volumen inicial.

El nulo efecto de la temperatura sobre el crecimiento y supervivencia de las esponjas *Mycale cecilia* y *Dysidea* y las diferencias observadas entre los sistemas de cultivo, demostraron que las condiciones fueron más adecuadas en el medio natural que en el sistema semicontrolado. Por otro lado, los buenos resultados observados con la adición de arena sobre el crecimiento de *D. amblia*, sugiriendo la importancia de este parámetro a la hora de planificar el cultivo de especies de este genero.

2. INTRODUCCIÓN

Las esponjas pertenecen al phylum Porifera y son organismos pluricelulares de carácter sésil, de hábitos alimenticios filtradores (Brusca & Brusca, 2003). Cuentan con una organización estructural muy primitiva, pero a pesar de esto, son un grupo de gran éxito evolutivo, ya que se han ramificado en varios miles de especies, con una estimación de 15,000 especies vivas, tanto en hábitats marinos como de agua dulce (Hooper & Van Soest, 2002). A lo largo de su evolución, algunas especies de esponjas han desarrollado mecanismos de defensa contra sus competidores, depredadores y parásitos (Betancourt *et al.*, 1998). Estos mecanismos de defensa consisten fundamentalmente en la producción de metabolitos secundarios, cuyo tipo, concentración y proporción de los mismos depende, en parte, de las condiciones del hábitat y del grado de agresión al que se encuentran sometidas (Thompson *et al.*, 1987; Pawlik, 1993; Unson *et al.*, 1994). Ejemplos de este tipo de metabolitos son la estevensina (Pomponi *et al.*, 1998), producida por la esponja *Teichaxinella morchela* (Wiedenmayer, 1977), y la halichondrina B, producida por la esponja *Lyssodendoryx sp.* (Munro *et al.*, 1999), ambas con propiedades anticancerígenas. El descubrimiento de metabolitos con estas características, ha estimulado el desarrollo de métodos de cultivo de esponjas con la finalidad de producir metabolitos con propiedades farmacológicas (Osinga *et al.*, 1998; Carballo, 2002)

En cierta forma, las esponjas constituyen un recurso biológico desconocido, y su producción controlada no ha alcanzado todavía un grado de desarrollo adecuado por varios motivos. Son organismos muy sensibles al estrés que se produce al someterlas a condiciones de cultivo y además, parece ser muy difícil reproducir las condiciones naturales de luz, corrientes, nutrientes, que necesitan para su desarrollo (Fell, 1967; Kinne, 1977; Barthel, 1991a). Además, las esponjas son organismos muy sensibles a los cambios ambientales (Wilkinson & Vacelet, 1979), y factores como el movimiento del agua, la sedimentación, (Sarà & Vacelet, 1973; Wilkinson & Chesire, 1989) y la temperatura ejercen gran influencia sobre aspectos como la abundancia, el crecimiento y la supervivencia de las mismas (Russell & Winget, 1985; Ávila, 2002). De hecho, el crecimiento de muchas

especies se relaciona de manera directa con las variaciones estacionales de la temperatura (Barthel, 1988 y 1989), y una variación abrupta en este parámetro puede provocar mortalidades masivas (Sarà & Vacelet, 1973).

Actualmente, se conocen pocos estudios relacionados con el cultivo de esponjas, ya sea a nivel experimental (David, 1976; Barthel & Theede, 1986), para producir esponjas para baño (Vacelet, 1985; Verdenal & Vacelet, 1990; Pronzato *et al.*, 1999) o para la producción de metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas (Osinga *et al.*, 1998; Duckworth *et al.*, 1999; Nickel *et al.*, 2001). En la actualidad, solo se producen a escala industrial algunas especies que se utilizan como esponjas de baño (Verdenal & Vacelet, 1990; Pronzato *et al.*, 1999). En ese caso, el cultivo se realiza principalmente en el medio natural (océano abierto, lagunas costeras) (David, 1976; Verdenal & Vacelet, 1990; Duckworth *et al.*, 1997; Duckworth *et al.*, 1999). A pequeña escala se han realizado experimentos en sistemas controlados dirigidos principalmente a estudiar el efecto del suministro de alimento (microalgas) sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas (Barthel & Theede, 1986). También se han realizado experimentos aprovechando la entrada constante de alimento natural a través de la continua renovación del agua (Thomassen & Riisgard-Ulrik, 1995).

Como ya se mencionó antes, la temperatura ejerce gran influencia sobre la abundancia, crecimiento y supervivencia de las esponjas (Russell & Winget, 1985; Ávila, 2002). También se ha demostrado que en forma directa o indirecta la temperatura influye en la producción de metabolitos bioactivos (Thompson *et al.*, 1987; Pawlik, 1993; Unson *et al.*, 1994). Sin embargo, existen muy pocas investigaciones donde se haya estudiado directamente el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de esponjas en condiciones controladas (Barthel & Theede, 1986; Duckworth *et al.* 1997).

La esponja *Dysidea amblia* (de Laubenfels, 1930), pertenece al grupo de las llamadas esponjas córneas. En estas esponjas, a diferencia de otras demosponjas, el esqueleto está formado a base de fibras de espongina articuladas entre sí y no a base de espículas de sílice (Cook & Bergquist, 2002). El

género *Dysidea*, al que pertenece esta especie, tiene la capacidad de capturar pequeñas partículas de arena para incorporarlas como sostén en las fibras de esponjina, y dar un mayor soporte a su estructura esquelética (Shaw, 1927). Además, las partículas de arena que introducen al interior de su cuerpo son de gran importancia para el crecimiento y morfogénesis de este tipo de esponjas (Teragawa, 1986). Por este motivo, uno de nuestros objetivos fue realizar un cultivo en el cual se evaluara el efecto combinado de la temperatura y de la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de esta especie de esponja. Se sabe que muchas esponjas del género *Dysidea* (*D. avara* (Schmidt, 1862), *D. fragilis* (Montagu, 1818), *D. herbacea* (Keller, 1889) producen una gran variedad de metabolitos activos (Sennett, 2001; Steinberg *et al.*, 2001; Cimino & Ghiselin, 2001), por lo tanto, la especie *Dysidea ambliia* también podría ser fuente potencial de éstos. *Dysidea ambliia*, es una especie común en ambientes estuarinos como el estero de Urías, se ha registrado en zonas tropicales y algunas subtropicales del Pacífico este (Dickinson, 1945).

La especie *Mycale cecilia* (de Laubenfels, 1936), es una esponja que se distribuye ampliamente en las aguas tropicales del Pacífico este, en la bahía de Mazatlán y estero de Urías es una especie común (Cruz-Barraza, 2004). Puede adoptar formas incrustantes y masivas, su estructura esquelética esta formada por espículas de sílice, puede presentar colores muy variados que van desde verde amarillento con líneas y pequeñas manchas anaranjadas, o ser anaranjada, desde anaranjado rojizo a rojo claro con líneas y manchas rojas más oscuras, también puede ser azul con manchas anaranjadas (Cruz-Barraza, 2004). *Mycale cecilia* produce metabolitos que presentan actividad contra diferentes líneas celulares cancerígenas (Ortega *et al.*, 2004).

Esta investigación tuvo como objetivo principal estudiar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de dos especies de esponjas, *Dysidea ambliia* y *Mycale cecilia*, en condiciones de confinamiento (cultivos semicontrolados). También se comparó la eficiencia de este cultivo con otro realizado simultáneamente en el medio natural.

3. ANTECEDENTES

Los cultivos de esponjas se realizan con tres propósitos principales: para desarrollar estudios ecofisiológicos (David, 1976; Barthel & Theede, 1986), para la producción de esponjas de baño (Verdenal & Vacelet, 1990; Pronzato *et al.*, 1999), y para la obtención de metabolitos bioactivos (Duckworth *et al.*, 1997; Duckworth *et al.*, 1999; Osinga *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 1999; Nickel *et al.*, 2001). Este último es el principal motivo por el cual se ha intensificado la búsqueda de técnicas y métodos de cultivo para producir esponjas de forma eficiente (Osinga *et al.*, 1998). En este sentido, se han realizado estudios *in vitro* en los que se logró inducir a las células de la esponja *Teichaxinella morchela* para que produjeran el metabolito estevensina, el cual presenta una actividad antitumoral importante (Pomponi *et al.*, 1998). También se han realizado cultivos para estudiar el complejo proceso de regeneración de tejido de ejemplares adultos cuando son fragmentados (Hoffmann *et al.*, 2003).

En muchos de estos casos, los experimentos comienzan con ejemplares adultos, o con pequeños fragmentos obtenidos de ellos (Verdenal & Vacelet, 1990; Duckworth *et al.*, 1997; Duckworth *et al.*, 1999; Pronzato *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 1999; Nava & Yáñez, 2002 y Hoffmann *et al.*, 2003). También se están desarrollando técnicas de cultivo de líneas celulares de esponjas en sistemas cerrados y completamente controlados (Ilan *et al.*, 1996; Osinga *et al.*, 1998; Nickel *et al.*, 2001).

El crecimiento somático ha sido estimado por medio del peso húmedo (Duckworth *et al.*, 1997; Duckworth *et al.*, 1999; Thomassen & Riisgard-Ulrick, 1995), por la cobertura de superficie en las esponjas incrustantes como *Haliclona permollis* (David, 1976), por aproximación a un volumen conocido a través de la medición de sus tres ejes mayores (Verdenal & Vacelet, 1990), por el peso seco y por desplazamiento volumétrico (Thomassen & Riisgard-Ulrick, 1995). Recientemente, utilizando una balanza equipada con un aditamento para pesar objetos bajo el agua, se obtuvo el peso fresco de esponjas cultivadas, sin sacarlas del agua (Osinga *et al.*, 1999). En los cultivos celulares de esponjas el crecimiento se ha

determinado cuantificando el incremento del número de células (Nickel *et al.*, 2001).

Duckworth *et al.*, (1999) compararon la supervivencia de esponjas marinas *Latrunculia brevis* y *Polymastia croceus* sometidas a tres métodos de cultivo en el medio natural sujetándolas a redes, a sogas y atravesándolas con una cuerda de nylon. De éstos, el primer método mostró ser el más adecuado para la supervivencia de ambas especies.

Uno de los factores que parecen afectar a la supervivencia de las esponjas en condiciones de cultivo, es la falta de una alimentación adecuada (Thomassen & Riisgard-Ulrik, 1995). Las esponjas se alimentan principalmente de las bacterias del medio (Reiswig, 1971a,1975; Pile *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1999) y de la materia orgánica en disolución (Reiswig, 1990). La tasa de consumo de material orgánico oscila entre los 29 y 1970 mg C m⁻² d⁻¹, encontrándose dentro del rango de consumo de los moluscos (de 9-3621 mg C m⁻² d⁻¹) (Griffiths & Griffiths, 1978), por lo cual, se puede suponer que las esponjas pueden ocasionar un gran impacto en su hábitat debido al alto consumo de material orgánico que realizan (Ribes *et al.*, 1999). Se ha observado que las esponjas cuentan con un rango de selección de tipos y tamaños de presas (Ribes *et al.*, 1999), que va desde 0.2 hasta <10 µm (Reiswig, 1975; Pile *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1999). También, se han hecho estimaciones de la eficiencia de retención de las esponjas que varía entre 75 y 99 % (Reiswig, 1971a, 1975; Wilkinson, 1978; Pile *et al.*, 1996). Algunos estudios han demostrado que las esponjas filtran grandes volúmenes de agua, más de 1 l por hora por cm³ de su cuerpo (Reiswig, 1971b). Para la especie *Polymastia croceus* se observó que a través de sus ósculos (6.96-8.53 mm² de área) circula más de 8.82 cm³ s⁻¹ de agua (Bell *et al.*, 1999), y en *Haliclona permollis* y *Suberites ficus* se ha observado una eficiencia de retención bacteriana comprendida entre el 70.3 y 77 % (Reiswig, 1975). En cambio, *Polymastia croceus* presenta una eficiencia de más del 94 % cuando se trata de la cianobacteria *Synechococcus* tipo, y más del 88 % cuando se trata de picoeucariontes (Bell *et al.*, 1999).

En condiciones de cultivo se han probado diferentes tipos de alimento: en

sistemas cerrados se han utilizado microalgas (Osinga *et al.*, 1998) o microalgas combinadas con bacterias (Fry, 1971); también se han hecho intentos con alimento comercial para invertebrados marinos (Nickel *et al.*, 2001). Debido a que las esponjas se alimentan de una variedad de partículas suspendidas en el agua (bacterias, microalgas, y materia orgánica), los mejores resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia, se han obtenido cuando las esponjas son alimentadas con mezclas de diferentes microalgas (Fry, 1971), aunque, recientemente, Osinga y colaboradores (2003), demostraron que se pueden obtener muy buenos resultados alimentándolas con cultivos monoespecíficos de microalgas, siempre y cuando, el valor nutricional de la microalga sea suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de la especie cultivada. En sistemas semicerrados y abiertos se ha aprovechado la materia orgánica, microalgas y bacterias presentes en el agua de mar cruda (Poirrier *et al.*, 1981; Barthel & Theede, 1986; Verdenal & Vacelet, 1990; Thomassen & Riisgard-Ulrik, 1995; Duckworth *et al.*, 1997, 1999; Pronzato *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 1999).

Las esponjas marinas son organismos muy sensibles a las variaciones de los factores medioambientales. En aguas estuarinas, la salinidad (Knight & Fell, 1987; Fell *et al.*, 1989; Leamon & Fell, 1990), el pH (Philp, 1999) y el oxígeno disuelto (Sagasti *et al.*, 2000; Sagasti *et al.*, 2001), son factores muy importantes para las esponjas que habitan en ellas. Se ha demostrado, que la resistencia a altos niveles de estrés (altos o bajos niveles de salinidad, oxígeno disuelto, pH, periodos de emersión), es el principal factor que determina la persistencia de algunas poblaciones de esponjas en aguas estuarinas (Carballo *et al.*, en prensa). Entre todos los factores ambientales, la temperatura es uno de los principales reguladores de la abundancia, distribución, reproducción, crecimiento y supervivencia de las esponjas. Barthel (1988 y 1989), observó que el crecimiento de muchas especies de esponjas está relacionado directamente con las variaciones estacionales de la temperatura. Otros autores demostraron que las variaciones abruptas de temperatura pueden provocar mortalidades masivas en las poblaciones naturales de esponjas (Sarà & Vacelet, 1973). Además en muchas otras investigaciones (Thompson *et al.*, 1987; Pawlik, 1993; Unson *et al.*, 1994;

Carballo, 2002), se ha demostrado que la producción de metabolitos bioactivos en las esponjas se relaciona también, en forma directa o indirecta con la temperatura. Sin embargo, existen muy pocas investigaciones en las que se haya estudiado, en condiciones controladas de cultivo, el efecto directo de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de esponjas. Los más importantes son el realizado por Barthel & Theede (1986) en el que se cultivó *Halichondria panicea* a 5 diferentes temperaturas (0, 5, 10, 15 y 20 °C) observándose un mayor crecimiento (determinado mediante el incremento de materia orgánica de la esponja, MO= peso seco - peso de las cenizas) a las temperaturas de 10 y 15°C, y el realizado por Duckwort *et al.* (1997), quienes bajo condiciones de cultivo en el laboratorio, evaluaron el efecto de la temperatura (14 y 19°C) sobre la cicatrización (determinada como disminución del tamaño de la herida con respecto al tiempo) de fragmentos de la esponja *Psammocinia hawere*, registrando una más rápida regeneración del pinacodermo en la zona dañada por el corte, a 14°C. Los mismos autores en un cultivo con fragmentos de la misma especie pero en el medio natural, observaron que las tasas de regeneración del pinacodermo en la zona dañada por el corte son mayores en invierno.

4. HIPÓTESIS:

4.1. Hipótesis 1

Si la temperatura es un factor que ejerce gran influencia sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas (Wilkinson & Vacelet, 1979; Russell & Winget, 1985; Barthel, 1989), se esperaría observar diferencias significativas en el crecimiento y en la supervivencia de las esponjas cultivadas a diferentes temperaturas.

4.2. Hipótesis 2

Las esponjas del género *Dysidea*, incorporan partículas de arena de forma natural a sus estructuras esqueléticas (fibras de espongina) (Shaw, 1927). Estas partículas son de gran importancia para el crecimiento y morfogénesis en esponjas de este tipo (Teragawa, 1986). Por lo tanto, se esperaría observar un efecto positivo en el crecimiento y supervivencia de las esponjas al adicionarles arena.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y sobre la supervivencia de las esponjas *Dysidea amblia* y *Mycale cecilia* en sistemas de cultivo experimentales.

5.2. Objetivos específicos:

1.- Evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas *Dysidea amblia* y *Mycale cecilia*.

2.- Comparar la supervivencia y el crecimiento de las esponjas *Dysidea amblia* y *Mycale cecilia*, en un sistema de cultivo semicontrolado y en un sistema de cultivo en el medio natural.

3.- Estudiar el efecto de la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de la esponja *Dysidea amblia*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cultivos auxiliares para el suministro de alimento

6.1.1. Cultivo de bacterias

La producción de bacterias se realizó en recipientes cilindro-cónicos de 10 l de capacidad, provistos de un sistema de agitación continua por burbujeo desde el fondo. A cada uno de ellos se le agregó 9 l de agua de mar y 4.5 g de levadura de pan (0.5 g l^{-1}) para inducir el crecimiento bacteriano a partir de las propias bacterias presentes en el medio (Fig. 1).

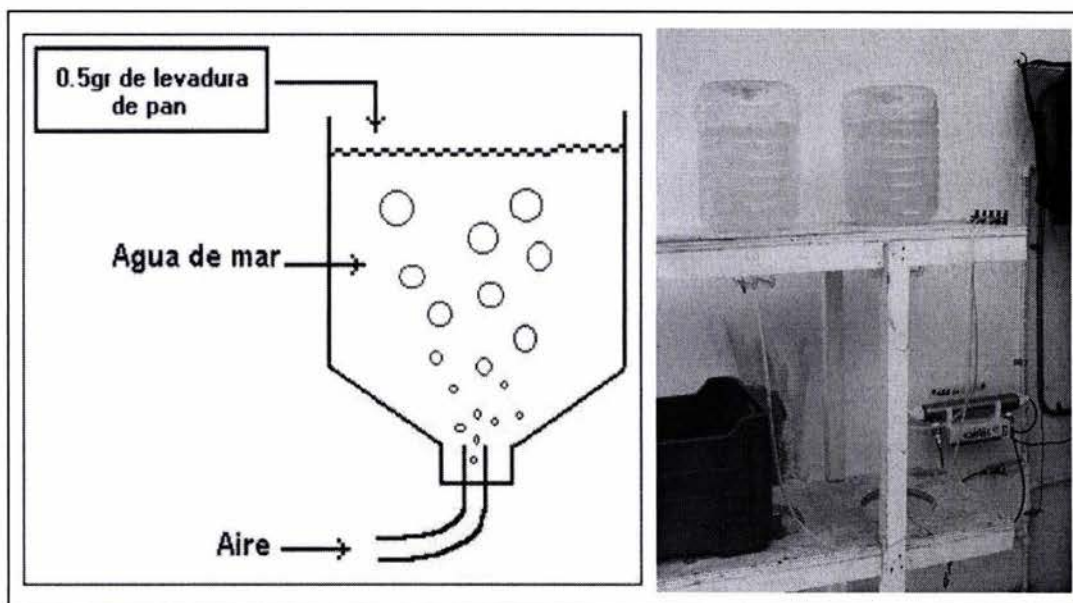


Fig. 1. Esquema del sistema utilizado para la producción de bacterias

Una vez transcurridos 4-5 días, el agua de estos recipientes se pasó por una lámpara UV y se utilizó para alimentar a las esponjas. Es importante mencionar que se tuvieron varios de estos tanques en funcionamiento, pero en diferentes fases de crecimiento, así se garantizó que nunca faltara el alimento. Con este sistema se produce una población bacteriana importante que puede actuar como principal fuente de alimento para las esponjas, como se ha comprobado en trabajos anteriores (Fry, 1971), además de proveer materia orgánica en disolución por la descomposición de las propias levaduras. Tampoco se descarta que las

esponjas pudieran consumir directamente a las propias levaduras ya que el tamaño de las mismas ($5\ \mu\text{m}$), entra en el rango óptimo para su consumo por las esponjas (Reiswig, 1975; Bell *et al.*, 1999).

6.1.2. Cultivo de microalgas

Se cultivaron las especies *Tetraselmis sp.* ($6.27\ \mu\text{m}$ de diámetro promedio) e *Isochrysis sp.* ($3.85\ \mu\text{m}$ de diámetro promedio). El cultivo se realizó en recipientes cilíndricos de plástico con capacidad de 20 l, provistos de un sistema de agitación continua por burbujeo desde el fondo. A cada uno se le agregó 16 l de agua de mar enriquecida con medio de cultivo F de Guillard (1973) (Tabla. I), y 2 l de cepa de microalgas concentrada (Fig. 2). Posteriormente se mantuvieron en un cuarto iluminado a $23^\circ\ \text{C}$ de temperatura.

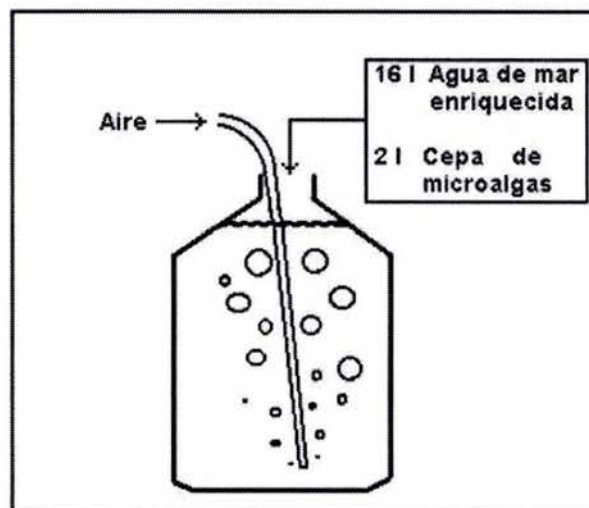


Fig.2. Esquema del sistema utilizado para la producción de microalgas

Las microalgas se utilizaron cuando tenían una densidad de $1 \times 10^6\ \text{cel ml}^{-1}$ para el caso de *Tetraselmis sp.* y de $3 \times 10^6\ \text{cel ml}^{-1}$ para el caso de *Isochrysis sp.* Esta densidad la alcanzaban aproximadamente después de 5 días. Periódicamente se hicieron desdobles de los cultivos renovando el agua de los recipientes con agua de mar enriquecida con medio F de Guillard, para mantener una cantidad suficiente de alimento. Este tipo de sistema de cultivo, en el que se reemplaza parte del agua del cultivo por agua enriquecida nueva (desdobles periódicos), se

conoce como cultivo en continuo (Barnabé, 1991).

Para enriquecer el agua de mar con el medio F de Guillard, se utilizó 1 ml de cada una de las soluciones de nutrientes principales y 1 ml de cada una de las soluciones secundarias descritas en la Tabla I, por cada litro de agua de mar, previamente filtrada con luz ultravioleta.

Tabla I. Composición química del medio de cultivo F de Guillard.

Nutrientes principales	Fórmula	Cantidad y volumen a aforar
Sol. de Nitrato de Sodio	NaNO ₃	150gr aforado a 1l
Sol. de Fosfato de Sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	10gr aforado a 1l
<i>Metales Traza</i>		
Solución primaria		Cantidad y volumen a aforar
Sol. de Cloruro Manganoso	MnCl ₂ .4H ₂ O	36gr aforado a 100ml
Sol. de Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	2gr aforado a 100ml
Sol. de Sulfato Cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.96gr aforado a 100ml
Sol. de Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.4gr aforado a 100ml
Sol. de Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.26gr aforado a 100ml
Solución secundaria		gl⁻¹
Cloruro férrico	FeCl ₂ .6H ₂ O	6.3
EDTA disódico	Na ₂ EDTA	8.7
Metales Traza	Agregar 1ml de cada una de las soluciones primarias	
<i>Vitaminas</i>		
Solución primaria		Cantidad y volumen a aforar
Sol. de Biotina cristalizada	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.1gr aforado a 1l
Sol. de Cianocobalamina	C ₁₀ H ₈₈ CoN ₁₄ P	1gr aforado a 1l
Sol. de Tiamina clorhídrica	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	0.2gr aforado a 1l
Solución secundaria	Tomar 10 ml de cada solución primaria y aforar a 1l	

6.2. Descripción de los sistemas de cultivo

6.2.1. Sistema de cultivo semicontrolado

Los sistemas de cultivo semicontrolados son cajas de plástico de 49 x 33 x 22 cm con capacidad de 36 l. Las cajas se acondicionaron con un sistema de aireación "air-lift", el cual consistió en tubos de PVC dentro de los que se producía un burbujeo que elevaba y succionaba el agua del fondo y la expulsa por la parte superior del tubo. Los tubos se orientaron de tal forma que se favoreció una circulación de agua vertical y horizontal que ayudó a tener una buena distribución del alimento y mantuvo bien oxigenada el agua del sistema. Sobre el fondo de las cajas se colocó un soporte plástico en forma de malla sobre la que se dispusieron las esponjas previamente sujetas a sustratos artificiales (Fig.3). Los sustratos artificiales son azulejos de cerámica a los cuales se fijaron los ejemplares de esponjas mediante un hilo monofilamento de nylon.

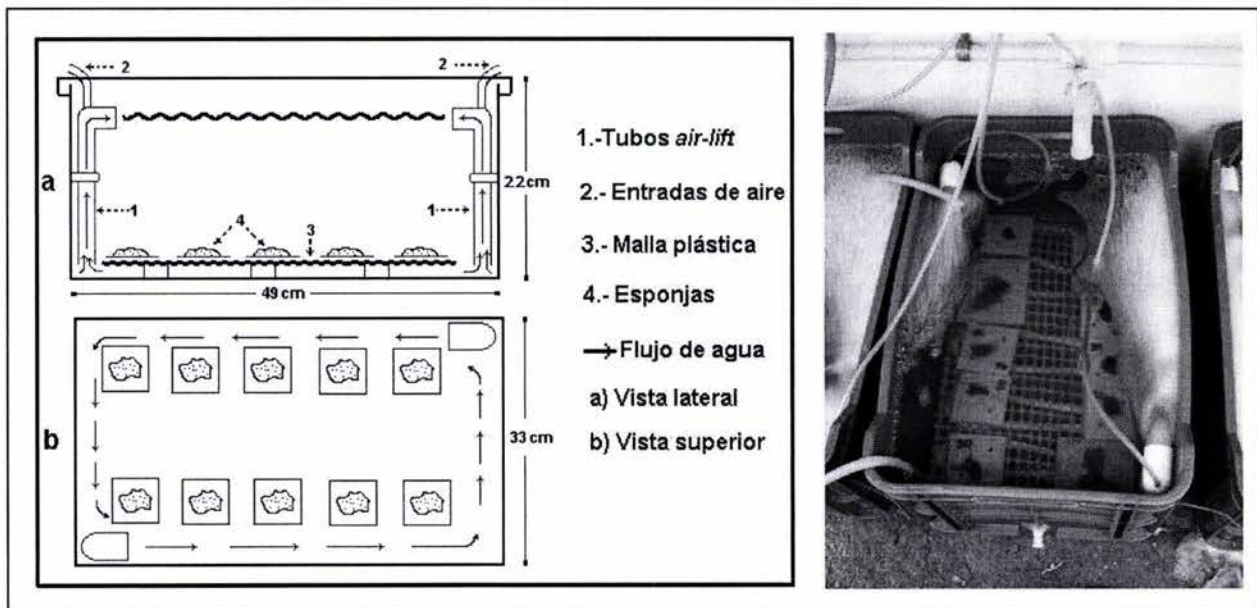


Fig. 3. Sistema de cultivo semicontrolado y circulación de agua en su interior.

Para mantener la temperatura del agua de los sistemas de cultivo por encima de la temperatura ambiente, se utilizaron calentadores de agua. Para mantener la

temperatura por debajo de la temperatura ambiente, se utilizó un intercambiador de calor al cual se adaptó un serpentín plástico por el que circula líquido (solución 3:1 de etilenglicol y agua) a baja temperatura. Estos serpentines se introdujeron en las cajas enfriando y manteniendo el agua a la temperatura requerida (Fig. 4).

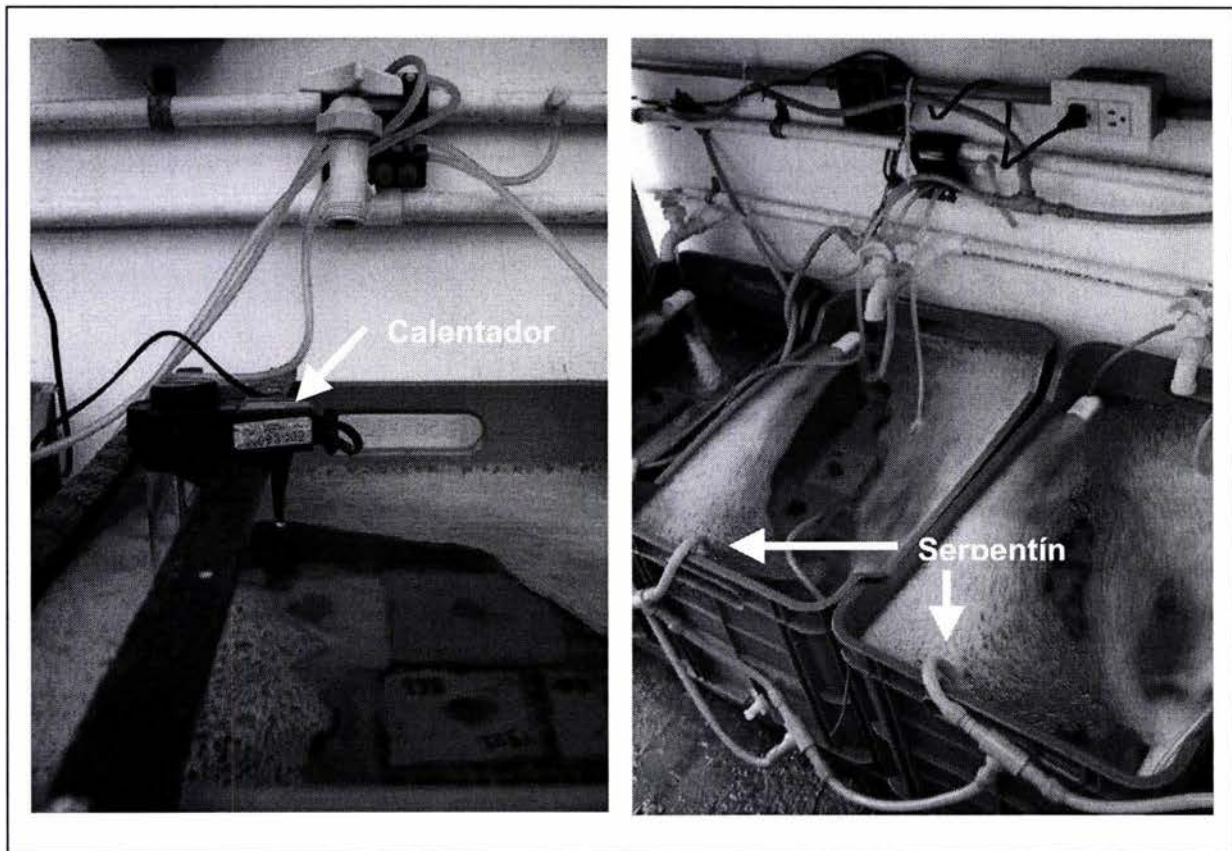


Fig. 4. Sistemas de enfriamiento y calentamiento de las cajas de cultivo.

El agua de mar utilizada en los sistemas de cultivos de esponjas y también en los cultivos auxiliares (producción de alimento) descritos anteriormente, fue bombeada desde un pozo artesiano ubicado en la estación de la Unidad Académica Mazatlán-UNAM, y almacenada en un depósito. Desde este depósito se abasteció a los cultivos haciendo pasar el agua por un filtro de sólidos de 0.45 μm de abertura, que evitó que partículas grandes de arena y sedimentos llegaran hasta los cultivos.

6.2.2. Sistema de cultivo en el medio natural

Como soporte de cultivo se utilizaron mallas plásticas de 1.60 m de largo por 0.50 m de ancho, suspendidas a 1.5 metros de la superficie y 2 metros del fondo (Fig. 5).

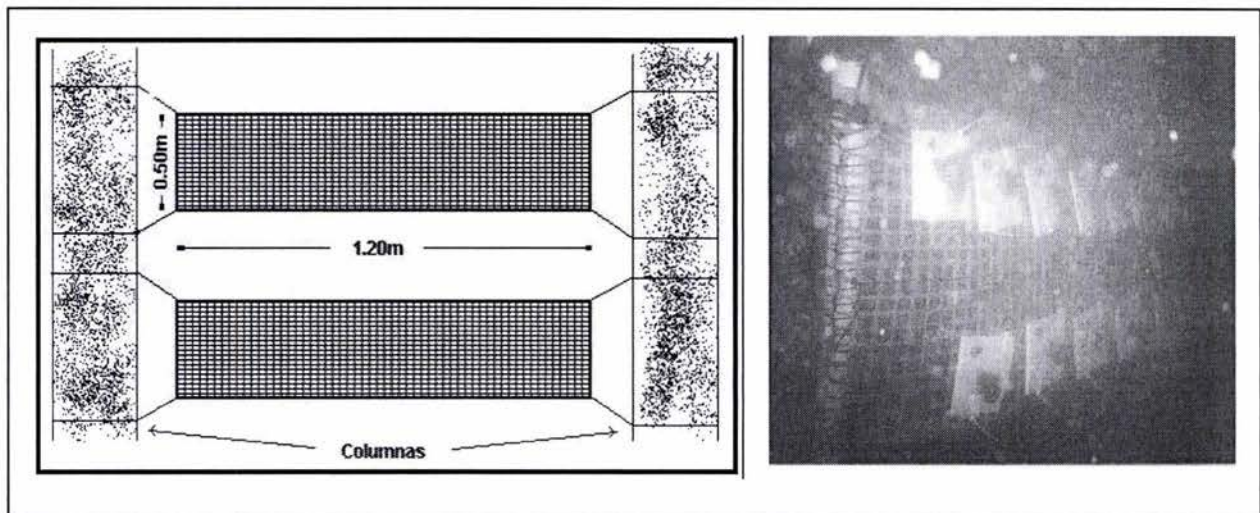


Fig. 5. Sistema de cultivo utilizado en el medio natural (estero de Urías)

Las mallas se colocaron paralelas a la costa sujetándose a columnas de concreto bajo el pantalán abandonado ubicado en las cercanías del embarcadero del trasbordador comercial API en el estero de Urías Sinaloa, México (Fig. 6).

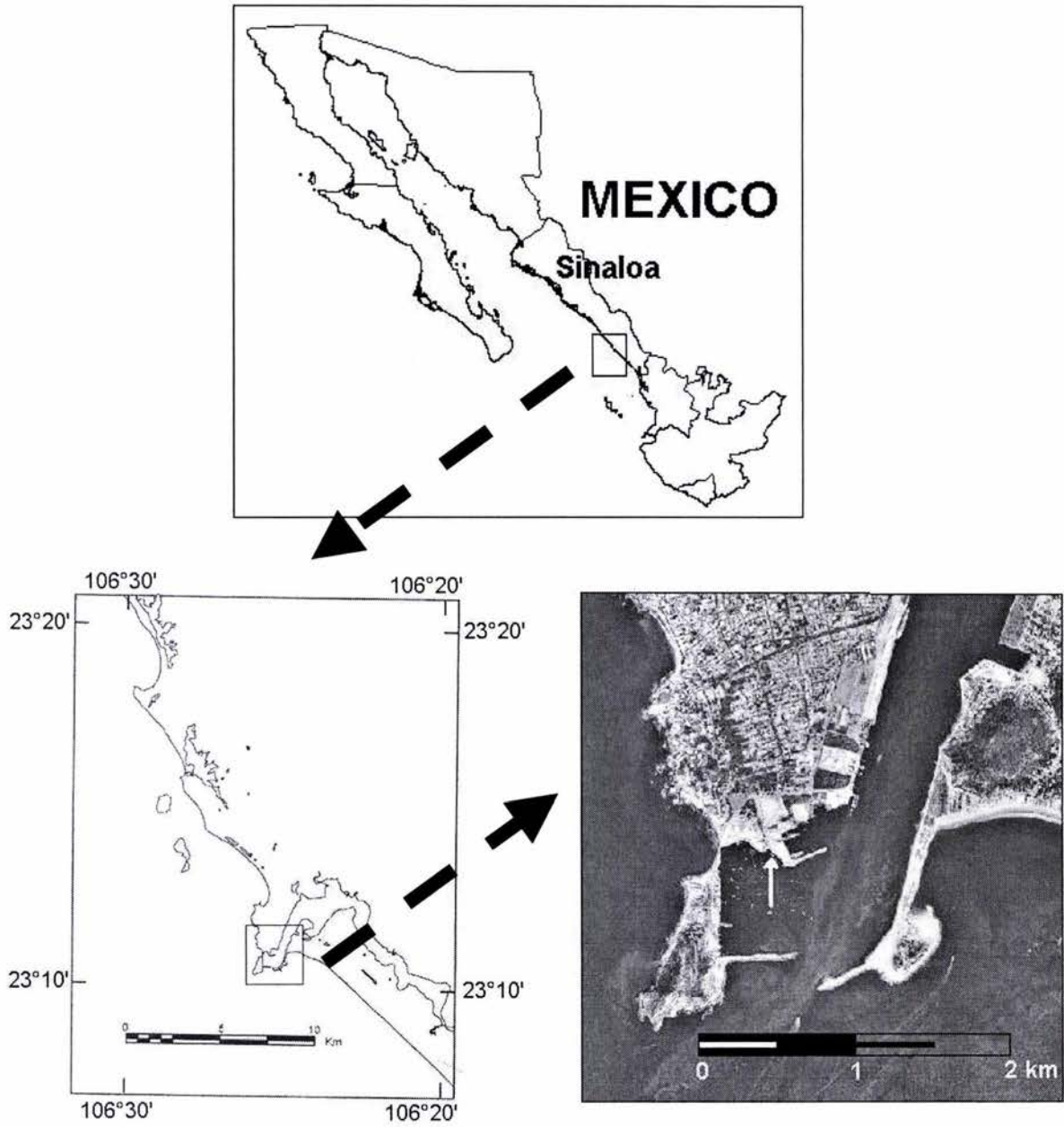


Fig. 6. Ubicación de los sistemas de cultivo en el medio natural (estero de Urías).

6.3. Obtención de los ejemplares, fijación a los sustratos artificiales y traslado a los sistemas de cultivo

Mediante buceo autónomo se recolectaron 160 ejemplares, 80 de la especie *Mycale cecilia*, con un tamaño promedio de 11.5 cm³ y 80 de la especie *Dysidea amblia*, con un tamaño promedio de 17.4 cm³. Estos tamaños son pequeños, aproximadamente un 5 y 10%, *M. cecilia* y *D. amblia*, respectivamente, del tamaño máximo que alcanzan estas especies (Observaciones personales). Los ejemplares se fijaron sobre sustratos artificiales (azulejos) numerados, los cuales se dejaron sumergidos en agua marina durante algunos días antes de ser utilizados para limpiarlos de sustancias que pudieran ser perjudiciales para las esponjas. Posteriormente, los azulejos se colocaron sobre una malla previamente fondeada en el medio natural hasta que los ejemplares se adhirieron a los azulejos; esto ocurrió entre 5 y 9 días. Una vez adheridos se procedió a trasladarlos a sus respectivos sistemas de cultivo. Los ejemplares que se cultivaron en los sistemas instalados en el Instituto de Ciencias del mar y Limnología se trasladaron en recipientes llenos con agua desde el sitio de recolección. Los ejemplares se colocaron en sus respectivos lugares dentro de las cajas de cultivo, que se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta que se observó que las esponjas filtraban (8 días). Es evidente cuando las esponjas filtran, ya que, mantienen abiertos sus ósculos. Posteriormente se procedió a incrementar o disminuir la temperatura del agua hasta alcanzar las temperaturas experimentales. Este proceso duró una semana (8 días), intentando que el cambio de temperatura fuera como máximo de 1° C por día. El periodo de aclimatación de 17 días que se les dio a los ejemplares (9 días en el medio natural y 8 días más en las cajas de cultivo), antes de iniciar a incrementar o disminuir las temperaturas en las cajas de cultivo fue muy importante, ya que las esponjas, después de ser transplantadas, presentan un periodo (que puede ser hasta de un mes) en el que dejan de filtrar, detienen su crecimiento e incluso reducen su tamaño debido al gasto energético que se deriva de la regeneración y reorganización de sus sistemas acuíferos (Pronzato *et al.*, 1999; Nava & Yáñez, 2002).

Para el caso del sistema del medio natural, los ejemplares se colocaron inmediatamente en su sitio sobre la malla plástica después de ser recolectados. Toda la manipulación de los organismos se hizo manteniéndolos sumergidos en agua y sin exponerlos al aire. Esto con la finalidad de evitar provocar mayor estrés a los organismos, que el ya provocado por el traslado.

6.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de las esponjas *Mycale cecilia* y *Dysidea amblia* (cultivo semicontrolado y cultivo en el medio natural).

6.4.1. Diseño experimental

6.4.1.1. Cultivo semicontrolado.

Se utilizaron doce de los sistemas anteriormente descritos (cajas de cultivo), dos réplicas de cada tratamiento para cada especie. En las cajas de *Mycale cecilia*, las temperaturas fueron: $30.1 \pm 0.097^{\circ}\text{C}$ (promedio \pm error estándar), para el tratamiento C (caliente); $28.9 \pm 0.097^{\circ}\text{C}$, en el tratamiento A (temperatura Ambiente), y $21.8 \pm 0.089^{\circ}\text{C}$ en el tratamiento F (fría). En las cajas de *Dysidea amblia* fueron: $30.3 \pm 0.077^{\circ}\text{C}$, en el tratamiento C; $27.7 \pm 0.077^{\circ}\text{C}$, para el tratamiento A y $22.4 \pm 0.077^{\circ}\text{C}$, en el tratamiento F. Se eligieron estas temperaturas experimentales, debido a que están dentro del intervalo anual de temperatura de la bahía de Mazatlán y estero de Urías (32 y 16°C). Las cajas se llenaron con agua de mar a 36 ‰ de salinidad, y en cada una de ellas se colocaron 10 ejemplares de esponjas (Fig. 7).

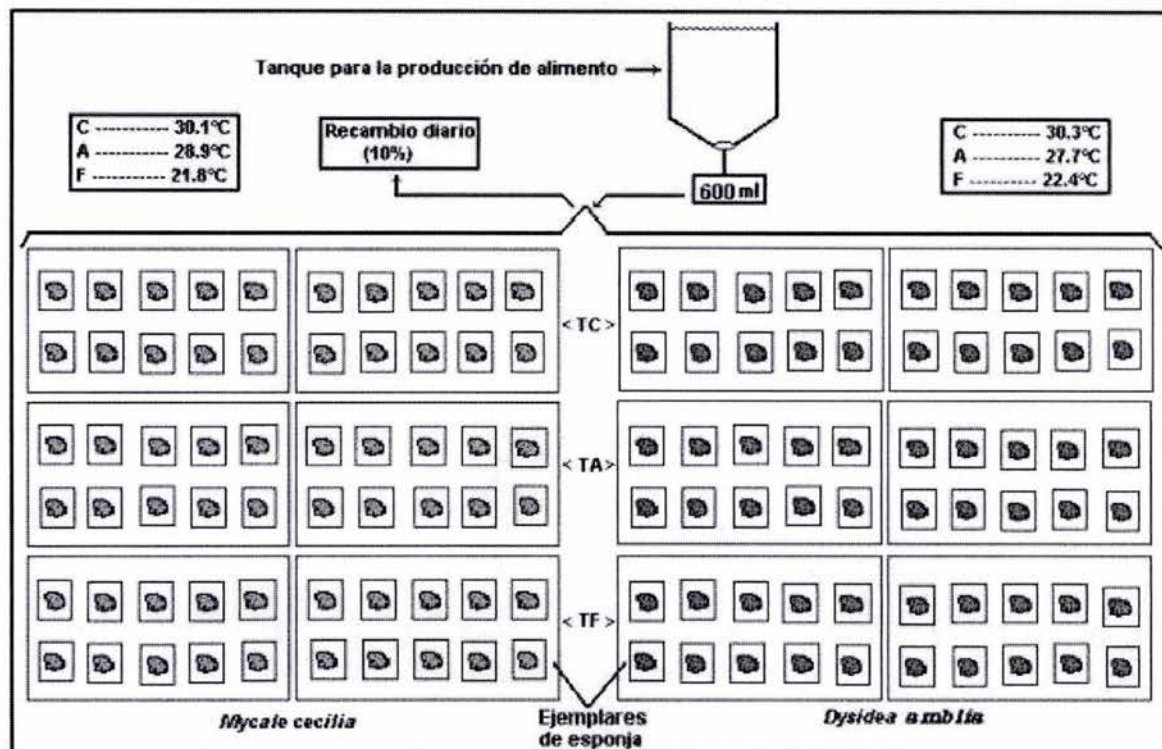


Fig. 7. Esquema de la unidad experimental sistema semicontrolado.

A cada caja se le realizó un recambio de agua diario del 10 % (3.6 l) con el fin de evitar el acumulamiento de productos metabólicos de desecho y de otros elementos nocivos. Diariamente y durante los primeros 15 días, se añadió como alimento 600 ml de agua de un cultivo de bacterias y 600 ml de un cultivo de microalgas de la especie *Tetraselmis sp.* a una densidad aproximada de 1×10^6 cel ml^{-1} y 600 ml de otro cultivo de microalgas de la especie *Isochrysis sp.* a una densidad aproximada de 3×10^6 cel ml^{-1} en cultivo exponencial. El alimento se repartió en tres tomas a lo largo del día. Posteriormente, se incrementó la cantidad de alimento: 1000 ml diarios de cada cultivo auxiliar a partir de la segunda quincena y 1500 ml diarios a partir de la tercera quincena y hasta el final del experimento. El experimento se llevó a cabo en semioscuridad cubriendo las cajas con malla sombreadora. Diariamente se registraron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto) y mensualmente los poblacionales (crecimiento y supervivencia). La pérdida de agua e incremento de salinidad de las

cajas por efecto de la evaporación, se contrarrestaba periódicamente adicionando agua salada o dulce hasta que regresaba a los niveles normales de salinidad (36 ‰). El cultivo se mantuvo durante 2 meses.

6.4.1.2. Cultivo en el medio natural

Para realizar este cultivo se utilizaron dos mallas plásticas (antes descritas), sobre las cuales se colocaron 10 ejemplares de cada especie (Fig. 8).

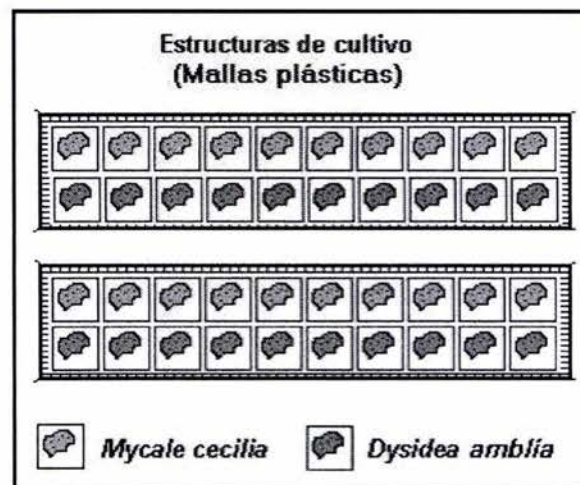


Fig. 8. Esquema de la unidad experimental sistema del medio natural.

En este cultivo se aprovechó el alimento natural del propio sistema como suministro alimenticio. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto) y poblacionales (crecimiento y supervivencia) se registraron mensualmente. Normalmente, los muestreos se realizaron entre 10 de la mañana y 12 de la tarde. Este cultivo tuvo una duración de dos meses.

6.4.2. Parámetros poblacionales

Inicialmente se planteo registrar los parámetros poblacionales (supervivencia y crecimiento) quincenalmente, pero cuando se hizo la primera medición (15 días después de iniciada la experiencia), se decidió incrementar el periodo entre muestreos a un mes, debido a que quincenalmente prácticamente era indetectable

el crecimiento. De esta manera, además se redujo el estrés producido por los muestreos para el control del crecimiento. El crecimiento se obtuvo midiendo el volumen (en cm^3) de los ejemplares, mediante desplazamiento volumétrico y se expresó como volumen promedio \pm error estándar en cada tratamiento. Para esto, los ejemplares se introducían en un recipiente graduado, el cual contenía un volumen conocido de agua de mar. Cuando un ejemplar se introducía en el recipiente el nivel del agua aumentaba. Entonces, se extraía agua hasta que el nivel quedara como estaba antes de introducir el ejemplar, y posteriormente se media en una probeta. Este procedimiento no produce mortalidad, al menos en la esponja *Dysidea ambli*, ya que se ha comprobado que esta esponja puede aguantar más de 10 minutos fuera del agua sin síntomas de mortalidad (datos no publicados). La supervivencia se estimó contando los ejemplares vivos y calculando que porcentaje del número inicial de ejemplares representaban éstos, se expresó como supervivencia promedio \pm error estándar.

6.4.3. Parámetros ambientales

En el medio natural, el registro de oxígeno disuelto, pH y temperatura se realizó utilizando una sonda "Hydrolab Modelo SURVEYOR 4a" (con precisión de ± 0.01 unidad). La salinidad se registró con un refractómetro de campo marca SPER SCIENTIFIC (con precisión de $\pm 1\%$). En los sistemas semicontrolados la temperatura puntual se registró con termómetros de mercurio (marca Aquarama con precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$); el oxígeno disuelto, pH y salinidad, se registraron de igual manera que en el medio natural. La oscilación mensual de temperatura se registró utilizando termómetros de máxima y mínima (marca Brannan con precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$) ubicados permanentemente en ambos sistemas de cultivo (medio natural y sistemas semicontrolados).

6.5. Efecto de la interacción de la temperatura y la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de la esponja *Dysidea amblia* en condiciones de cultivo semicontroladas.

6.5.1. Diseño experimental

En este cultivo se trabajó con los ejemplares de *Dysidea amblia* del experimento anterior. Este experimento se realizó en los sistemas semicontrolados ya descritos (cajas de cultivo). Se establecieron cuatro tratamientos, con dos réplicas de cada uno, los cuales fueron $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sin arena (tratamiento FSA), $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con adición de arena (tratamiento FCA), $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sin arena (tratamiento CSA) y $30 \pm 2^\circ\text{C}$ con adición de arena (tratamiento CCA). En cada una de las cajas (réplicas) se colocaron 5 ejemplares de esponja (Fig. 9). La arena adicionada tenía un tamaño promedio de partícula de $54.5 \mu\text{m}$, (intervalo: $16.6 - 149.4 \mu\text{m}$), ésta se adicionaba en pequeñas cantidades, procurando que la superficie de la esponja se cubriera con una fina capa.

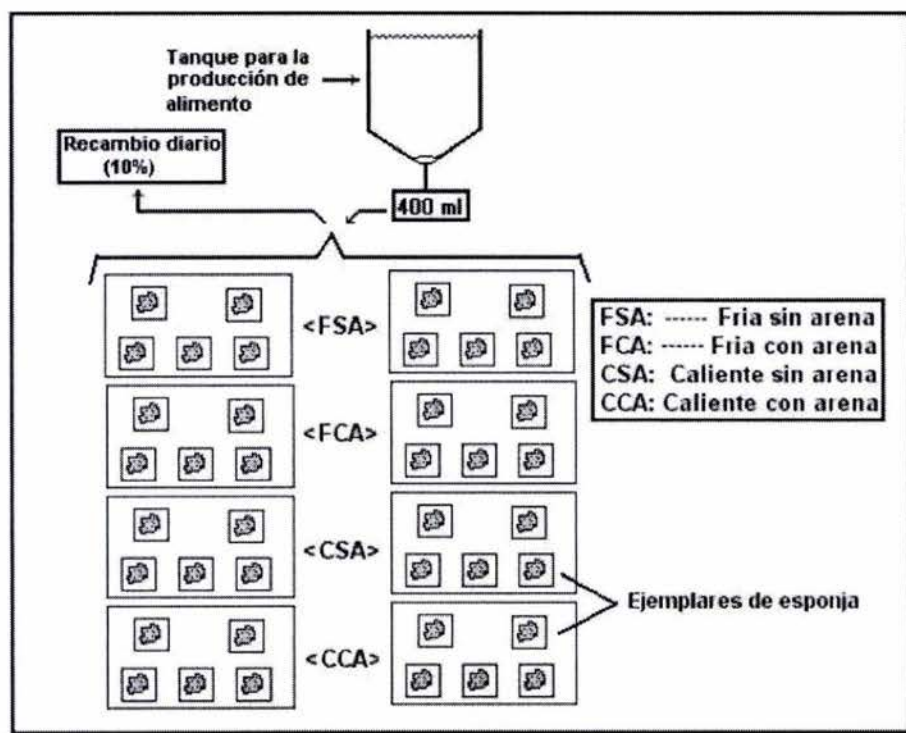


Fig. 9. Esquema de la unidad experimental sistema semicontrolado (cultivo con arena).

De la misma manera que en el cultivo anterior y con la finalidad de evitar el acumulación de productos metabólicos de desecho y otros elementos nocivos, a cada caja se le realizó un recambio de agua diario del 10% (3.6 l). Durante los primeros 15 días, se añadió diariamente 1000 ml de cualquiera de los dos cultivos de microalgas (*Tetraselmis sp.* o *Isochrysis sp.*) antes mencionados, dependiendo de cual de los cultivos de microalgas se encontraban con la densidad que requeríamos (1×10^6 cel ml^{-1} , en el caso de *Tetraselmis sp.* y 3×10^6 cel ml^{-1} , en el caso de *Isochrysis sp.*), para ser utilizados como alimento. Posteriormente, a partir de la segunda quincena y hasta el final del cultivo se adicionaron 1500 ml de alimento. En ésta cultivo, las cajas también se cubrieron con una malla sombreadora. Al igual que en el cultivo anterior, se mantuvo un monitoreo diario de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad) y mensual de los poblacionales (crecimiento y supervivencia).

La disminución del nivel del agua de las cajas y el incremento de la salinidad por efecto de la evaporación, fueron corregidos también de la misma manera. La estimación de los parámetros poblacionales se realizó siguiendo la misma metodología del primer cultivo y el experimento también tuvo una duración de dos meses.

6.6. Tratamiento de la información.

En el primer cultivo, para comprobar si hubo diferencias entre las temperaturas experimentales a las que se mantuvieron los sistemas semicontrolados, se hizo un análisis de varianza de una vía con tres niveles (tres temperaturas).

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para determinar si había diferencias significativas del crecimiento a diferentes temperaturas. En el caso de la supervivencia, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Previamente se comprobó la normalidad, test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de los datos test de Cochran's (Krebs, 1989).

En el segundo cultivo se utilizaron las mismas pruebas estadísticas, análisis de varianza de una vía y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para determinar si había diferencias del crecimiento y la supervivencia respecto de la temperatura y la adición de arena.

La variación de las diferencias entre los tratamientos (diferentes temperaturas, con o sin adición de arena) se analizó posteriormente con la prueba de Tukey (Sokal & Rohlf, 1981). También previamente se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos.

La comparación de crecimiento entre los sistemas de cultivo (semicontrolado y medio natural), se realizó mediante un análisis de varianza de una vía. La variación de las diferencias entre los sistemas de cultivo se examinó mediante un análisis de rango múltiple Newman-Keuls.

La comparación de supervivencia entre los sistemas de cultivo se realizó mediante el análisis de Kruskal-Wallis.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia

7.1.1. Parámetros físico químicos

En los sistemas semicontrolados las temperaturas fueron muy similares durante el periodo de aclimatación (entre 26 y 30 °C). A finales de este periodo (29 de junio al 15 de julio) y hasta el 8 de agosto, las temperaturas fueron controladas y se establecieron los lotes experimentales. En el caso de la esponja *Mycale cecilia*, solo se lograron separar de manera significativa dos lotes experimentales de temperatura ($F = 2351$; $p < 0.0001$). Uno caliente que se mantuvo a una temperatura promedio de 30.1 ± 0.097 °C, y uno frío que se mantuvo a 21.8 ± 0.088 °C (promedio \pm error estándar).

En cambio, en los experimentos con *Dysidea amblia*, se lograron separar de forma significativa los tres lotes experimentales de temperatura ($F = 2687.312$; $p < 0.0001$). Uno caliente (C) con temperatura promedio de 30.26 ± 0.077 °C, uno a temperatura ambiente (A) con promedio de 27.68 ± 0.077 °C, y uno frío (F) con temperatura promedio de 22.42 ± 0.077 °C.

La salinidad osciló entre 36 y 37.5 ‰ en los tratamientos de ambas especies *M. cecilia* y *D. amblia*. El oxígeno disuelto osciló entre 8.14 y 11.54 mg l⁻¹, el pH entre 7.62 y 8.17, en los tratamientos de *M. cecilia*. En los tratamientos de *D. amblia*, la oscilación del oxígeno disuelto fue entre 8.04 y 11.81 mg l⁻¹ y la del pH fue entre 7.75 y 8.15 (Tabla II).

En el estero de Urías, la temperatura osciló entre 28 y 33 °C, con un promedio de 30.96 °C. Por otra parte, la salinidad se mantuvo constante en 35 ‰, el oxígeno disuelto fluctuó entre 4.9 y 6.3 mg l⁻¹, con un promedio de 5.71 mg l⁻¹ y el pH fluctuó entre 7.9 y 8.03, con un promedio de 7.98 (Tabla III).

Tabla II. Parámetros ambientales registrados en los sistemas semicontrolados durante el periodo de cultivo.

Parámetro	Valor	Tratamiento				
		M. cecilia		D. amblia		
		C	F	C	A	F
O ₂ mg l ⁻¹	Máxima	11.31	11.54	10.84	10.44	11.81
	Mínima	8.14	8.16	8.3	8.04	8.52
	Promedio	9.45	10.27	9.25	9.35	10.28
	Error estándar	0.24	0.10	0.20	0.15	0.07
pH	Máxima	8.17	8.01	8.21	8.15	7.97
	Mínima	7.69	7.62	7.98	7.94	7.75
	Promedio	8.05	7.92	8.11	8.07	7.89
	Error estándar	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
S‰	Máxima	37	37.5	37	37.5	37
	Mínima	36	36	36	36	36
	Promedio	36	36	36.5	36.5	36
	Error estándar	0	0	0.03	0.02	0.02

Tabla II. Parámetros ambientales registrados en el estero de Urias durante el periodo de cultivo.

Parámetro	T°C	O ₂ mg l ⁻¹	pH	S‰
Máxima	30.11	6.3	8.03	35
Mínima	31.76	4.9	7.9	35
Promedio	30.96	5.71	7.98	35
Error Estándar	0.58	0.52	0.05	0

7.1.2. Parámetros poblacionales (crecimiento y supervivencia)

En los sistemas semicontrolados no hubo diferencias significativas en el crecimiento de la esponja *Mycale cecilia* en relación a la temperatura ($F = 0.013$; $p = 0.9$). El volumen promedio se mantuvo casi constante durante todo el periodo de cultivo en los dos tratamientos (C y F). En el tratamiento C (30.1 ± 0.097 °C) el volumen promedio inicial fue de 12.10 ± 0.41 cm³ (promedio \pm error estándar) y el final de 11.98 ± 2.72 cm³, presentando un decremento de -0.12 cm³, que representó el -1.03% del volumen inicial. En el tratamiento F (21.83 ± 0.088 °C), el

volumen inicial fue de $10.40 \pm 0 \text{ cm}^3$ y el final de $13.94 \pm 2.74 \text{ cm}^3$, presentando un incremento de 3.54 cm^3 que representó el 34.01 % del volumen inicial (Fig. 10). La supervivencia tampoco presentó diferencias significativas respecto de la temperatura ($p > 0.05$), los valores registrados fueron $42.5 \pm 21.79 \%$ y $65 \pm 21.21 \%$ (promedio \pm error estándar), para los tratamientos C y F respectivamente.

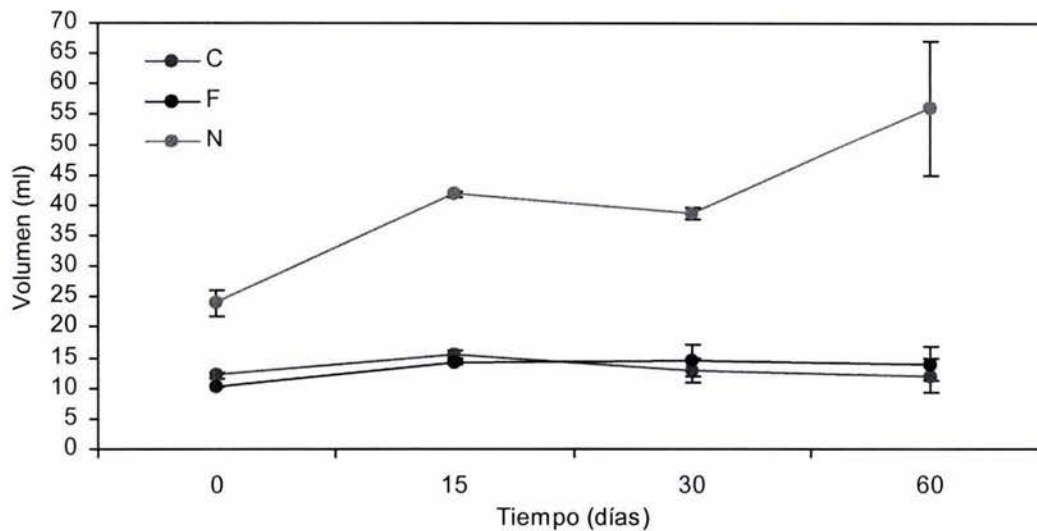


Fig. 10. Variación del volumen promedio de la esponja *Mycale cecilia* durante el periodo de cultivo en el estero de Urías (N) y en los sistemas semicontrolados: C = Tratamiento mantenido a $30.1 \pm 0.097^\circ\text{C}$ y F = Tratamiento mantenido a $21.83 \pm 0.088^\circ\text{C}$. Las líneas verticales indican el error estándar.

En el estero de Urías, la esponja *Mycale cecilia* se adhirió rápidamente (5 días) a las superficies experimentales, y creció durante todo el periodo de cultivo. Su volumen promedio inicial fue $23.97 \pm 2.16 \text{ cm}^3$ (promedio \pm error estándar) y el final fue de $55.98 \pm 11.13 \text{ cm}^3$, presentando un incremento de 32.01 cm^3 , que representó un 133.54 % con respecto al volumen inicial (Fig. 10).

La supervivencia de *Mycale cecilia* fue del $95 \pm 7.07 \%$ en el cultivo del medio natural.

En el caso de *Dysidea amblia*, tampoco hubo diferencias significativas en el crecimiento en relación a la temperatura en los sistemas semicontrolados ($F = 0.463$; $p = 0.6356$). El volumen se incrementó durante el primer mes de cultivo, pero durante el segundo mes disminuyó en todos los tratamientos. En el

tratamiento C (30.26 ± 0.077 °C), el volumen promedio inicial fue de 16.70 ± 0.08 cm³ y el final de 17.93 ± 0.22 cm³, presentando un incremento de 1.22 cm³, que representó el 7.34 % respecto del volumen inicial. En el tratamiento A (27.68 ± 0.077 °C), el volumen promedio inicial fue de 17.65 ± 0.37 cm³ y el final de 17.20 ± 1.06 cm³, presentando un decremento de -0.45 cm³, representando el -2.55 % respecto del volumen inicial. En el tratamiento F (22.42 ± 0.077 °C), el volumen promedio inicial fue de 17.95 ± 0.45 cm³ y el final de 17.88 ± 1.45 cm³, presentando un decremento de -0.07 cm³, que representó el -0.42 % respecto del volumen inicial (Fig. 11).

En este caso tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la supervivencia respecto de la temperatura, los valores registrados fueron 100 ± 0 % para los tratamientos C y F, y 85 ± 21.21 % para el tratamiento A.

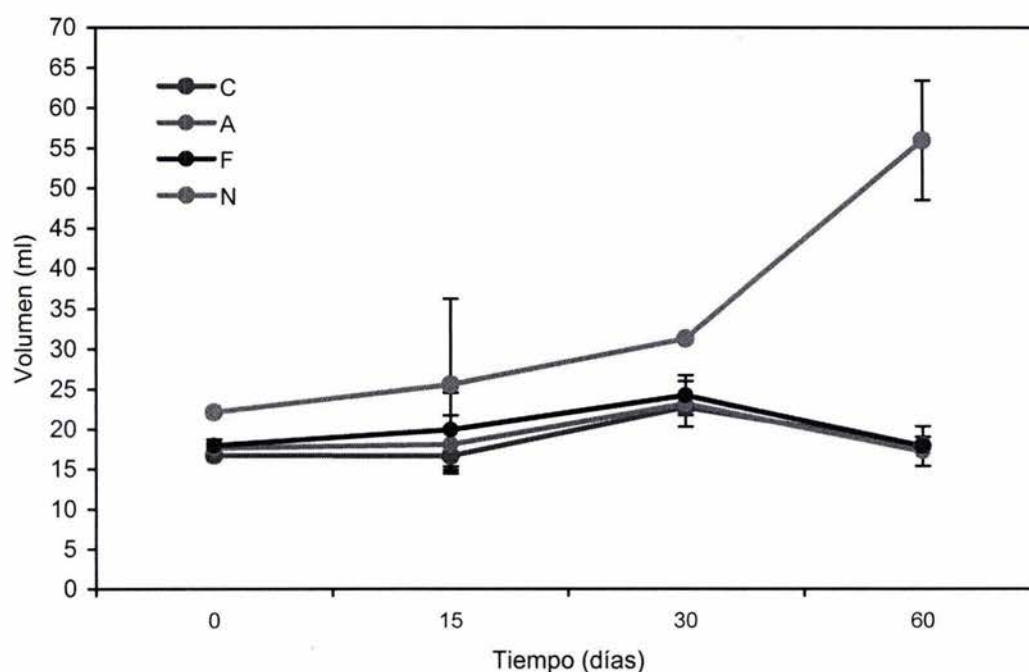


Fig. 11. Variación del volumen promedio de la esponja *Dysidea amblyia* durante el periodo de cultivo en el estero de Urías (N) y en los sistemas semicontrolados: Tratamiento C (30.26 ± 0.077 °C), Tratamiento A (27.68 ± 0.077 °C) y Tratamiento F (22.42 ± 0.077 °C). Las líneas verticales indican el error estándar.

En el medio natural, el volumen promedio de *Dysidea amblia* se incrementó durante todo el periodo de cultivo, desde $22.15 \pm 0.07 \text{ cm}^3$ al inicio, hasta $55.93 \pm 7.45 \text{ cm}^3$ al final, presentando un incremento de 33.78 cm^3 , que representó el 152.5 %, respecto del volumen inicial (*Fig. 11*). Sin embargo, durante el cultivo hubo un problema recurrente con el "fouling". Antes de cada muestreo se intentaba limpiar las superficies experimentales, pero no se pudo evitar que la esponja creciera sobre ellos, y también que muchos de ellos se fijaran sobre la esponja, a tal grado que al desprenderlos se dañaba a la esponja. Por este motivo, una parte del volumen registrado para esta esponja en el medio natural probablemente se debió al volumen de estos organismos.

La supervivencia de *Dysidea amblia* cultivada en el estero de Urías fue de $95 \pm 7.07 \%$.

7.2. Efecto de la interacción de la temperatura y la adición de arena sobre el crecimiento y la supervivencia de la esponja *Dysidea amblia* en condiciones de cultivo semicontroladas.

Se observaron diferencias significativas ($F = 4.619$; $p = 0.0137$) en el crecimiento de *D. amblia*, como efecto de la interacción de la temperatura y la adición de arena. Además, la comparación múltiple demostró que el tratamiento FCA (20°C con adición de arena) fue el único que favoreció el crecimiento de esta esponja, ya que, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) a favor de este tratamiento, respecto de los demás.

El volumen promedio de *Dysidea amblia* se mantuvo más o menos constante en los tratamientos FSA, CSA y CCA, con algunos incrementos y decrementos durante el periodo de cultivo. Solamente los ejemplares en el tratamiento FCA incrementaron el volumen a lo largo del periodo de cultivo, finalizando con un incremento de 7.59 cm^3 , que representaron el 40.79 %, con respecto al volumen inicial (Fig. 12).

En el caso de la supervivencia, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$), los valores de supervivencia registrados fueron 90 ± 14.14 % para los tratamientos FCA y CCA y de 30 ± 14.14 y 20 ± 28.28 % en los tratamientos FSA y CSA, respectivamente (Fig. 13).

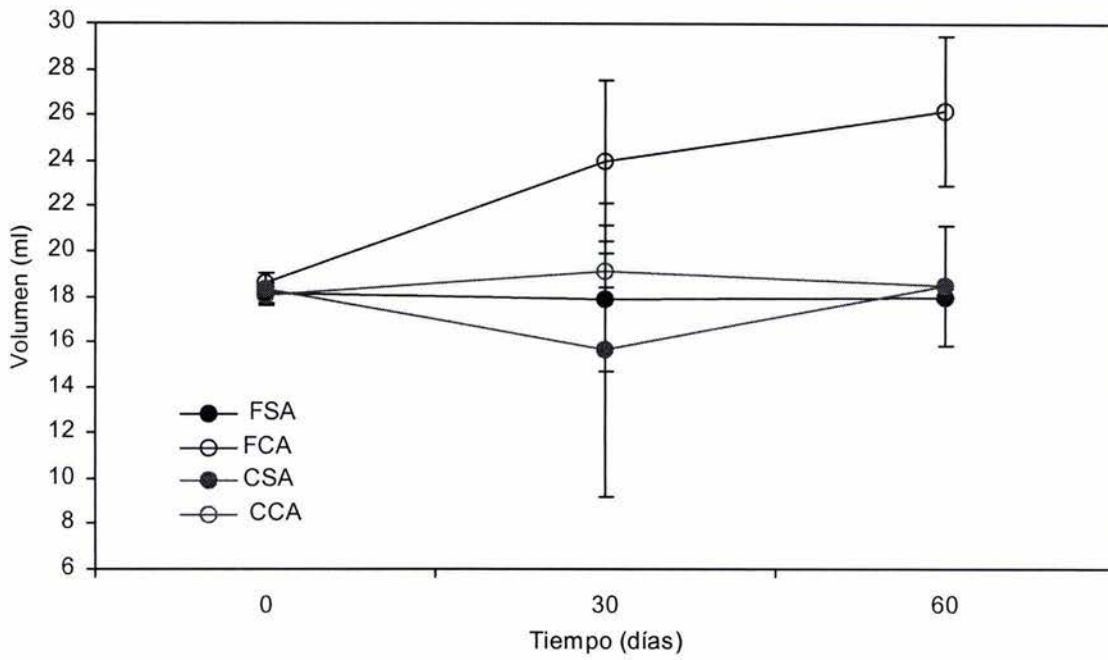


Fig.12. Variación del volumen promedio de la esponja *Dysidea amblia* durante el periodo de cultivo. Las líneas verticales indican el error estándar. FSA: Temperatura fría sin adición de arena. FCA: Temperatura fría con adición de arena. CSA: Temperatura caliente sin adición de arena. CCA: Temperatura caliente con adición de arena.

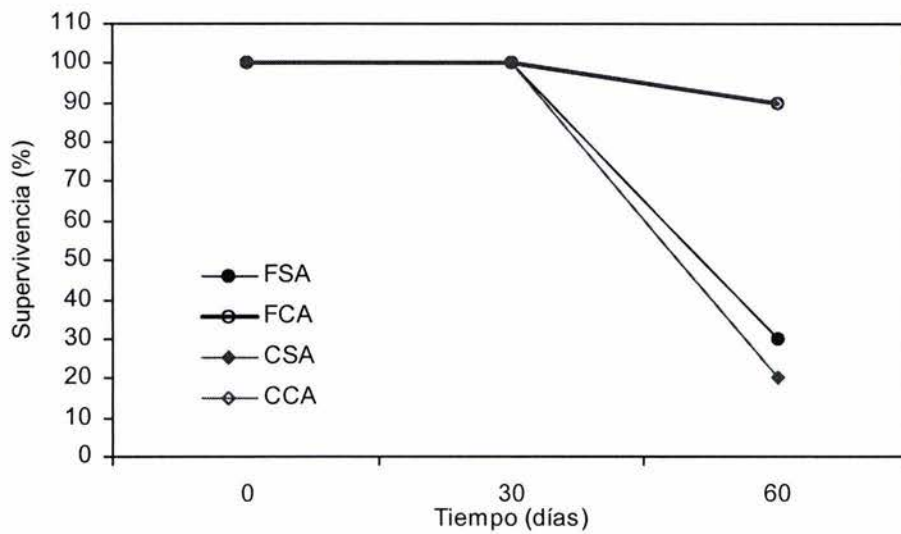


Fig. 13. Supervivencia de la esponja *Dysidea amblia* durante el periodo de cultivo.

7.3. Comparación entre los sistemas de cultivo semicontrolados y medio natural.

Se observaron diferencias significativas ($F = 20.012$; $p = 0.0184$) en el crecimiento de la esponja *Mycale cecilia*, entre los sistemas de cultivo semicontrolados y el medio natural. Además, el análisis de rango múltiple Newman-Keuls, demostró que el cultivo en el medio natural fue el que mejor favoreció el crecimiento de esta especie, ya que, se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) favorables a éste, respecto de los tratamientos C y F, establecidos en los sistemas semicontrolados.

Con respecto a la supervivencia, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos sistemas de cultivo.

Para el caso de la especie *Dysidea amblia*, solo se comparó contra el medio natural, el crecimiento y la supervivencia del tratamiento de los sistemas semicontrolados que presentó mejores resultados. Este tratamiento fue el FCA ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ con adición de arena), establecido en el cultivo en el que se evaluó la interacción de la temperatura y la adición de arena.

La comparación demostró que hubo diferencias significativas ($F = 21.075$; $p = 0.0443$) entre el tratamiento FCA y el medio natural. Además el análisis de rango múltiple Newman-Keuls, demostró de forma significativa ($p < 0.05$) que el cultivo del medio natural fue más favoreció el crecimiento de *D. amblia*.

Por otro lado, la comparación entre la supervivencia de *D. amblia*, obtenida en ambos sistemas, tampoco tuvo diferencias significativas, como en el caso de *M. cecilia*.

8. DISCUSIÓN

El número creciente de esponjas marinas que contienen metabolitos de interés farmacológico, ha provocado, que su producción bajo condiciones de cultivo sea en la actualidad, un objetivo de gran importancia en la biotecnología de productos naturales marinos (Nickel *et al.*, 2001). Sin embargo, la dificultad para reproducir las condiciones naturales de luz, corrientes, nutrientes, temperatura, que estas necesitan para su desarrollo (Fell, 1967; Kinne, 1977; Barthel, 1991a), parece un factor importante que limita su producción en sistemas controlados. La temperatura es uno de los principales factores que regulan la abundancia, distribución, reproducción, crecimiento y supervivencia de las esponjas, sin embargo, en el presente estudio, no se observó un efecto positivo de la temperatura en el crecimiento ni en la supervivencia para ninguna de las dos especies cultivadas en los sistemas semicontrolados. Muchos autores han demostrado que el crecimiento de las esponjas en el medio natural, presenta un patrón estacional, como efecto de las variaciones de temperatura (Barthel, 1989 y 1991b, Stone, 1970). *Halichondria panicia* y *Psammocinia hawere*, son esponjas que se comportan de esta forma. La primera presenta altas tasas de crecimiento durante la primavera y verano. En el invierno permanece en dormancia, deja de crecer e incluso reduce su tamaño (Barthel, 1989). Por el contrario, *P. hawere*, muestra tasas de crecimiento mayores durante el invierno (Duckworth, 1997). Es posible que *Mycale cecilia* y *Dysidea amblia* no presenten patrones estacionales de crecimiento, como es el caso de *H. panicia* y *P. hawere*. Como consecuencia, probablemente las temperaturas ensayadas en esta investigación no promovieron algún efecto importante en el crecimiento de *M. cecilia* y *D. amblia*. Ya que estas temperaturas están incluidas dentro del intervalo de oscilación de la zona (estero de Urías) donde habitan estas especies. En contraste con el presente estudio, Barthel y Theede (1986) en un cultivo con *Halichondria panicea* a diferentes temperaturas (0, 5, 10, 15 y 20 °C) observaron una variación significativa en el crecimiento de esta esponja. La discrepancia en los resultados de estos autores y los nuestros podría ser debida a que ellos cultivaron fragmentos y nosotros ejemplares completos (sin fragmentar). Duckworth y colaboradores (1997), en un

cultivo en condiciones controladas (14 y 19 °C), observaron que la temperatura influye de forma significativa en la cicatrización de los fragmentos. Una de las causas que podría justificar nuestros resultados es el tiempo de cultivo. Cuando se hacen trasplantes de esponjas para ser cultivadas, comúnmente al inicio se presentan periodos en los que no se registra crecimiento e incluso las esponjas disminuyen su tamaño, este periodo varía dependiendo la especie que se cultive. Nava y Yáñez, (2002), en un cultivo con la esponja *Suberites aurantiaca* (ahora *Suberites zeteki*), registraron crecimiento hasta después de dos meses de iniciado el cultivo. Barthel & Theede, (1986); y Osinga y colaboradores (1999), registraron periodos de aproximadamente 10 días. En el presente estudio es probable que en el periodo de cultivo (2 meses) no se haya superado esta fase y por lo tanto no se notara el efecto de los tratamientos. Este fenómeno ocurre debido a que las esponjas al ser trasplantadas, invierten mucha energía en la regeneración y reorganización de sus sistemas acuíferos al (Pronzato *et al.*, 1999).

Una causa más podría ser el número de replicas utilizadas para cada tratamiento. En la mayoría de los cultivos de esponjas se utilizan más de tres réplicas por tratamiento (Verdenal & Vacelet, 1990; Pronzato *et al.*, 1999; Duckworth *et al.*, 1997 y 1999). Por lo tanto, es probable que la amplia variabilidad entre las dos replicas de cada tratamiento no nos haya permitido detectar diferencias estadísticas.

En el estero de Urías, se registró un crecimiento significativo para ambas especies. Por lo general, las esponjas cultivadas en condiciones naturales (mar abierto, estuarios o lagunas costeras), crecen rápidamente (Duckworth, *et al.*, 2003). Esto es debido a que cuentan con el conjunto de factores idóneos (tipo y suministro adecuado de alimento, movimiento de agua necesario, factores fisicoquímicos adecuados, entre otros) para su desarrollo. En aguas estuarinas, entre los factores ambientales más importantes para las esponjas se encuentran la salinidad (Knight & Fell, 1987; Fell *et al.*, 1989; Leamon & Fell, 1990), el pH (Philp, 1999) y el oxígeno disuelto (Sagasti *et al.*, 2000; Sagasti *et al.*, 2001). Los parámetros ambientales en las cajas de cultivo fueron muy parecidos a los registrados en el estero de Urías. A pesar de esto, es probable que en los

sistemas semicontrolados se hayan mantenido condiciones inadecuadas que impidieron notar el efecto de la temperatura. En sistemas de cultivo de flujo continuo, con características similares a los utilizados en este estudio, los principales factores que deben cumplirse para lograr inducir un óptimo desarrollo de los organismos son: proporcionar una dieta que cumpla con los requerimientos nutricionales (bacterias, glucosa, minerales y iones) de los organismos y mantener un movimiento del agua, que permita remover los desechos de las esponjas (tales como, amonio, nitrato y otros compuestos tóxicos) y que mantenga los niveles de oxígeno (Porrier *et al.*, 1981; Osinga *et al.*, 1998 y 2003).

Los valores de incremento de volumen obtenidos (mas del 130% para ambas especies) en el sistema de cultivo del medio natural, demuestran claramente una mayor eficiencia de éste, comparado con los semicontrolados. En los que los valores de incremento máximos fueron 34.01% (tratamiento F) para *M. cecilia* y 7.34% (tratamiento C) para *D. amblia*. Sin mencionar que la mayoría de los tratamientos (cajas de cultivo) disminuyeron su volumen. Posteriormente, el crecimiento de *D. amblia* se vio favorecido con la adición de arena, alcanzando un incremento máximo de 40.79% (tratamiento FCA). Aun con esta mejoría en el crecimiento de *D. amblia*, el incremento obtenido en el medio natural, continuó siendo aproximadamente un 90 % mayor. Esta especie incorpora partículas de arena de forma natural para fortalecer su estructura esquelética (Shaw, 1927). La incorporación de arena a su tejido, es muy importantes para su crecimiento y morfogénesis (Teragawa, 1986). Uno de los principales motivos que podría explicar las diferencias entre ambos sistemas es, que no se haya proporcionado una cantidad adecuada de alimento que cubriera las demandas de la biomasa de esponja contenida en las cajas. Sabemos que el alimento fue consumido, ya que se observaba después de unos minutos de agregarlo, un cambio de coloración de las esponjas. Las esponjas se tornaban de color verde cuando se agregaba la microalga *Tetraselmis sp.* y café cuando se alimentaban con *Isocrysis sp.* La densidad de las microalgas (1×10^6 cel ml^{-1} , en el caso de *Tetraselmis sp.* y 3×10^6 cel ml^{-1} , en el caso de *Isocrysis sp.*) fue muy parecida a la suministrada por Osinga y colaboradores (1999). Estos autores cultivaron fragmentos entre 0.5 y

1.8 cm² de tamaño, de las esponjas *Pseudosuberites aff. andrewsi* y *Pseudosuberites andrewsi*, en sistemas controlados, a una temperatura de 25 °C, 34 ‰. Registraron incrementos (% de incremento respecto del tamaño inicial) de 680 % (*Pseudosuberites andrewsi*) y 730 % (*Pseudosuberites aff. andrewsi*), en un periodo de tiempo de 22 y 54 días. Esto nos sugiere que probablemente, reduciendo el tamaño inicial de los ejemplares, podríamos obtener mejores resultados en futuros cultivos.

Las tasas de filtración de las esponjas varía a lo largo del día, ritmos en la actividad de bombeo in situ, han sido descritos por Reiswig (1971b). En adición a esto, Osinga *et al.* (2001), encontró una alta variabilidad en la actividad de filtración entre fragmentos de la esponja *P. andrewsi*, cultivados en sistemas cerrados. Estos mismos autores encontraron que en recintos pequeños, la actividad filtradora de las esponjas, guarda una relación directa con la concentración de alimento en el agua que las rodea. Es decir, varía en función del alimento disponible, lo cual nos indica, que en sistemas cerrados, el suministro de alimento debe hacerse de manera constante y no en momentos fijos. La alimentación constante nos garantizaría una mejor disponibilidad del alimento para las esponjas, y por lo tanto un consumo constante, que podría verse reflejado en un mejor crecimiento y desarrollo de las esponjas (Osinga, *et al.*, 2003). La disponibilidad del alimento es el motivo por el cual en los cultivos en el medio natural, por lo general se observan buenos resultados en el crecimiento de las esponjas. En el presente estudio se registraron valores de crecimiento mucho mayores a los registrados por Verdenal & Vacelet (1990), quienes en el medio natural cultivaron adheridos a cuerdas, fragmentos de la esponja *Spongia officinalis*, registrando un incremento de 100 % en un periodo de 1 año. De igual forma, Pronzato *et al.*, (1999), registran incrementos menores que los nuestros (100% en un periodo de un año) en cultivos en los que atravesaron con cuerdas (como un collar) fragmentos de las esponjas *Spongia officinalis* y *Hippospongia communis*. Los mejores resultados observados en este estudio, probablemente se debieron al método de cultivo usado (fijando las esponjas a sustratos artificiales, azulejos de cerámica). *Mycale cecilia* y *Dysidea ambia*, pueden crecer recubriendo

al sustrato donde se fijan (forma recubriente o incrustante), por lo tanto, al fijar las esponjas a los azulejos se adhirieron y crecieron rápidamente, en el caso de *M. cecilia*, incluso recubrieron por completo los sustratos. Duckworth et al., (1997), en un cultivo durante 262 días en el medio natural, con la esponja *Raspailia agminata*, registraron un incremento de 25%, en una zona protegida y un decremento -33% en una zona expuesta. El estero de Urías, donde se realizó el cultivo del medio natural, es una zona con características muy adecuadas (protección del oleaje, buena mezcla de agua marina, gran cantidad de materia orgánica y alimento disponible para las esponjas, entre otras) para realizar cultivos de este tipo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que el presente método de cultivo del medio natural, podría ser usado en el futuro como una técnica muy adecuada para producir metabolitos activos procedentes de esponjas marinas.

Las esponjas del género *Mycale*, producen una gran variedad de metabolitos activos. Recientemente se aislaron 14 metabolitos nuevos de la esponja *Mycale cecilia*. Los cuales manifestaron distintos niveles de actividad contra diferentes líneas celulares cancerosas, entre las que destacan LncaP (Adenocarcinoma prostático de origen humano), IGROV (Carcinoma ovárico de origen humano) y SK-MEL28 (Melanoma maligno de origen humano) (Ortega et al., 2004). Los mismos autores registraron los valores de inhibición (GI_{50} = concentración de extracto a la cual el 50% de los organismos tratados dejan de crecer, expresado en $\mu\text{g/ml}$) más altos en LncaP, siendo el compuesto 6 (Mycalazal-8), el más activo ($GI_{50}=0.2\mu\text{g/ml}$). Otros compuestos que también presentaron valores altos de inhibición para esta misma línea celular fueron el 2 (Mycalazal-4), 5 (Mycalazal-7) y 8 (Mycalazal-10), con valores de GI_{50} de 1.3, 1.5 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Pérez (comunicación personal), realizó una relación volumen de esponja / extracto crudo y encontró que por cada ml de esponja se obtienen 5 mg de extracto crudo. Después de fraccionar el extracto crudo, para separar los compuestos puros, Pérez obtuvo la siguiente relación (μg de compuesto puro/ml de esponja), para los

compuestos que Ortega y colaboradores (2004) registraron con mayor actividad: 95.7, para el compuesto 6 (Mycalazal-8), 63, para el compuesto 2 (Mycalazal-4), 44.28, para el 5 (Mycalazal-7) y 40.84, para el 8 (Mycalazal-10).

Las relaciones extracto crudo / volumen de esponja y extracto puro / volumen de esponja, realizadas por Pérez, se obtuvieron con esponjas recolectadas directamente del medio natural. Dado que en los sistemas semicontrolados se mantuvo un estado de estrés permanente para las esponjas, estas relaciones no pueden utilizarse para calcular la cantidad de compuestos puros contenidos en el volumen de esponja producida en el cultivo. Sin embargo, en los cultivos del medio natural si se pueden utilizar, ya que aunque las condiciones no fueron exactamente iguales, si fueron muy parecidas. En el cultivo del medio natural, se obtuvieron 3.0, 2.0, 1.4 y 1.3 mg de los compuestos 6, 2, 5 y 8, respectivamente. No obstante, se requiere hacer extracciones de esponjas cultivadas, para corroborar esta información. Con esto, se podría sugerir que nuestro método de cultivo en el medio natural, es apropiado para producir metabolitos activos de la esponja *Mycale cecilia*.

9. CONCLUSIONES

1.- Las temperaturas probadas en los sistemas semicontrolados no afectaron el crecimiento y a la supervivencia de las especies *Mycale cecilia* y *Dysidea amblia*. Sin embargo se obtuvieron diferencias con respecto al sistema natural tal vez debido a que las condiciones de cultivo (disponibilidad y tipo de alimento, y movimiento de agua) fueron mas adecuados que las establecidos en los sistemas semicontrolados.

2.- La adición de arena tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de la esponja *Dysidea amblia*, sugiriendo la importancia de este parámetro a la hora de planificar el cultivo de especies de este genero.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, T. E.** 2002. Dinámica poblacional de la asociación *Sigmatocia caerulea* (Hechtel, 1965) (Demospongiae, Haplosclerida) y algas rojas en la bahía de Mazatlán (México, Pacífico Oriental). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Postgrado de Ciencias del Mar y Limnología, 66 pp.
- Armstrong, E., Mckenzie, J. and Goldsworthy, G. T.** 1999. Aquaculture of sponges on scallops for natural products research and antifouling. *Journal of Biotechnology* **70**: 163-174.
- Barnabé, G.** 1991. *Acuicultura*. Editorial Omega, Vol. 1. Barcelona. 478 pp.
- Barthel, D. y Theede, H.** 1986. A new method for the culture of marine sponges and its application for experimental studies. *Ophelia* **25**: 75-82.
- Barthel, D.** 1988. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. II. Biomass, production, energy budget and integration in environmental processes. *Marine Ecology Progress Series* **43**: 87-93.
- Barthel, D.** 1989. Growth of the sponge *Halichondria panicea* in the North Sea habitat. Polish Academy of Sciences, Institute of Oceanology, p 23-30.
- Barthel, D.** 1991a. Influence of Different Current Regimes on the Growth Form of *Halichondria panicea* Pallas. In J. Reitner & H. Keupp (Eds). *Fossil and Recent sponges* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Barthel, D.** 1991b. Population dynamics of the sponge *Halichondria panicea* (Pallas) in Kiel Bight. In: G. Colombo, *et al.*, (Ed.). *Marine Eutrophication and population Dynamics*. Olsen and Olsen Fredensborg, Denmark, pp. 203-209.
- Bell, A. H., Bergquist, P.R. y Battershill, C. N.** 1999. Feeding Biology of *Polymastia croceus*. *Memoirs of the Queensland Museum* **44**: 54-56.
- Betancourt, L. M., González, F. F., González, A. B., García, G. A. y Bastidas, Z. J. R.** 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **223**: 1-18.

- Brusca, R. C y Brusca G. J.** 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. Second edition, 936 pp.
- Carballo, J. L.** 2002. Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. Perspectiva actual, pp. 83-115. En: *El mar como fuente de moléculas bioactivas*. Pp: 83-115. A. J. Laborda y Secretariado de Publicaciones Universidad de León (Eds), León, España. 233 p. ISBN 84-7719-796-2.
- Carballo, J. L., Yáñez, B. y Nava, H.** (En prensa). Persistence of the sponge *Suberites aurantiaca* (Duchassaing and Michelotti 1864) in an estuarine ecosystem (Pacific Ocean, Mexico). *Bulletin of Marine Science*.
- Cimino, G. y Ghiselin, T. M.** 2001. Marine Natural Products Chemistry as an Evolutionary Narrative. In: McClintock B. J. and Baker J. B. (Ed.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Washington, D.C., pp. 115-154.
- Cook, S. C. y Bergquist, P. R.** 2002. Family Dysideidae Gray, 1867. In: Hooper N. A., Soest, R. W. M. (Ed.). *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic Press, N. Y., pp. 1061-1066.
- Cruz-Barraza, J. A.** 2004. Taxonomía y distribución de las esponjas marinas (Porífera: Demospongiae) del margen continental del golfo de California. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Postgrado de Ciencias del Mar y Limnología, 359 pp.
- David, W.E.** 1976. Seasonal growth and reproduction of an intertidal sponge, *Haliclona permollis* (Bowerbank). *Biological Bulletin* **151**: 108-125.
- Díaz, R. J. y Rosenberg, R.** 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* **33**: 245-303.
- Dickinson, G. M.** 1945. *Sponges of the Gulf of California*. Allan Hancock Pacific Expeditions, Vol. 1. 251 pp.
- Duckworth, A. R., Battershill, C. N. y Bergquist, P. R.** 1997. Influence of explants procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture* **156**: 251-267.

- Duckworth, A. R., Battershill, C. N., Schiel, D. R. y Bergquist P. R.** 1999. Farming sponges for the production of the bioactive metabolites. *Memoirs of Queensland Museum* **44**: 155-159.
- Duckworth, A. R., Samples, G. A., Wright A. E. y Pomponi, S. A.** 2003. In Vitro Culture of the Tropical sponge *Axinella corrugata* (Demospongiae): Effect of Food Cell Concentration on Growth, Clearance Rate , and Biosynthesis of Stevensine. *Marine Biotechnology* **5**: 519-527.
- Fell, P. E.** 1967. Sponges. In: Wilt F. H. & Wessel N. K. (Ed.) *Methods in developmental biology*. Crowell-Collier, New York.
- Fell, P. E., Knight, P. y Rieders, W.** 1989. Low salinity tolerance of and salinity-induced dormancy in the estuarine sponge, *Microciona porifera* (Ellis y Solander), under long-term laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **133**: 195-211.
- Fry, W. G.** 1971. The biology of larvae of *Ophiliataspongia seriata* from two North Wales populations. In: Crisp, D. J. (Ed.). *Proceedings of the Fourth European Marine Biology Symposium*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.155-178.
- Guillard, R. R. L.** 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton. In: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of phycological methods – culture methods and growth measurements*. *European Mariculture Soc.* **4**: 335-359.
- Griffiths, C. L. y Griffiths, R. J.** 1978. Bivalvia. In: Padian T.J. Verber F. J. (Ed.) *Animal Energetics*, Vol 2. Academic Press, London, pp.1-88.
- Hoffmann, F., Rapp, H. T., Zöller, T. y Reitner, J.** 2003. Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge *Geodia barretti* bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae). *Journal of Biotechnology* **100**: 109-118.
- Hooper, N. A. y Van Soest, W. M.** 2002. *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic Press, Vol. 1. N. Y.1101 pp.

- Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S. y Rinkevich, B.** 1996. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *Journal of Marine Biotechnology* **4**: 145-149.
- Kinne, O.** 1977. *Marine Ecology*. Vol. III: Cultivation Part. II: 580-1293.
- Knight, P. y Fell, P. E.** 1987. Low salinity induces reversible tissue regression in the estuarine sponge *Microciona prolifera* (Ellis y Solander). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **107**: 253-261.
- Krebs, C. J.** 1989. *Ecological Methodology*. Harper Collins Publishers. 654pp.
- Leamon, J. y Fell, P. E.** 1990. Upper Salinity Tolerance of and Salinity-induced Tissue Regression in the Estuarine Sponge *Microciona prolifera*. *Transactions of the American Microscopical Society* **109** (3): 265-272.
- Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. H., Lill, R. E., Li, S., Battershill, C. N. y Duckworth, A. R.** 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* **70**: 15-25.
- Nava, B. H. H. y Yáñez, B.** 2002. Crecimiento y supervivencia de algunas esponjas marinas en sistemas de cultivo experimentales. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. 55pp.
- Nickel, M., Leininger, S., Proll, G. y Brümmer, F.** 2001. Comparative studies on two potential methods for the biotechnological production of sponges biomass. *Journal of Biotechnology* **92**: 169-178.
- Ortega MJ, Zubía E, Sánchez MC, Salvá J, Carballo JL.** 2004. Structure and cytotoxicity of new metabolites from the sponge *Mycale cecilia*. *Tetrahedron* **60**: 2517-2524.
- Osinga, R., Tramper, J. y Wijffels, R. H.** 1998. Cultivation of marine sponges for metabolite production: applications for biotechnology? *Trends in biotechnology* **16**: 130-134.

- Osinga, R., Redeker, D. De Beukelaer, P. B. y Wijffels, R. H.** 1999. Measurement of sponge growth by projected body area and underwater weight. *Memories of the Queensland Museum* **44**: 419-426.
- Osinga, R., Kleijn, R., Groenendijk, E., Niesink, P., Tramper, J. y Wijffels, R. H.** 2001. Developmen of in vivo sponge cultures: particle feeding by the tropical sponge *Pseudosuberites andrewsi*. *Marine Biotechnology* **3**: 544-554.
- Osinga, R., Belarbi, E. H., Molina, E., Tramper, J. y Wijffels, R. H.** 2003. Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberites andrewsi* in a bioreactor. *Journal of Biotechnology* **100**: 141-146.
- Pawlik, J. R.** 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Review* **93**: 1911-1922.
- Philp, R. B.** 1999. Cadmium content of the marine sponge *Microciona prolifera*, other sponges, water and sediment from the eastern Florida panhandle: possible effects on *Microciona* cell aggregation and potential roles of low pH and low salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124**: 41-49.
- Pile, A. J., Patterson, M. R. y Witman, J. D.** 1996. In situ grazing on plankton <10µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Marine Ecology Progress series* **141**: 95-102.
- Pomponi, S. A., Willoughby, R., Wright, A. E., Pecorella, C., Sennett, S. H., Lopez, J. y Samples, G.** 1998. In vitro production of marine-derived antitumor compounds. Pp 73-76. In Le Gal and Halvorson (ed.) *Developments in Marine Biotechnology* (Plenum Press: New York).
- Poirrier, M. A., Francis, J. C. y Labiche, R. A.** 1981. A continuous flow system for growing fresh water sponges in the laboratory. *Hydrobiologia* **79**: 255-259.
- Pronzato, R., Bavestrello, G., Cerrano, C., Magnino, G., Manconi, R., Pantelis, J., Sarà, A. y Sidri, M.** 1999. Sponge farming in the Mediterranean Sea: new perspectives. *Memoirs of the Queensland Museum* **44**: 485-491. Brisbane.
- Reiswig, H. M.** 1971a. Particle Feeding in natural populations of three marine Demospongiae. *Biological Bulletin* **141**: 568-591.

- Reiswig, H. M.** 1971b. *In situ* pumping activities of tropical Demospongiae. *Marine Biology* **9**: 38-50.
- Reiswig, H. M.** 1975. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Canadian Journal of Zoology* **53**: 582-589.
- Reiswig, H. M.** 1990. *In situ* feeding in two shallow-water hexactinellid sponges. Pp: 504-510. In: Rützler K, (ed.) *New perspectives in sponge biology*. (Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.).
- Ribes, M., Coma, R. y Gili, J. M.** 1999. Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Marine Ecology Progress Series* **176**: 179-190.
- Russell, B. R. y Winget, N. R.** 1985. Seasonal growth rate and population dynamics of a freshwater sponge. *Hydrobiologia* **123**: 171-176.
- Sagasti, A., Schaffner, L. C. y Duffy, J. E.** 2000. Epifaunal communities thrive in an estuary with hypoxic episodes. *Estuaries* **23** (4): 474-487.
- Sagasti, A., Scheffner, L. C. y Duffy, J.E.** 2001. Effects of periodic hypoxia on mortality, feeding and predation in estuarine epifaunal community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **258**: 257-283.
- Sarà, M. y Vacelet, J.** 1973. Écologie des demospongies, In: *Traité de zoologie, Anatomie, Systematique, Biologie, Masson et C^{ie}*. Paris. pp: 463-516.
- Sennett, S. H.** 2001. Marine Chemical Ecology: Applications in Marine Biomedical Prospecting. In: McClintock B. J. and Baker J. B. (Ed.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Washington, D.C., pp. 523-542.
- Shaw, M. E.** 1927. Note on the inclusion of sand in sponges. *Annals Magazine of the Natural History* **19**: 601-609.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J.** 1981. *Biostatistics*, 2nd ed. Freeman, San Francisco.
- Stachowitsch, M.** 1984. Mass mortality in the Gulf of Trieste: the course of community destruction. *P. S. Z. N. I. Marine Ecology* **5** (3): 243-264.

- Steinberg, D. P., De Nys, R. y Kjelleberg, S.** 2001. Chemical Mediation of Surface Colonization. In: McClintock B. J. and Baker J. B. (Ed.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Washington, D.C., pp. 355-387.
- Stone, A. R.** 1970. Growth and reproduction of *Hymeniacion perleve* (Montagu) (Porifer) in Langstone Harbour, Hampshire. *Journal of Zoology (London)* **161**: 443-459.
- Teragawa, C. K.** 1986. Particle transport and incorporation during skeleton formation in a keratose sponge: *Dysidea etheria*. *Biological Bulletin* **170**: 321-334.
- Thomassen, S. y Riisgard-Ulrik, H.** 1995. Growth and energetics of the sponge *Halichondria panicea*. *Marine Ecology Progress Series* **128**: 239-246.
- Thompson, J. E., Murphy, P. T., Bergquist, P. R. y Evans, E. A.** 1987. Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Biochemical Systematics and Ecology* **15**: 595-606.
- Unson, M. D, Holland, N. D. y Faulkner, D. J.** 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology* **119**: 1-11.
- Vacelet, J.** 1985. Bases historiques et biologiques d'une éventuelle spongiculture. *Océanis* **11**:551-584.
- Verdenal, B. y Vacelet, J.** 1990. Sponge culture on Vertical Ropes in the Northwestern Mediterranean Sea. Pp. 416-424. In: Rützler, K. (ed.) *New perspectives in sponge biology*. (Smithsonian Institution Press: Washington, D. C.).
- Wilkinson, C. R.** 1978. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology* **49**: 161-167.

Wilkinson, C. R. y Vacelet, J. 1979. Transplantation of marine sponges to different conditions of light and currents. *Journal of Marine Biology and Ecology* **37**: 91-104.

Wilkinson, C. R. y Chesire, A.C. 1989. Patterns in the distribution of sponge population across the central Great Barrier Reef. *Coral Reefs* **8**: 127-134.