



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DEL MICROBIOMA ASOCIADO A UNA ESPONJA DEL
SISTEMA DE CUEVAS ANQUIHALINAS DE LA PENÍNSULA DE
YUCATÁN Y SU POTENCIAL COMO FUENTE DE
METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

NINETTE CELESTE GARCÍA MARTÍNEZ



ASESOR: DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

CO-ASESOR: DR. PABLO DE JESÚS SUÁREZ MOO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022.



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 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. LÓPEZ BALBIAUX NAYELI

VOCAL: Prof. ZÚÑIGA VILLARREAL NOÉ

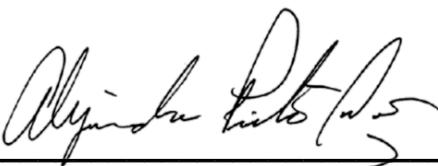
SECRETARIO: Prof. PRIETO DAVÓ ALEJANDRA

SUPLENTE 1: Prof. MARTÍNEZ GARCÍA MARCOS

SUPLENTE 2: Prof. ESCÁRCEGA BOBADILLA MARTHA VERÓNICA

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS: Laboratorio C de Ecología Marina y Productos Naturales Marinos, Unidad de la Facultad de Química en Sisal, Yucatán.

ASESOR DE TESIS:



Dra. Alejandra Prieto Davó

CO-ASESOR DE TESIS:



Dr. Pablo de Jesús Suárez Moo

SUSTENTANTE:



Ninette Celeste García Martínez

Agradecimientos

- Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (Clave del proyecto: IT202220, Folio: 021222). Agradezco a la **DGAPA-UNAM** la beca recibida.

Índice

Lista de figuras	1
Lista de tablas	4
Abreviaturas	5
Unidades	7
Fórmulas químicas	8
Iones químicos	8
1. Resumen y justificación	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Hipótesis	12
4. Introducción	13
4.1. Origen y generalidades de las esponjas	13
4.2. Ambiente anquihalino: descripción e importancia	16
4.3. Análisis del microbioma de esponja	19
4.4. Programa de análisis bioinformático: QIIME2	24
4.5. Ensayo de actividad metabólica MTT	25
5. Antecedentes	28
5.1. Diversidad microbiana asociada a esponjas	28
5.2. Funciones generales del microbioma asociado a las esponjas	30
5.3. Microorganismos productores de metabolitos secundarios	34
5.3.1. Metabolitos secundarios de esponjas del género <i>Haliclona</i>	37
5.4. Bacterias cultivables asociadas a esponjas	38
5.5. Esponjas en la República Mexicana	40
5.5.1. Esponjas en cuevas anquihalinas de México	42
6. Metodología	46
6.1. Área de estudio	46
6.1.1. Identificación taxonómica y secuenciación del gen 16S ARNr de la esponja colectada	48
6.2. Análisis bioinformático	49

6.2.1. Instalación de QIIME2, importación de datos y tabla de metadatos	49
6.2.2. Control de calidad y ensamblaje de las secuencias	51
6.2.3. Construcción de la curva de rarefacción	51
6.2.4. Asignación taxonómica	52
6.3. Cultivo y obtención de extractos crudos	52
6.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja	52
6.3.2. Purificación e identificación de la cepa bacteriana NCA-454	54
6.3.3. Obtención de los extractos de la cepa bacteriana NCA-454	55
6.4. Prueba de actividad metabólica MTT en microplaca de 96 pozos	57
6.4.1. Preparación de los microorganismos patógenos de prueba, solución reveladora de MTT, soluciones Stock de antibióticos y soluciones de los extractos	58
6.4.2. Ensayo de las curvas de antibióticos	58
6.4.3. Ensayo de los extractos y cuantificación de la actividad biológica	59
6.4.4. Perfil metabólico preliminar de extractos bacterianos asociados a la esponja	61
7. Resultados	62
7.1. Caracterización fisicoquímica de la cueva anquihalina	62
7.1.1. Identificación taxonómica de la esponja colectada	63
7.2. Análisis bioinformático	65
7.2.1. Control de calidad y eliminación de ruido de las secuencias	65
7.2.2. Análisis de la curva de rarefacción	65
7.2.3. Comparación de la asignación taxonómica del microbioma de <i>Haliclona</i> utilizando diferentes bases de referencia	66
7.2.4. Asignación taxonómica del microbioma de <i>Haliclona</i> (<i>Soestella</i>)	67
7.3. Cultivo a mediana escala de <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	72
7.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja	72
7.3.2. Identificación de la cepa bacteriana NCA-454	73
7.3.3. Extractos obtenidos de la cepa bacteriana <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	75
7.4. Prueba de actividad metabólica MTT y caracterización por HPLC	76

7.4.1. Ensayo de actividad metabólica: prueba del MTT	76
7.4.2. Perfiles metabolómicos de los extractos bacterianos de <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> asociado a la esponja <i>Haliclona (Soestella)</i>	82
8. Discusión de resultados	86
8.1. Caracterización fisicoquímica de la cueva anquihalina	86
8.1.1. Identificación taxonómica de la esponja colectada	90
8.2. Análisis bioinformático	91
8.2.1. Influencia de la región secuenciada en el microbioma	91
8.2.2. Control de calidad y eliminación de ruido de las secuencias	92
8.2.3. Análisis de la curva de rarefacción	93
8.2.4. Comparación de la asignación taxonómica del microbioma de <i>Haliclona</i> utilizando diferentes bases de referencia	94
8.2.5. Asignación taxonómica del microbioma de <i>Haliclona (Soestella)</i>	95
8.2.5.1. Influencia del ambiente anquihalino en la comunidad microbiana de <i>Haliclona (Soestella)</i>	103
8.3. Cultivo a mediana escala de <i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	105
8.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja	105
8.3.2. Identificación de la cepa bacteriana NCA-454	105
8.3.3. Extractos obtenidos de la cepa bacteriana <i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	107
8.4. Prueba de actividad metabólica MTT y caracterización por HPLC	108
8.4.1. Ensayo de actividad metabólica: prueba del MTT	108
8.4.2. Perfiles metabolómicos de los extractos bacterianos de <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> asociado a la esponja <i>Haliclona (Soestella)</i>	111
9. Conclusiones	114
10. Perspectivas futuras	117
Referencias bibliográficas	119
Anexos	133
Anexo I: Análisis bioinformático del microbioma con QIIME2	133
Anexo II: Cálculo del porcentaje de inhibición	137

Lista de figuras

Figura 1.	Estructura y anatomía de una esponja típica (esponja barril, filo Porifera).	6
Figura 2.	Esquema de los 7 patrones ecológicos que determinan la riqueza de especies, composición taxonómica y densidad esperada en una cueva anquihalina.	10
Figura 3.	Esquema del complejo ribosomal y el gen 16S ARNr. Los cuadros blanco y gris indican regiones conservadas e hipervariables (V1 - V9) respectivamente. Las flechas muestran las posiciones aproximadas de cebadores universales en la secuencia del gen 16S ARNr de <i>Escherichia coli</i> . F (del inglés <i>forward</i>) se refiere a la secuencia sentido 5' - 3' y R (del inglés <i>reverse</i>) a la secuencia antisentido 3' - 5'.	12
Figura 4.	Reducción del bromuro de MTT a su formazán.	18
Figura 5.	Nuevos compuestos de microorganismos asociados a esponjas durante 1998 a 2017. En el período de 2012 a 2017 aumentaron significativamente los compuestos obtenidos.	26
Figura 6.	Datos de las Colecciones del filo Porifera en México ordenados de acuerdo al nombre de (a) la colección, (b) al Estado donde se encontró y (c) los órdenes más destacados. (d) Distribución geográfica de todas las esponjas de México que han sido reportadas en las colecciones CNPGG e IGM hasta 2015. Como se puede observar, la zona con mayor densidad de especies es la Península de Yucatán.	33
Figura 7.	(a) Distribución de las cuevas anquihalinas en la Península de Yucatán que han sido reportadas de estudios realizados en 40 cenotes desde hace 80 años hasta 2017. (b) Riqueza de especies de las cuevas anquihalinas ubicadas en la Isla de Cozumel de la Península de Yucatán. Se puede distinguir que Porifera es el filo con mayor riqueza en "El Aerolito" y "La Quebrada".	36
Figura 8.	(a) Ubicación geográfica de la cueva perteneciente al sistema de cavernas anquihalinas de la Península de Yucatán, y (b) un acercamiento al sitio de recolección en "Bajo de Judas". (c) Las paredes de este sitio están conformadas por arcillas y areniscas, mientras que (e) el sedimento es de origen biogénico. (d) Zona de la cueva con intrusión de agua salina y visibilidad extremadamente pobre con (f) una entrada a 5 m de profundidad.	39
Figura 9.	Esquema general del procesamiento y análisis de datos de secuenciación del microbioma de esponja ejecutado en QIIME2.	41

Figura 10.	Metadatos de la muestra secuenciada en formato (*.tsv) validada para QIIME2 con la herramienta <i>Keemei</i> .	42
Figura 11.	Inóculo de la cepa NCA-454 en 600 mL de medio DSC-ASW (a), el cual se transfirió a seis matraces Fernbach de 3.0 L con suficiente medio de cultivo esterilizado en autoclave para cultivar la cepa a mediana escala (b). Durante la agitación constante de 10 días se logró apreciar el cambio de turbidez en el medio debido al crecimiento celular y la producción de biomasa (c), al añadir MeOH al medio se observó como el pellet bacteriano se fue asentando en el fondo (d), y finalmente este se separó del sobrenadante por centrifugación y decantación (e).	48
Figura 12.	Extracción del pellet bacteriano con AcOEt; se puede observar que la fase orgánica tiene una coloración amarilla muy ligera (a), y extracción del sobrenadante que contiene la resina con MeOH; la coloración de la fase orgánica es de color naranja muy intenso (b). La extracción usando el disolvente AcOEt es menos agresiva que con el MeOH debido a la diferencia de polaridad. La fase orgánica de las extracciones en el sobrenadante (c) y en el pellet (d) con los compuestos extraídos se filtró en Na ₂ SO ₄ anhidro para eliminar la humedad.	49
Figura 13.	Se muestran las microplacas de 96 pozos con señalamientos de la metodología empleada para construir la curva de antibiótico.	51
Figura 14.	A la izquierda se muestra el procedimiento para evaluar los extractos en la microplaca de 96 pozos. A la Derecha el lector de absorbancia de microplacas iMark, la microplaca de 96 pozos se colocó en la parte derecha del instrumento donde señala la flecha blanca.	52
Figura 15.	Método general de elución por gradiente 85:15 H ₂ O-ACN, empleado para analizar los extractos crudos en HPLC.	54
Figura 16.	Fotografía de <i>Haliclona (Soestella)</i> tomada en la zona oscura de la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak.	57
Figura 17.	Curva de rarefacción basada en la medida de diversidad filogenética alfa.	59
Figura 18.	Comparación del porcentaje de asignación taxonómica de la comunidad microbiana asociada a la esponja <i>Haliclona (Soestella)</i> entre las bases de datos SILVA 138 99%, Greengenes 13_8 99% y NCBI BLAST+ 2.13.0 ≥ 95%.	60
Figura 19.	Perfil de la comunidad microbiana asociada a <i>Haliclona (Soestella)</i> procesada con QIIME2. La taxonomía de los 160 ASVs se asignó usando SILVA 138 con un 99% de homología en la secuencia. Los taxa con abundancias relativas ≤ 0.5% se agruparon como “Otros”.	61

Figura 20.	Árbol de calor que muestra la jerarquización taxonómica asignada por SILVA 138 99% al microbioma de <i>Haliclona (Soestella)</i> . El color del nodo representa el número de ASVs que están bien caracterizados, mientras que el tamaño del nodo indica la cantidad de ASVs asignados a cada taxón y el ancho del borde indica la cantidad de lecturas.	63
Figura 21.	Diagramas de Venn que resumen la cantidad de taxa en el microbioma de esponja compartida entre los estudios globales A, B y C, contra los resultados obtenidos en el presente estudio de la esponja <i>Haliclona (Soestella)</i> ; a nivel de (a) filo y (b) clase.	64
Figura 22.	Fotografía del gel de agarosa teñido: (a) ADN genómico y (b) producto de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr de la cepa bacteriana NCA-454. El ADNg y el amplicón del 16S de NCA-454 se cargaron en el tercer pocillo (contando de izquierda a derecha) de la parte superior del gel. El ADN marcador 1 Kb Plus DNA Ladder colocado en el primer pocillo tiene fragmentos de tamaño conocido que se pueden observar a la derecha de cada gel.	66
Figura 23.	Fotografía del cultivo axénico de la cepa bacteriana NCA-454 (<i>Nocardiosis dassonvillei</i>) en caja petri con medio A1 rico en sales. Obtenido mediante la técnica de siembra por estría en placa de agar.	67
Figura 24.	Fotografías de los extractos crudos: (a) pequeña y (b) mediana escala, obtenidos luego de evaporar el exceso de cada disolvente empleado.	68
Figura 25.	Fotografías de la evaluación de actividad antimicrobiana en microplacas de 96 pozos de los extractos a pequeña escala contra (a) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 resistente a meticilina y (b) <i>S. aureus</i> ATCC 25913, usando bromuro de MTT como colorante.	71
Figura 26.	Fotografías de la evaluación de actividad antimicrobiana en microplacas de 96 pozos de los extractos a mediana escala contra (a) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 resistente a meticilina y (b) <i>S. aureus</i> ATCC 25913, usando bromuro de MTT como colorante. También se muestra la curva de antibiótico para cada bacteria en sus respectivas placas.	72
Figura 27.	Perfil cromatográfico de los extractos crudos a mediana escala de <i>Nocardiosis dassonvillei</i> asociada a <i>Haliclona (Soestella)</i> . Cromatograma de (a) 01004-48-19, (b) 01004-48-20, (c) 01004-48-17 y (d) 01004-48-18.	77

Lista de tablas

Tabla 1.	Datos fisicoquímicos del agua en el área de estudio.	56
Tabla 2.	Taxonomía sistemática asignada a la esponja.	57
Tabla 3.	Estadísticas del control de calidad de las secuencias con Deblur.	58
Tabla 4.	Taxonomía sistemática asignada a la cepa bacteriana NCA-454.	67
Tabla 5.	Rendimientos de los extractos obtenidos a mediana escala de <i>N. dassonvillei</i> .	69
Tabla 6.	Absorbancia promedio y concentración de las curvas de antibióticos en la prueba de actividad antimicrobiana.	73
Tabla 7.	Absorbancia promedio y porcentaje de inhibición de los extractos crudos de <i>Nocardiosis dassonvillei</i> contra dos cepas patógenas de <i>S. aureus</i> .	74
Tabla 8.	Tiempos de retención de los picos observados en los cromatogramas obtenidos por HPLC de los extractos a mediana escala.	78

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AOA	<i>Ammonia-Oxidizing Archaea</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	<i>Conductance</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CNPGG	Colección Nacional del filo Porifera Gerardo Green
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	<i>Dissolved Oxygen</i>
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i>
DOM	<i>Dissolved Organic Matter</i>
e.g.	“por ejemplo” (del latín)
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
EMP	<i>Earth Microbiome Project</i>
et al	“y otros” (del latín)
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HMA	<i>High Microbial Abundance</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>

ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
IGM	Instituto de Geología
LMA	<i>Low Microbial Abundance</i>
MeOH	Metanol
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 resistente a meticilina
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25913
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOB	<i>Nitrate-Oxidizing Bacteria</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POC	<i>Particulate Organic Carbon</i>
Q	<i>Quality</i>
QIIME2	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i> (versión 2)
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
S/A	Sin actividad biológica
S/I	Sin información (del tiempo de retención)
SOB	<i>Sulfur-Oxidizing Bacteria</i>
SPC	<i>Specific Conductance</i>
SRA	<i>Sulfate-Reducing Archaea</i>
SRB	<i>Sulfate-Reducing Bacteria</i>
TDS	<i>Total Dissolved Solids</i>
UV	Ultravioleta

Unidades

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
A	Amperes
Å	Angstroms $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
h min	Horas Minutos $1 \text{ h} = 60 \text{ min}$
kg g mg µg	Kilogramo Gramo Miligramo Microgramo $1 \text{ kg} = 1000 \text{ g} = 10^6 \text{ mg} = 10^9 \text{ µg}$
L mL µL	Litro Mililitro Microlitro $1 \text{ L} = 1000 \text{ mL} = 10^6 \text{ µL}$
m cm mm nm	Metro Centímetro Milímetro Nanómetro $1 \text{ m} = 100 \text{ cm} = 1000 \text{ mm} = 10^9 \text{ nm}$
µS	Microsiemens
Ω	Ohmios
pb	Pares de bases
ppt	Partes por trillón
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidad Formadora de Colonias
V	Voltios

Fórmulas Químicas

BaCl_2	Cloruro de bario
C_{18}	n-octildecilo
CaCO_3	Carbonato de calcio
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
H_2O	Agua
H_2S	Sulfuro de hidrógeno
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
N_2	Nitrógeno diatómico
Na_2SO_4	Sulfato de sodio
NH_3	Amoníaco
O_2	Oxígeno diatómico
SiO_2	Dióxido de silicio

Iones químicos

NH_4^+	Amonio
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
S^{2-}	Sulfuro
SO_4^{2-}	Sulfato

1. Resumen y justificación

Las cuevas anquihalinas son estuarios subterráneos dentro de terrenos kársticos, contienen una masa de agua marina flotando en agua salina y están influenciados por las mareas, además, en su interior habitan organismos con un alto grado de especialización. Este ecosistema representa un ambiente único donde podemos encontrar una diversidad inexplorada de invertebrados y a los microorganismos que los conforman. Un grupo de particular interés en las cuevas anquihalinas son las esponjas, debido a que albergan diversas comunidades microbianas en entornos con espacio limitado, baja concentración de oxígeno disuelto, oscuridad total y una tasa alta de endemismo (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020). Las bacterias simbióticas que habitan en los animales como las esponjas tienen la capacidad de realizar la biosíntesis de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos.

A la fecha, la mayoría de los compuestos bioactivos marinos provienen de esponjas encontradas en arrecifes de coral, mientras que, hay relativamente pocos de aquellas ubicadas en cuevas submarinas anquihalinas, a pesar de que México cuenta con muchas zonas costeras, las esponjas solo se conocen en dos cuevas anquihalinas: “La Quebrada” y “El Aerolito”, ambas en la Isla de Cozumel que forma parte de la Península de Yucatán, una de las zonas con mayor número de cuevas anquihalinas en todo el mundo. Sin embargo, los estudios de poríferos en este tipo de ecosistemas únicamente se han centrado en la identificación taxonómica de las especies y no en el análisis del microbioma que estos puedan hospedar.

Debido a que las cuevas inexploradas del extenso sistema de cavernas anquihalinas en la Península de Yucatán, albergan una diversidad de esponjas inexplorada, que podrían contener comunidades microbianas capaces de producir nuevos compuestos bioactivos con potencial biotecnológico; en 2020 se hizo una expedición al cenote Xcalak, en “Bajo de Judas” (18.202979°N, -87.860717°W), Península de Yucatán, donde se exploró una cueva anquihalina. Dentro de dicha

cueva se encontraron cuatro especies de esponjas diferentes y se colectaron pequeñas muestras de ellas para no provocar un daño ecológico.

En el presente estudio se realizó una descripción de la especie de esponja encontrada en Xcalak, así como un análisis de la diversidad taxonómica y el posible potencial funcional de la comunidad microbiana de su interior. La identificación de la esponja seleccionada en la cueva de Xcalak mostró la presencia de la especie *Haliclona (Soestella)*, lo cual representa el primer registro de este porífero en ecosistemas anquihalinos de la Península de Yucatán. Por otro lado, mediante el uso de datos de variantes de secuenciación de amplicón (ASVs, por sus siglas en inglés) del gen 16S ARNr provenientes de la comunidad microbiana de *Haliclona (Soestella)*, se determinó que la esponja alberga una variada diversidad de comunidades simbióticas, con 160 ASV y 18 géneros microbianos, siendo los más abundantes: *Sulfurospirillum*, *Desulfovibrio*, *Ulvibacter*, *Pseudomonas* y *Ruegeria*.

En el análisis de la diversidad microbiana con un enfoque basado en el cultivo de cepas bacterianas, se emplearon diversos medios y métodos de cultivo, así como un ensayo de actividad antimicrobiana con el que se logró explorar la actividad de inhibición metabólica de los extractos crudos obtenidos a partir de una de las cepas bacterianas que se aislaron de la esponja de este estudio, la cepa perteneciente a la especie *Nocardiopsis dassonvillei*, del filo Actinobacteria. Los resultados exhibieron que uno de los extractos es potencialmente activo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 y los demás extractos presentaron algunas actividades parciales. Además, todos los extractos fueron caracterizados parcialmente por HPLC.

Los resultados de este proyecto representan un aporte al conocimiento de la diversidad de microorganismos simbióticos que alberga una esponja del ecosistema anquihalino, el cual ha sido poco estudiado, también demuestran que varias de las bacterias presentes en el microbioma de *Haliclona (Soestella)* son capaces de cultivarse para investigar nuevos metabolitos secundarios con potencial biotecnológico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Analizar la estructura de la comunidad microbiana presente en una esponja colectada de una cueva anquihalina de la Península de Yucatán, así como evaluar el potencial funcional asociado a las actividades antimicrobianas de aislados bacterianos de dicha comunidad.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar la estructura de la comunidad microbiana asociada a la esponja colectada mediante un enfoque independiente de cultivos microbianos
- Identificar aquellos géneros bacterianos conocidos como productores de metabolitos secundarios en esponjas y revisar sus metabolismos reportados para proponer el papel y funciones que tienen dentro de la esponja hospedero.
- Elaborar medios y métodos de cultivo de bacterias para lograr su aislamiento, purificación y crecimiento a partir del tejido de esponja.
- Obtener extractos crudos de una de las bacterias aisladas utilizando resina y disolventes orgánicos para extracción.
- Identificar extractos bioactivos mediante un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana contra dos cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*.
- Caracterizar parcialmente los extractos crudos mediante la técnica de HPLC en fase reversa con un gradiente de eluyente.

3. Hipótesis

Las zonas costeras del Mar Caribe Mexicano, especialmente la Península de Yucatán, albergan ecosistemas de cuevas anquihalinas inexploradas, cuyas características fisicoquímicas permiten una gran diversidad microbiana desconocida asociada con las especies del filo Porifera que los habitan. En consecuencia, la esponja colectada en la cueva anquihalina de Xcalak, Q. Roo, alberga una amplia diversidad de microorganismos simbióticos, de los cuales algunos son cultivables y además, son capaces de producir metabolitos secundarios con actividad biológica.

4. Introducción

Las esponjas marinas (filo Porifera) son los metazoos vivos más antiguos e importantes en las comunidades bentónicas; a pesar de que son organismos sésiles cuentan con una amplia distribución global tanto en agua salada como dulce, llegando incluso a zonas de las profundidades marinas (Deshpande & Thakur, 2020). Debido a su naturaleza sésil y alta porosidad en su estructura corporal, las esponjas son capaces de hospedar a una gran diversidad de microorganismos simbióticos, los cuales contribuyen de manera relevante en la defensa química del hospedero contra depredadores (Deshpande & Thakur, 2020). Estos microorganismos pueden realizar biosíntesis de productos naturales también llamados metabolitos secundarios, los cuales no participan en las vías metabólicas primarias, pero si están presentes en las células y tejidos de plantas, animales y microorganismos (Pawlik, 2011).

4.1. Origen y generalidades de las esponjas

El filo Porifera es uno de los grupos de animales más antiguos que evolucionó del reino Metazoa (Pallela & Ehrlich, 2016), las esponjas han sobrevivido en el océano durante más de 600 millones de años, existiendo en todas las aguas, desde las dulces hasta las salinas, desde las intermareales hasta las aguas profundas, desde las tropicales hasta las congeladas, lo cual indica la tremenda capacidad que poseen para responder y adaptarse a las variadas condiciones ambientales durante este período (Mehbub *et al.*, 2014). Este filo tiene una división de cuatro clases de acuerdo a la constitución de su esqueleto (espículas): (i) Demospongiae, con espículas de tipo monoactinal, diactinal o tetractinal conformadas por SiO_2 y/o espongina (colágeno fibroso); (ii) Hexactinellida, también llamadas esponjas de vidrio, sus espículas son exclusivamente de SiO_2 , generalmente de seis rayos (hexactinales); (iii) Calcarea, con espículas de CaCO_3 que pueden ser diactinales, triactinales o tetractinales; y (iv) Homoscleromorpha, las cuales poseen un tipo único de espículas tetractinales de SiO_2 que no forman un esqueleto bien organizado (Wörheide *et al.*, 2012). Se conocen alrededor de 11,000 especies del filo Porifera; de las cuales la clase Demospongiae comprende el 80% a 90%, presenta una gran

diversidad y una alta importancia farmacéutica, Calcarea, Hexactinellida y Homoscleromorpha comprenden alrededor del 10% al 20% de las esponjas hasta ahora conocidas (Santhanam *et al.*, 2018).

Las esponjas son animales sésiles y su cuerpo está formado por distintos conjuntos de células con una organización anatómica simple, es decir, no forman órganos ni tejidos definidos, tampoco presentan un sistema inmunológico innato ni estructuras de defensa mecánicas (Calcabrini *et al.*, 2017). El tejido de las esponjas se compone de dos capas epiteliales celulares, una expuesta al medio ambiente y la otra en las cavidades internas donde se filtra el agua de mar, estas capas están separadas por una matriz gelatinosa denominada mesohilo, la cual contiene células para la digestión (Quévrain *et al.*, 2014), y otras células especializadas que se encargan de desempeñar funciones específicas como la reproducción (Santhanam *et al.*, 2018). Tanto la superficie como los epitelios internos están expuestos a diversos microorganismos (Figura 1).

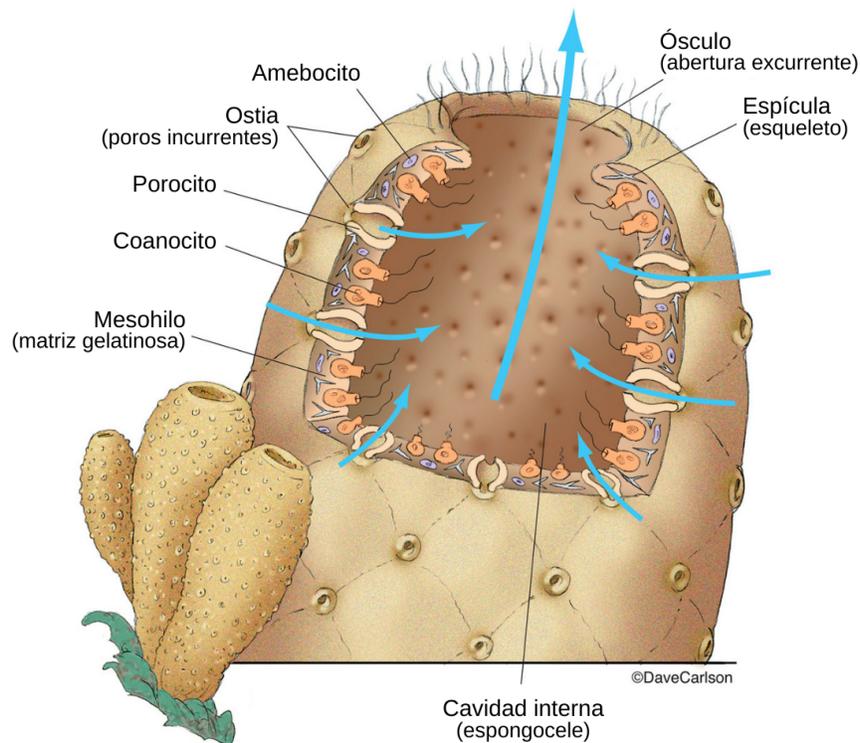


Figura 1. Estructura y anatomía de una esponja típica (esponja barril, filo *Porifera*). Imagen tomada y modificada de © [DaveCarlson/CarlsonStockArt.com](https://www.carlsonstockart.com/).

Las esponjas crean un flujo unidireccional de agua a través de su cuerpo, el agua ingresa por los poros diminutos, denominados ostia, y sale a través de una abertura más grande llamada ósculo (Santhanam *et al.*, 2018). En algunas esponjas, los ostia están formados por porocitos, células individuales en forma de tubo que actúan como válvulas para regular el flujo de agua en el espongocele, en otras esponjas, los ostia están formados por pliegues en la pared del cuerpo de la esponja (Libretexts, 2018). El flujo de agua necesario también es controlado por el movimiento de las células flageladas, *i.e.*, los coanocitos, que son específicos de las esponjas (Santhanam *et al.*, 2018) y, además, se encargan de atrapar y digerir las partículas de alimento, de absorber el oxígeno y de expulsar sustancias de desecho (Carballo *et al.*, 2014). Las esponjas también poseen un tipo de células conocidas como arqueocitos, estas tienen la capacidad de transformarse en cualquier otro tipo de célula que la esponja necesite, por ejemplo, algunos arqueocitos se transforman en amebocitos cuya función es servir como un sistema único de reparación celular y transportar alimento a través del cuerpo de la esponja (Carballo *et al.*, 2014).

A través de sus múltiples poros, las esponjas filtran grandes cantidades de agua hacia su cavidad central, lo cual les proporciona comida, oxígeno, salida de desechos (Santhanam *et al.*, 2018) y el entorno perfecto para albergar diversas comunidades microbianas como arqueas, bacterias, microalgas, esporas de hongos y protozoos (Radjasa *et al.*, 2011). Las especies del filo Porifera que establecen relaciones con consorcios microbianos densos y complejos son denominadas “bacterioesponjas” o HMA (esponjas de Alta Abundancia Microbiana, por sus siglas en inglés) y los microorganismos que las habitan pueden constituir hasta un 40% de su biomasa; además, ciertos microorganismos simbiotes de esponja producen metabolitos secundarios que podrían estar involucrados en la defensa química de sus hospederos (Schmitt *et al.*, 2011). Por el contrario, aquellas especies que carecen de densos consorcios microbianos se denominan LMA (esponjas de Baja Abundancia Microbiana, por sus siglas en inglés) (Schmitt *et al.*, 2011). En bacterioesponjas las densidades de simbiotes se aproximan a 10^{10} células/g de peso húmedo de esponja y las esponjas LMA albergan $10^5 - 10^6$ células/g de peso húmedo de esponja (Helber *et al.*, 2019). Por esta razón, las esponjas se describen

como holobiontes, ya que se componen de la esponja y el consorcio simbiote microbiano (Feng & Li, 2019).

Las esponjas, así como los demás organismos, interactúan con el ambiente en el que se encuentran y, en consecuencia, este influye en su diversidad, distribución, crecimiento y conducta (Deshpande & Thakur, 2020). Dichas interacciones y las respuestas a factores bióticos y abióticos son mediadas por sustancias químicas producidas por la esponja y se clasifican como metabolitos primarios y secundarios (Deshpande & Thakur, 2020), estos pueden ayudar a las esponjas a sobrevivir e impulsar su evolución, de hecho, existe evidencia de que algunos compuestos que se encuentran originalmente en las células de esponja son sintetizados por microorganismos asociados con esponjas, puesto que el mesohilo a menudo está habitado por microbios y muchos productos naturales obtenidos de poríferos se asemejan a metabolitos producidos por microbios marinos (Mehbub *et al.*, 2014).

4.2. Ambiente anquihalino: descripción e importancia

Los procesos kársticos que tuvieron lugar en los fondos rocosos del mar dieron lugar a la formación de cuevas submarinas, litorales y anquihalinas en muchas áreas marinas costeras del mundo (Gerovasileiou & Voultsiadou, 2012). Las cuevas submarinas presentan una serie distinta de desafíos; en este tipo de ecosistemas la fauna y el medio ambiente están limitados por la ausencia de luz, las diferencias de presión y temperatura, la cantidad de materia orgánica disuelta y la cantidad de oxígeno disponible y, por lo tanto, requieren un alto grado de especialización por parte de los organismos que las habitan, al mismo tiempo, son ecosistemas semiaislados y como resultado, la estructura de la comunidad en la zona oscura de cada cueva puede ser única y el tamaño de la población puede ser muy bajo (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018).

Las cuevas submarinas anquihalinas están influenciadas por las mareas dentro de terrenos kársticos, volcánicos y cavernosos que se extienden tierra adentro hasta el límite de penetración del agua de mar (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018);

estas cuevas son estuarios subterráneos en estratificados verticales con una masa de agua marina subterránea flotando en agua subterránea salina, separados por una interfaz de haloclina (capa de la columna de agua en la que la salinidad cambia rápidamente con la profundidad), estos ecosistemas se caracterizan por estar semiaislados con baja concentración de oxígeno disuelto, oscuridad total y altas tasas de endemismo (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020). Desde el punto de vista geológico, suelen ser de interés dos tipos de cuevas: cuevas anquihalinas que se encuentran en calizas karstificadas y otras que están en campos de lava, a menudo contienen formaciones de goteo (como estalactitas y estalagmitas), lo que indica su propia naturaleza continental y terrestre anterior; las calizas pueden ser de diferentes edades; algunas son viejas y principalmente compactas, mientras que otras son calizas de coral de formación bastante reciente y aún principalmente porosas o arrecifes de coral poco transformados (Sket, 2019).

Los estudios sobre cuevas anquihalinas aumentaron exponencialmente en las últimas cuatro décadas, sin embargo, todavía están entre los ecosistemas menos conocidos debido a la necesidad del buceo profundo para estudiarlos adecuadamente (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020). Es esencial comprender y proteger estos frágiles ecosistemas anquihalinos para evitar la pérdida de biodiversidad y la alteración permanente de la estructura y función de su comunidad (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018). En cuevas del Mediterráneo se ha observado que Porifera es el grupo dominante en términos de riqueza y densidad de especies, no obstante, los estudios de Porifera de las cuevas anquihalinas del Gran Caribe se limitan (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020), debido a que este tipo de ecosistemas son de muy difícil acceso, su bibliografía es escasa y ampliamente dispersa, y los estudios rara vez especifican ubicaciones reales, de hecho, en México, las cuevas anquihalinas solo se encuentran en la Península de Yucatán, con 2241 cenotes registrados, a partir de una estimación de más de 5000, incluido el sistema de cuevas submarinas más largo del mundo con 332.9 km (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2017). En cuevas subacuáticas mexicanas, se han registrado organismos pertenecientes a los filos Porifera, Cnidaria, Gastrotricha, Tardigrada, Nematoda, Annelida, Arthropoda (Crustacea), Echinodermata y Chordata (Calderón-Gutiérrez *et*

al., 2017). Además de los animales, las cuevas anquihalinas están habitadas por una rica microbiota, distribuida en un patrón complejo (Sket, 2019).

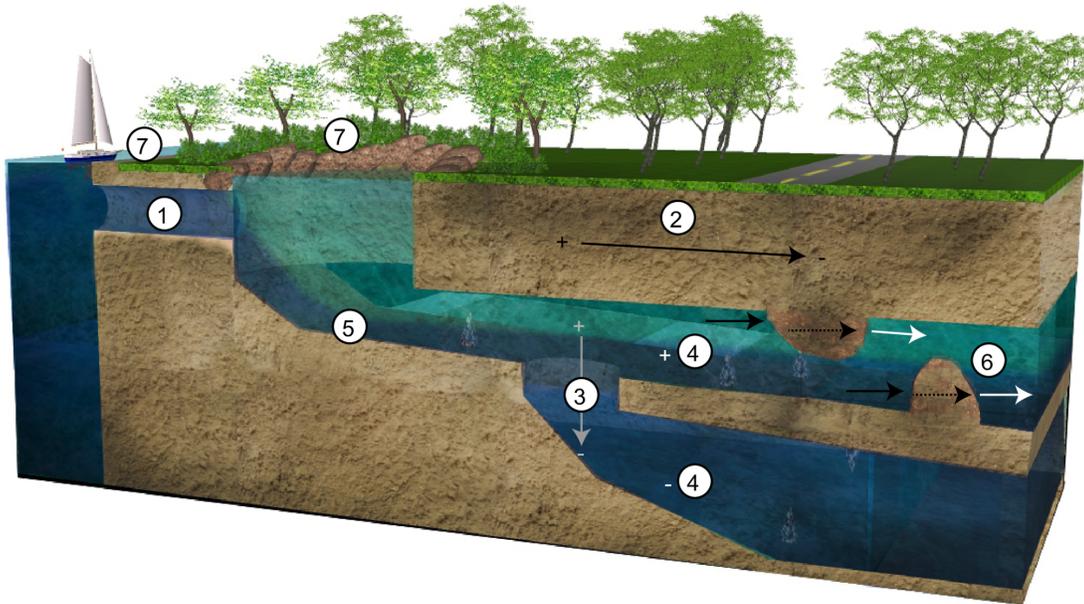


Figura 2. Esquema de los 7 patrones ecológicos que determinan la riqueza de especies, composición taxonómica y densidad esperada en una cueva anquihalina. Tomado de Calderón-Gutiérrez *et al.* (2018).

En 2018 Calderón-Gutiérrez *et al.*, realizaron un estudio de cuatro cuevas anquihalinas, todas en la Isla de Cozumel: “La Quebrada”, “El Aerolito”, “Tres Potrillos” y “Bambú”, los resultados demostraron que la composición y riqueza específica de cada cueva anquihalina es única y que esta depende, principalmente, de siete patrones ecológicos (Figura 2): (1) las cuevas con conexión directa al mar tienen una mayor riqueza y diversidad, ya que esto permite la entrada de organismos como el plancton y fuentes de energía importantes que incluyen materia orgánica disuelta y particulada ; (2) la riqueza y la densidad de especies disminuye a medida que aumenta la distancia lineal desde el mar e incluso dentro de la misma cueva, debido a que la materia orgánica disponible se reduce, de hecho, se ha observado que la mayor riqueza de especies en cuevas terrestres y submarinas ha sido reportada cerca de sus entradas; (3) la riqueza de especies también se ve disminuida a medida que aumenta la profundidad del agua dentro de la misma cueva, esto es consecuencia de que se transporta menos materia orgánica a las partes más profundas de la cueva; (4) la existencia de una capa de haloclina aumenta

drásticamente la riqueza, sin embargo, la geomorfología de algunas cuevas anquihalinas provoca que no todas las secciones tengan haloclina y, en consecuencia, hay una disminución drástica en la riqueza y densidad de especies porque los animales no tienen acceso a múltiples capas de agua, ya que la haloclina funciona como una membrana transportadora de materia orgánica desde los ambientes superficiales creando múltiples capas y múltiples entornos; (5) en áreas donde la haloclina se encuentra cerca del fondo la riqueza disminuye, como las cuevas anquihalinas están bajo la influencia de las mareas, estas generan cambios de profundidad en la haloclina, en el caso de un aumento en la profundidad la fauna está expuesta a un estrés térmico y osmótico abrupto; (6) las discontinuidades, como las barreras físicas, en la morfología de la cueva provocan que existan zonas secas, zonas con una sola capa de agua y/o zonas con diferente salinidad, dando como resultado la presencia de diferentes estructuras comunitarias en secciones de la misma cueva; y (7) si hay otros ecosistemas en las entradas del ecosistema anquihalino, estos determinan la cantidad y calidad de la materia orgánica así como la fauna que ingresa a la cueva, por ello se esperaría una mayor densidad de especies en cuevas que están conectadas con ecosistemas exportadores de energía, como los manglares, o en cuevas que tienen múltiples conexiones al mar o a la superficie terrestre (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018).

4.3. Análisis del microbioma de esponja

Los metabolitos primarios son aquellos que conciernen al proceso del ciclo de vida como el crecimiento, la nutrición, el desarrollo y la reproducción, por otro lado, los metabolitos secundarios son moléculas que se encargan de la defensa contra competidores, depredadores, organismos incrustantes y patógenos, también median la comunicación con otros organismos y con sus simbioses, alertando contra posibles peligros (Deshpande & Thakur, 2020). Por ejemplo, las esponjas, al ser organismos sésiles, no pueden escapar cuando se enfrentan a un depredador, por lo que liberan metabolitos secundarios almacenados que tienen propiedades citotóxicas, antibióticas y disuasorias de alimentación, al igual que algunas sustancias químicas las cuales evitan el asentimiento de organismos incrustantes en

la superficie de la esponja y restringen la competencia con los vecinos por el espacio que ocupan (Mehbub *et al.*, 2014).

Para acceder a la diversidad de los microbios asociados a las esponjas que se encargan de producir metabolitos secundarios con métodos independientes de cultivo, se debe llevar a cabo la secuenciación del gen 16S ARNr (Moitinho-Silva *et al.*, 2017). En un organismo existen diferentes tipos de ARNr, las bacterias y arqueas (microorganismos comúnmente asociados a esponjas) producen tres tipos: 16S, 23S y 5S (Madigan *et al.*, 2015). Sin embargo, la secuenciación del 16S ARNr es la mejor opción para la clasificación de microorganismos, debido a que esta molécula es reconocida como un poderoso marcador universal por varias razones: (i) contiene nueve regiones hipervariables (V1 - V9) (Figura 3), que aportan información útil para estudios de filogenia y taxonomía; (ii) contiene zonas conservadas que son de gran ayuda para el diseño de cebadores universales y permiten la amplificación de las diversas zonas hipervariables (Valenzuela-González *et al.*, 2015), también son útiles para determinar los taxa de mayor rango, mientras que las zonas hipervariables pueden ayudar a identificar el género o la especie (Bukin *et al.*, 2019); y (iii) porque posee una longitud adecuada que permite su extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

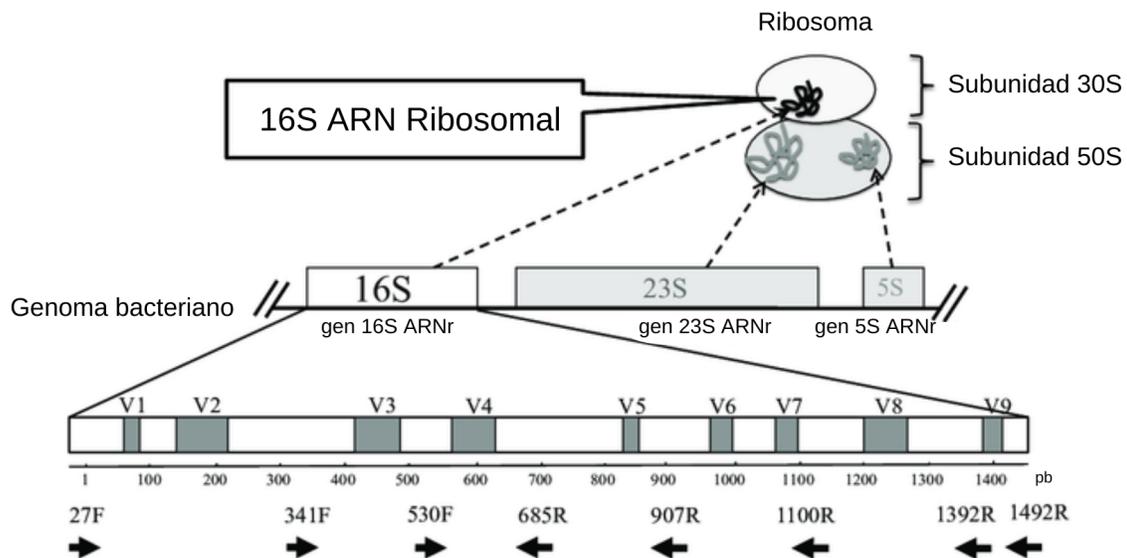


Figura 3. Esquema del complejo ribosomal y el gen 16S ARNr. Los cuadros blanco y gris indican regiones conservadas e hipervariables (V1 - V9) respectivamente. Las flechas muestran las

posiciones aproximadas de cebadores universales en la secuencia del gen 16S ARNr de *Escherichia coli*. F (del inglés *forward*) se refiere a la secuencia sentido 5' - 3' y R (del inglés *reverse*) a la secuencia antisentido 3' - 5'. Tomado y modificado de Fukuda *et al.* (2016).

Es posible conocer la complejidad de las comunidades microbianas asociadas a esponjas empleando la tecnología de secuenciación masiva (NGS, del inglés *Next-generation sequencing*) y análisis bioinformático del gen 16S ARNr, ya que este marcador universal ha demostrado ser muy útil para describir y caracterizar a las comunidades microbianas marinas, especialmente a los organismos no cultivados, se sabe que aproximadamente el 99% de los microorganismos en un ambiente natural no son cultivables (Valenzuela-González *et al.*, 2015). La secuenciación masiva permite el análisis de la composición taxonómica y abundancia relativa de las comunidades microbianas de una muestra, aunque también se puede realizar este análisis mediante la secuenciación completa de todos los genomas, es decir, del metagenoma; pero implica mayor costo y requiere un análisis más complejo y detallado, por lo que este proyecto no se enfoca en el análisis metagenómico (Hernández *et al.*, 2020).

Los estudios de microbiomas actuales, se enfocan en el análisis de secuencias del gen 16S ARNr para la identificación taxonómica de cepas bacterianas y arqueas, este tipo de análisis se ha convertido en un estándar para la taxonomía procariótica; aunque el uso de NGS tiene desventajas, provocadas principalmente por la longitud de lectura más corta, la cual provoca la disminución de la precisión en la identificación de especies (Bukin *et al.*, 2019). La mayoría de las secuenciaciones se basan en la plataforma Illumina, que produce lecturas de extremo único de hasta 350 pb y lecturas de extremo emparejado de hasta 300-350 pb; como las lecturas de NGS son cortas, requieren una elección mucho más rigurosa de la región 16S ARNr para describir de manera precisa y completa la diversidad de una comunidad bacteriana (Bukin *et al.*, 2019).

Existen diversos estudios sobre la caracterización de comunidades bacterianas de esponjas usando el gen 16S ARNr (de aprox. 1500 pb) como marcador, aunque, las secuencias son parciales y corresponden a distintas regiones hipervariables del gen amplificadas por un par de cebadores específicos según la

región que se desee analizar, sin embargo, distintos estudios han demostrado que no todas las regiones hipervariables son aptas para detectar ciertos organismos, por ejemplo, en un análisis de poblaciones microbianas de sedimentos utilizaron la región V3 en lugar de la secuencia completa y observaron que la diversidad estimada fue menor, en la caracterización de comunidades microbianas de aguas residuales, el análisis del fragmento que contenía a las regiones V1-V2 no fue suficiente para detectar organismos de los filos Verrucomicrobia, Planctomycetes y Chlamydiae, en otro estudio, analizaron distintas muestras entre sí, como intestino humano y chimeneas submarinas (fuentes hidrotermales), y demostraron que cada región del gen 16S proporcionaba diferente diversidad de riqueza: con la región V3 registraron 42 taxa y con la V6 solamente 26 (Valenzuela-González *et al.*, 2015). Bukin *et al.* (2019) estudiaron las comunidades bacterianas de la columna de agua y los sedimentos del fondo del Lago Baikal y encontraron que el análisis de los fragmentos de V2-V3 y V3-V4 producen estimaciones similares de diversidad de especies, que las regiones del fragmento V2-V3 proporcionaron una mejor resolución con respecto a especie/género que V3-V4, pero también es posible que el fragmento V3-V4 de algunas comunidades microbianas delinee mejor la estructura de la comunidad. En varios estudios, los amplicones secuenciados de las regiones V3-V4, permiten caracterizar a la comunidad bacteriana coexistente, con la posibilidad de identificar todas las especies de una muestra (Hernández *et al.*, 2020)

Las razones detrás de estas peculiaridades en la identificación taxonómica bacteriana realizada utilizando diferentes fragmentos de 16S ARNr pueden estar relacionadas con las funciones de las zonas hipervariables, en general, la función esencial del 16S ARNr es participar en el proceso de traducción, con respecto a la función, las nueve regiones se pueden separar en tres clases: (i) V4, V5 y V6, que intervienen directamente en la traducción y son los encargados de unir los ARNt e interactuar con el 23S ARNr, son las más conservadas y acumulan mutaciones lentamente, por lo que, a nivel filogenético, son lo suficientemente distintas en taxa superiores como filo y clase; (ii) V3 y V7, cuyo papel en la traducción está poco estudiado actualmente, son las más variables y son diferentes entre órdenes y familias; (iii) V2 y V8, son responsables de mantener la estabilidad estructural del

16S ARNr , son las más rápidas de evolución y pueden distinguir géneros dentro de una familia y especies dentro de un género (Bukin *et al.*, 2019). Debido a todo lo anterior, algunos autores recomiendan el uso combinado de diferentes pares de cebadores, diferentes técnicas de extracción de ADN y una secuenciación profunda del ADNg obtenido de la comunidad bacteriana (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

A pesar de las desventajas, el empleo del gen 16S ARNr como marcador universal sigue siendo la herramienta más fuerte para el estudio de las comunidades bacterianas de todos los ambientes, debido a que las taxonomías microbianas basadas en genomas tienen una serie de limitaciones, incluida la baja resolución filogenética (Park & Won, 2018); por ello, el manejo y análisis de una gran cantidad de información de secuencias del 16S ARNr han impulsado el desarrollo de bases de datos específicas, algoritmos y herramientas computacionales especializadas para comparar miles de secuencias semejantes y hacer la asignación taxonómica (Valenzuela-González *et al.*, 2015) que es fundamental para todos los estudios de microbiología (Park & Won, 2018). Aunque el gen 16S ARNr originalmente se utilizó para la identificación de bacterias, hoy en día es utilizado como un estándar en la clasificación e identificación de microorganismos y las secuencias están disponibles en bases de datos especializadas que recolectan únicamente secuencias 16S, algunas de ellas, como Greengenes no se encuentran actualizadas, pero permiten el acceso y descarga de las secuencias registradas (Valenzuela-González *et al.*, 2015), la última actualización de la base de datos Greengenes se publicó en mayo de 2013 (Park & Won, 2018), y el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), donde los archivos de clasificación taxonómica se actualizan diariamente (Balvočiūtė & Huson, 2017).

Algunas bases de datos públicas son SILVA, RDP, Greengenes, EzTaxon y EzBioCloud: SILVA es una base de datos de ARNr de alta calidad que alberga secuencias tanto de 16S/18S como de 23S/28S para los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya; RDP es un portal de la Universidad Estatal de Michigan (EUA) que contiene más de tres millones de secuencias de bacterias, arqueas y hongos, tanto cultivables como no cultivables (Valenzuela-González *et al.*, 2015); Greengenes es la

base de datos más popular y ampliamente utilizada, ya que es la base de datos predeterminada en QIIME (Información Cuantitativa sobre la Ecología Microbiana, por sus siglas en inglés), proporciona taxonomía bacteriana y arqueal basada en árboles filogenéticos (Park & Won, 2018); EzTaxon tiene las secuencias 16S de cepas bacterianas de especies identificadas y no cultivadas asociadas a más de 64,000 especies y filotipos (Valenzuela-González *et al.*, 2015); y la base de datos EzBioCloud proporciona información sobre bacterias, arqueas y eucariotas y está diseñada principalmente para la identificación a nivel de especie; entre estas bases de datos, no es fácil concluir que una base de datos es superior a otras, porque cada una tiene sus ventajas y desventajas (Park & Won, 2018).

4.4. Programa de análisis bioinformático: QIIME2

Dos herramientas bioinformáticas ampliamente usadas en el análisis de la microbiota presente en una muestra son MOTHUR y QIIME, que recientemente han lanzado su segunda versión; QIIME dispone de tutoriales para ser ejecutados por línea de comando en la terminal y los archivos generados pueden ser visualizados en la web (<https://qiime2.org/>) (Hernández *et al.*, 2020). La ventaja de utilizar plataformas de análisis como MOTHUR y QIIME es que los procedimientos ya están preparados como una única plataforma de software empaquetado donde los protocolos de análisis se resumen en tutoriales fáciles de seguir para estudiar comunidades microbianas y se pueden emplear como plantillas para crear procedimientos de análisis personalizados de estudios microbianos basados en NGS (H. Kim *et al.*, 2020).

El proceso de análisis en QIIME2 consta de una serie de pasos: el análisis primario, importación de secuencias y control de calidad; el secundario, ensamblado y alineamiento contra bases de datos específicas; y el terciario, generación de los resultados (Hernández *et al.*, 2020). Pasar de las lecturas de secuencia obtenidas en la secuenciación a la asignación de perfiles taxonómicos o medidas de diversidad requiere una serie de transformaciones de datos ejecutadas por herramientas computacionales como el filtrado de calidad de secuencia, alineaciones de secuencia, construcción de filogenia, bases de datos y herramientas diseñadas

específicamente para el análisis de marcadores genéticos; el paquete de software QIIME2 puede simplificar el análisis de genes marcadores del 16S ARNr y transformar las secuencias crudas en gráficos de barras taxonómicas, árboles filogenéticos, análisis de coordenadas principales y otras visualizaciones de la diversidad microbiana (Hall & Beiko, 2018).

Los datos de secuencia deben estar en formato FASTQ, un formato de archivo de computadora basado en texto para almacenar tanto una secuencia biológica (secuencia de nucleótidos) como sus puntajes de calidad correspondientes (H. Kim *et al.*, 2020), los metadatos de la muestra se almacenan en un archivo de texto separado por tabulaciones, en QIIME2, hay dos tipos principales de archivos de entrada/salida, artefactos QIIME (*.qza) y visualizaciones QIIME (*.qzv), los artefactos QIIME almacenan el conjunto de datos que resultan de un paso ejecutado en el proceso de análisis (Hernández *et al.*, 2020). Un paso sumamente importante en el análisis de los datos de secuenciación es la asignación de lectura a unidades taxonómicas, en este proceso se emplea alguna o varias de las bases de datos mencionadas anteriormente y se realiza un alineamiento las lecturas con las secuencias de referencia (Balvočiūtė & Huson, 2017); la asignación de filo, clase, orden, familia, género o especie se realiza por comparación contra bases de datos como la RDP, Greengenes, SILVA, el servidor web del CGE, o bien realizando un alineamiento empleando la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés) de la base de datos del NCBI (Hernández *et al.*, 2020)

4.5. Ensayo de actividad metabólica MTT

Entre los numerosos métodos que asocian el nivel de actividad enzimática con la condición de la población microbiana, los ensayos basados en biotransformaciones de sales de tetrazolio han ganado mucha popularidad, el bromuro de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es uno de los ejemplos más comunes de sales de tetrazolio utilizadas en bioensayos para estimar la actividad metabólica de las células vivas: la prueba se basa en la reducción enzimática de la sal de tetrazolio de color amarillo claro a su formazán de color

púrpura intenso (Figura 4), que se puede cuantificar espectrofotométricamente y, en condiciones adecuadamente optimizadas, el valor de absorbancia obtenido es directamente proporcional al número de células vivas (Grela *et al.*, 2018). MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica celular, su fundamento se basa en la capacidad de las enzimas oxidoreductasas para reducir el colorante de tetrazolio MTT a su formazán insoluble, que tiene un color púrpura, así mide la viabilidad celular en términos de actividad reductora como la conversión enzimática del compuesto de tetrazolio en cristales de formazán insolubles en agua por deshidrogenasas que se producen en las mitocondrias de las células vivas, aunque también están involucrados agentes reductores y enzimas ubicadas en otros orgánulos (Kuetze *et al.*, 2017).

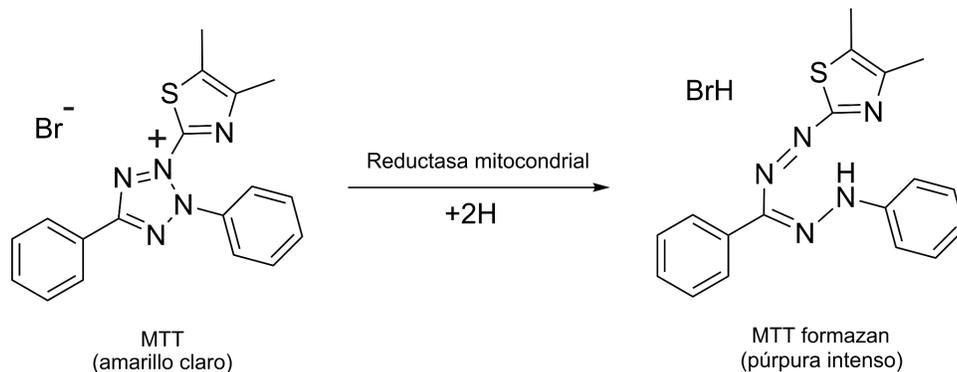


Figura 4. Reducción del bromuro de MTT a su formazán. Tomado y modificado de Grela *et al.* (2018).

En el ensayo se agrega una solución de solubilización (dimetilsulfóxido, solución de etanol acidificado, o una solución del detergente dodecil sulfato de sodio en ácido clorhídrico diluido) para disolver el producto de formazán púrpura insoluble en una solución coloreada, la absorbancia de esta solución coloreada se puede cuantificar midiendo a una cierta longitud de onda: generalmente entre 500 y 600 nm, mediante un espectrofotómetro (Kuetze *et al.*, 2017). Los procedimientos basados en MTT se aplican ampliamente a líneas celulares de mamíferos, bacterias y hongos: en ensayos microbiológicos, las estimaciones básicas de susceptibilidad en microplacas de 96 pozos son la práctica más común, MTT se puede aplicar en distintos protocolos, por ejemplo, para la determinación de bacterias multirresistentes, evaluación de la formación de biopelículas o incluso cuantificación indirecta de

compuestos y/o extractos antibacterianos (Grela *et al.*, 2018). Ejemplos de cepas bacterianas que se han probado utilizando el ensayo MTT son: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Vibrio fluvalis* (Grela *et al.*, 2018).

5. Antecedentes

5.1. Diversidad microbiana asociada a esponjas

Las esponjas albergan poblaciones microbianas muy diversas, que pueden incluir miembros de los tres dominios celulares de la vida: bacterias, arqueas y eucariotas, los miembros de este último dominio incluyen dinoflagelados, hongos y microalgas; existiendo un historial de productos farmacéuticos derivados de hongos (Fuerst, 2014; Orlić, 2019). Sin embargo, son las bacterias quienes se han estudiado con mayor detalle, ya que se han detectado repetidamente en muchas esponjas alrededor del mundo, aunque se ha observado que los microbios específicos de las esponjas se encuentran principalmente en las bacterioesponjas o esponjas HMA, mientras que las esponjas LMA suelen tener una diversidad microbiana mucho menor y un perfil microbiano diferente (Schmitt *et al.*, 2011). Según el estudio efectuado por Feng & Li (2019), los simbiontes de esponja comprenden hasta 52 filos bacterianos y 2 filos arqueales con variaciones significativas en los niveles de riqueza entre las distintas especies de Porifera. Los filos dominantes de bacterias simbióticas en las esponjas marinas son Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Acidobacteria, y Cyanobacteria, estos microorganismos son conocidos por producir metabolitos secundarios bioactivos como policétidos, alcaloides, ácidos grasos, péptidos y terpenos; mientras que los filos dominantes de arqueas son Crenarchaeota y Thaumarchaeota (Pallela & Ehrlich, 2016). Los datos de las secuencias del gen 16S ARNr han sido útiles para definir la diversidad microbiana asociada a las esponjas, y la secuenciación de próxima generación ha permitido estudios a mayor escala de miles de tales secuencias (Fuerst, 2014).

Se han realizado varios estudios globales para investigar y comparar microbiomas del filo Porifera con el objetivo de crear un recurso integral de datos de comunidades microbianas asociadas a esponjas (Moitinho-Silva *et al.*, 2017). En los tres estudios que se presentan a continuación, una característica común es que exista una alta similitud entre los microorganismos asociados a esponjas, por ello, en la literatura se introdujo el término “específico de esponja” que se refiere a todos los

microbios que se detectaron repetidamente en esponjas alrededor de la Tierra, pero que son diferentes de las comunidades de agua de mar (Orlić, 2019). El hallazgo de simbiontes específicos de esponjas es importante para la biotecnología, debido a que puede haber especies microbianas únicas en esponjas que no se encuentran en otros hábitats marinos, por lo que pueden estar disponibles para proyectos de biodescubrimiento (Fuerst, 2014). A continuación se describe los resultados de los principales estudios de la diversidad microbiana asociada a esponjas:

(i) En el estudio hecho por Schmitt *et al.* (2011) se recolectaron 32 especies de esponjas de ocho diferentes ubicaciones en los océanos de todo el mundo, de estas especies se analizaron fragmentos del gen 16S ARNr que incluye la región hipervariable V3 y los compararon con las bases de datos SILVA y RDP (El Proyecto de la Base de Datos Ribosómica, por sus siglas en inglés), encontraron que sus microbiomas comprenden 25 filos, de los cuales Proteobacteria, Chloroflexi, Poribacteria, Acidobacteria, Actinobacteria y Cyanobacteria constituyen la mayor diversidad, y le siguen en proporción descendente los filos Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Nitrospirae, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Lentisphaerae, Chlamydiae y Deinococcus-Thermus, con las clases Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- y Epsilonproteobacteria, así como Anaerolineae, Flavobacteriia, Sphingobacteria y Clostridia. A nivel orden encontraron que Rhodobacterales, Chromatiales, Oceanospirillales, Caldilineae, Acidobacteriales, Rubrobacteridae y Chloroplast fueron los más abundantes. Muchos de estos grupos bacterianos detectados son productores reconocidos de sustancias bioactivas, por ejemplo; Streptosporangineae dentro de Actinobacteria y Rhodobacteraceae, Pseudoalteromonas y Sphingomonadaceae dentro de Proteobacteria, lo que destaca el potencial de las esponjas como fuente de nuevos productos naturales (Schmitt *et al.*, 2011).

(ii) En 2016, Thomas *et al.*, presentaron una encuesta global de microbiomas de 81 especies de esponjas con análisis de la región V4 del gen 16S ARNr, clasificaron las secuencias basándose en las taxonomías SILVA, GreenGenes y RDP, los resultados mostraron el gran reservorio microbiano que poseen las esponjas

siendo Proteobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Crenarchaeota, Acidobacteria y Actinobacteria, los filos dominantes en la mayoría de esponjas analizadas, con abundancias relativamente altas siguen Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Firmicutes, Spirochaetes y Poribacteria, y en abundancias menores Chlamydiae, Parvachaeota, Thermi, Euryarchaeota, Lentisphaerae, Armatimonadetes, Elusimicrobia y Tenericutes (hoy conocido como Mycoplasmatota), además destacaron las clases Alpha-, Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria, también detectaron los géneros *Caldithrix* y *Chlorobi*.

Finalmente, y uno de los estudios más importantes; (iii) el “Proyecto del Microbioma de la Esponja” del EMP realizado por Moitinho-Silva *et al.* (2017), en el cual analizaron muestras de 268 especies de esponjas marinas junto con muestras de agua marina y sedimentos alrededor de todo el mundo (incluyendo muestras de la Península de Yucatán), las secuencias se alinearon con la región V4 del gen 16S ARNr de la base de datos SILVA, GreenGenes y RDP, sus resultados exhibieron que Proteobacteria conforma más del 50% de la abundancia relativa en el microbioma global, seguido por Chloroflexi, Cyanobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Crenarchaeota, con abundancias del 10% aproximadamente, y los menos abundantes, Firmicutes, Poribacteria, Gemmatimonadetes y Nitrospirae. Las clases más abundantes fueron Alpha-, Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria, Anaerolineae, Caldilineae, Synechococcophycideae, Chloroplast, Holophagae, Acidimicrobiia, Cytophagia, Flavobacteriia y Clostridia, también se encontró el orden Nitrosopumilales.

5.2. Funciones generales del microbioma asociado a las esponjas

Las esponjas crean estrechas relaciones con consorcios de microorganismos que son responsables de la producción de moléculas bioactivas en el hospedero, los microorganismos pueden ser fuente de alimento, parásitos/depredadores, o simbiontes mutualistas. Se han descubierto varias funciones que llevan a cabo los simbiontes de las esponjas, entre ellos, la defensa química, nutrición, supervivencia y adaptación (Quévrain *et al.*, 2014). Las bacterias proporcionan productos de su

metabolismo a sus hospederos, lo que otorga a la esponja acceso a rasgos específicos de las bacterias, como la autotrófia, la fijación de nitrógeno y la nitrificación (Mehbub *et al.*, 2014). Otros ejemplos muestran que las bacterias asociadas a esponjas pueden procesar compuestos de desechos metabólicos, estabilizar el esqueleto de la esponja y proporcionar protección contra la radiación UV (Quévrain *et al.*, 2014), sin embargo, el ejemplo más destacado de simbiosis bacteriana de esponja, es la participación de bacterias en la producción de metabolitos bioactivos que tienen un papel en la defensa de su hospedero (Mehbub *et al.*, 2014). En general, los simbiosiontes de esponja son capaces de realizar distintos procesos biogeoquímicos como nitrificación, fijación de nitrógeno, reducción de sulfatos, y fotosíntesis (Schmitt *et al.*, 2011), sintetizar vitaminas, producir compuestos bioactivos y llevar a cabo transformaciones bioquímicas de nutrientes o productos de desecho (Moitinho-Silva *et al.*, 2017). A cambio, los simbiosiontes encuentran en su hospedero materia orgánica para su nutrición, oxígeno y agua filtrada en las cavidades internas (Quévrain *et al.*, 2014).

La nutrición heterótrofa de las esponjas es la manera más común de metabolismo del carbono; a través del consumo de microorganismos filtrados y/o absorción de carbono orgánico disuelto (DOC, por sus siglas en inglés) (Feng & Li, 2019). Las esponjas son responsables de completar el ciclo de carbono alimentándose de DOC y produciendo POC (carbono orgánico particulado) en forma de detritos celulares arrojados (coanocitos) (Pawlik & McMurray, 2020). Muchas especies de esponjas albergan poblaciones de cianobacterias y zooxantelas con propiedades fotosintéticas y se estima que las contribuciones de las cianobacterias a la asimilación del carbono representan hasta el 80% del carbono total disponible en las esponjas (Feng & Li, 2019), los simbiosiontes de cianobacterias, especialmente del género *Synechococcus*, son los principales contribuyentes de carbono a distintas especies de esponjas que se encuentran en una amplia variedad de ubicaciones geográficas (Zhang *et al.*, 2019).

Las bacterias obtienen energía de la luz y la convierten en energía química para fijar el dióxido de carbono de la atmósfera, sin embargo, muchos procariontes,

llamados quimiótrofos, pueden obtener energía oxidando o reduciendo compuestos como hidrógeno, amoníaco, nitrato, sulfuro, metano, sulfato y iones metálicos en procesos independientes de la luz (Orlić, 2019). La vía de fijación quimiotrófica de CO_2 en esponjas es llevada a cabo por algunos géneros del filo Thaumarchaeota como Nitrosopumilus, Nitrosoarchaeum y Nitrososphaera; además, algunos linajes microbianos del filo Proteobacteria pueden oxidar el carbón orgánico a CO_2 por la vía aeróbica (Feng & Li, 2019). Otro proceso quimioautotrófico que se ha observado en esponjas es la simbiosis metanotrófica, mediada por microorganismos pertenecientes a los órdenes Methylococcales, Methylophylales y Chromatiales del filo Proteobacteria (Feng & Li, 2019). Ciertos genes implicados en la degradación y asimilación del carbono orgánico en esponjas, han sido detectados en los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, y Proteobacteria (Feng & Li, 2019).

El nitrógeno también es un nutriente importante, ya que se requiere para la síntesis de aminoácidos; los procesos metabólicos que se han identificado en esponjas incluyen fijación del nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, asimilación de NH_3 y NO_3^- , entre otros (Feng & Li, 2019). Proteobacteria parece ser el único filo que contribuye a todas las transformaciones de nitrógeno en esponjas, aunque otros contribuyentes destacables son Planctomycetes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes y Verrucomicrobia (Zhang *et al.*, 2019). Se han encontrado genes de fijación de nitrógeno que pertenecen a los filos Cyanobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Feng & Li, 2019); este proceso metabólico requiere condiciones anaeróbicas, por lo cual debe ocurrir en regiones anóxicas dentro a la esponja o en compartimientos anaeróbicos dentro de las bacterias, y las cianobacterias cuentan con dichos compartimientos que limitan la difusión de O_2 (Zhang *et al.*, 2019).

Las esponjas producen NH_3 como parte de sus desechos metabólicos; el flujo de nitrógeno más común en esponjas que median la nitrificación es la producción de NO_2^- y NO_3^- , se hipotetiza que el NH_3 y NO_2^- se acumulan dentro de la esponja y su posterior conversión a NO_3^- es una solución para eliminar compuestos tóxicos cuando rebasan cierta concentración en el hospedador (Feng & Li, 2019). Algunos

estudios de esponjas sugieren que las arqueas oxidantes de NH_3 (AOA, por sus siglas en inglés) son la principal población funcional oxidante de amoníaco, especialmente los géneros *Cenarchaeum* y *Nitrosopumilus*, en comparación con las bacterias oxidantes de NH_3 ; sin embargo, el linaje dominante de bacterias oxidantes de NO_2^- (NOB) es *Nitrospira* sp. (Feng & Li, 2019). La desnitrificación es la transformación de NO_3^- a N_2 , este proceso es catalizado por microorganismos de los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Thaumarchaeota, entre otros; los microbios simbióticos utilizan los productos de desecho como una forma de limpiar el tejido de la esponja de compuestos nocivos (Feng & Li, 2019). Este metabolismo es particularmente evidente para las esponjas HMA que albergan microbios nitrificantes, los cuales también pueden absorber NH_4^+ , aunque esto podría deberse también a fotosimbiontes u oxidación anaeróbica del amonio (anammox) (Pawlik & McMurray, 2020).

La conversión de NH_3 y NO_2^- a N_2 en condiciones anaerobias es llamada la reacción anammox, los microorganismos que la llevan a cabo son bacterias especiales del filo Planctomycetales, algunos géneros que se han encontrado presentes en esponjas son Planctomycetes, Rhodopirellula y Planctomyces (Feng & Li, 2019). En cuanto al proceso de reducción de NO_3^- a NH_3 a través del NO_2^- se ha detectado la contribución de los linajes Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Planctomycetes, las bacterias lo llevan a cabo para incorporar amoníaco para el crecimiento celular (Feng & Li, 2019). La mineralización del amoníaco es la conversión de nitrógeno orgánico disuelto a amoníaco inorgánico, un proceso representativo es la hidrólisis de la urea en amoníaco, los microorganismos que contienen genes capaces de realizar este metabolismo son de los taxa Proteobacteria, Magnetococcus, Cyanobacteria y Actinobacteria (Feng & Li, 2019).

Aparte del metabolismo de carbono y nitrógeno, se ha detectado un metabolismo del azufre mediado microbianamente en esponjas, el gen que codifica una enzima clave para la reducción de SO_4^{2-} y la oxidación de S^{2-} se ha detectado en muchos procariontes; está presente en bacterias oxidantes de azufre (SOB, por sus siglas en inglés), bacterias reductoras de sulfato (SRB) y arqueas reductoras de

sulfato (SRA) (Jensen *et al.*, 2016). Es probable que los procesos microbianos como la oxidación y nitrificación del azufre tengan la función de eliminar productos finales metabólicos que son tóxicos para la esponja, como el H₂S y NH₃; los taxóns de esponjas que usan azufre en el metabolismo energético son miembros de Alpha- y Gammaproteobacteria, Archaeoglobi, y posiblemente Deltaproteobacteria; Deltaproteobacteria se ha relacionado remotamente con las SRB, mientras que Alpha- y Gammaproteobacteria estaban afiliadas a SOB y las SRA al filo Euryarchaeota, sin embargo, para aclarar por completo las capacidades metabólicas del microbioma de la esponja, se necesitan estudios que apliquen nuevas técnicas de aislamiento y secuenciación de células individuales, combinadas con análisis metagenómicos y transcriptómicos (Jensen *et al.*, 2016).

5.3. Microorganismos productores de metabolitos secundarios

En 2020, Cheng *et al.*, publicaron una revisión más completa y descriptiva de 774 nuevos productos naturales derivados de la asociación simbiótica microbio-esponja en las últimas dos décadas, de 1998 a 2017 (Figura 5). Las principales regiones con microorganismos derivados de esponjas relacionados con la química de productos naturales son zonas marinas templadas y tropicales, donde destacan el Golfo de México y las islas del Caribe como algunos de los puntos más activos (Cheng *et al.*, 2020).

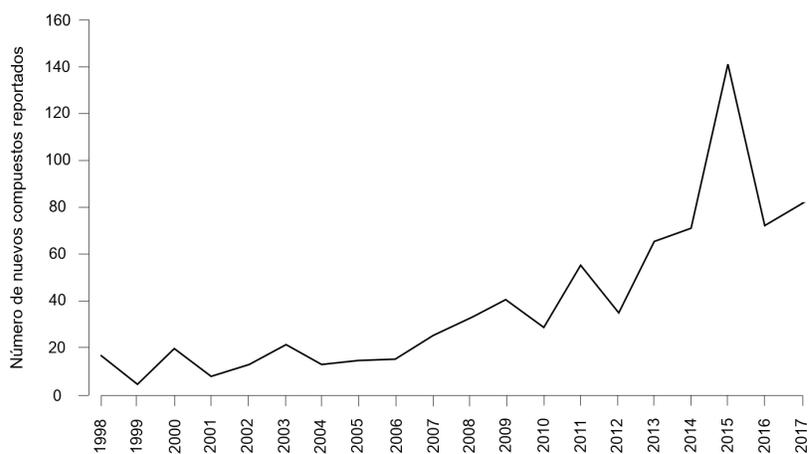


Figura 5. Nuevos compuestos de microorganismos asociados a esponjas durante 1998 a 2017. En el período de 2012 a 2017 aumentaron significativamente los compuestos obtenidos. Tomado y modificado de Cheng *et al.* (2020).

Los datos estadísticos mostraron que la mayoría de las esponjas productoras de metabolitos secundarios pertenecen a las clases Demospongiae (77%) y Calcarea (1%), así como a esponjas no identificadas (22%). En la clase Demospongiae, el orden Haplosclerida proporciona la mayoría de las especies de esponjas que representan el 26.75% de la totalidad, seguido de los órdenes Suberitida, Axinellida, Dictyoceratida, Tetractinellida, Poecilosclerida, Verongiida, Agelasida, Tethydia, Chondrillida, Clionaida, Scopalinida, Biemnida, Chondrosiida y Sphaerocladina, mientras que en la clase Calcarea solo se reportó un derivado del orden Baerida y otro de Clathrinida (Cheng *et al.*, 2020).

Los microorganismos derivados de esponjas son principalmente hongos (73%) con *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp., como los géneros más importantes, y bacterias (27%) de las cuales el filo más abundante, Actinobacteria, comprende el 16%, y destacan los generos *Streptomyces* sp., *Pseudoalteromonas* sp., y *Pseudomonas* sp. (Cheng *et al.*, 2020). Esta revisión destacó la importancia de prestar más atención al estudio de los compuestos aromáticos y alcaloides, ya que comprenden el 45% de los 774 nuevos compuestos. Además, la cantidad total de nuevos productos naturales derivados de esponjas ha aumentado rápidamente y más del 42% de los compuestos han presentado actividad; sin embargo, la mayoría de ellos solo llevaron a cabo experimentos preliminares de prueba *in vitro*, por lo que, se deben hacer más esfuerzos y realizar ensayos clínicos para completar la evaluación del fármaco, así como seguir explorando la biodiversidad de microorganismos simbióticos de esponja, porque hay más recursos esperando ser extraídos (Cheng *et al.*, 2020).

Muchos de los compuestos que han sido aislados de microorganismos asociados a esponjas muestran propiedades biológicas, como actividad antimicrobiana, antitumoral y anticancerígena. Sin embargo, la producción de compuestos terapéuticos está dominada por el filo Actinobacteria, del que han aislado alrededor de 7,000 compuestos, seguido por Proteobacteria (Pallela & Ehrlich, 2016). Géneros como *Salinispora*, *Micromonospora*, *Mycobacterium* y *Verrucosipora*, pertenecientes al filo *Actinobacteria*, son de especial interés por su

diversidad química. Las esponjas, así como los sedimentos marinos, son una fuente prolífica de nuevas cepas de *Salinispora*, un género conocido por albergar una importante diversidad de nuevos productos naturales, como la salinosporamida A, un potente compuesto inhibidor del proteasoma que se encuentra ensayos clínicos para el tratamiento del mieloma múltiple, tumores sólidos y linfomas (Fuerst, 2014).

Las cianobacterias se han reportado en asociación con más de 300 especies de esponjas de regiones tropicales y templadas (Konstantinou *et al.*, 2018). Las cianobacterias se han estudiado ampliamente debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios estructuralmente diversos con actividades antioxidantes y citotóxicas contra varias líneas celulares de cáncer humano y bacterias patógenas (Konstantinou *et al.*, 2020), En el estudio realizado por Konstantinou *et al.* (2018) se analizaron 24 especímenes de esponja recolectados, que fueron asignados a 17 especies de Demospongiae y 1 Homoscleromorpha. De estos solo se lograron aislar 9 cepas de cianobacterias (6 filamentosas y 3 cocoides) provenientes de 8 especies de esponjas. Con base en los rasgos morfológicos y en el análisis filogenético del gen 16S ARNr, clasificaron las cepas a *Xenococcus* sp., *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena* cf. *persicina* y *Schizotrichaceae* sp. (Konstantinou *et al.*, 2018).

El género *Pseudovibrio*, de la familia Rhodobacteraceae, que pertenece a la clase Alphaproteobacteria, ha sido detectado desde regiones templadas hasta tropicales, frecuentemente de la asociación simbiótica que tienen con las esponjas marinas, ya que están involucrados en los ciclos de nutrición y se ha reportado que proporcionan a la esponja tanto vitaminas/cofactores como protección contra patógenos potenciales a través de la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos (Romano, 2018). Se han aislado varias cepas de *Pseudovibrio* (*P. axinellae*, *P. ascidiaceicola* y *P. denitrificans*) asociadas con más de 15 géneros de esponjas, no obstante, nunca se detectaron en los datos de secuenciación obtenidos de las comunidades bacterianas del hospedero (Romano, 2018). Probablemente, la discrepancia entre los datos dependientes e independientes del cultivo se debe a la alta versatilidad metabólica, el rápido crecimiento y las características antagonistas

de las cepas de *Pseudovibrio*, que les permiten superar a otras células durante el cultivo (Romano, 2018).

5.3.1. Metabolitos secundarios de esponjas del género *Haliclona*

Diversos estudios han demostrado que los metabolitos secundarios naturales de las esponjas del género *Haliclona* están asociados con una serie de actividades biológicas con uso terapéutico. Por ejemplo, en el estudio efectuado por Zhu *et al.* (2019), la esponja *Haliclona oculata* recolectada en la península de Son Cha, Vietnam, proporcionó tres productos químicos que tenían actividades antimicrobianas contra *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *Trichophyton mentagrophytes* con valores de MIC que oscilan entre 0.05 y 5.0 µg/mL.

Otro ejemplo es el estudio realizado por Fiorini *et al.* (2015), donde informaron que las paniceínas y especialmente la paniceína A hidroquinona, meroterpenoides naturales producidos por la esponja mediterránea *Haliclona (Soestella) mucosa*, inhiben la resistencia a doxorubicina y mejoran la citotoxicidad de este agente quimioterapéutico sobre células de melanoma *in vitro*. Años más tarde, Gunathilake *et al.* (2020), investigaron las propiedades inmunofarmacológicas del extracto crudo metanólico de la esponja *Haliclona (Soestella) sp.*, el extracto demostró una potente actividad inmunosupresora (específicamente mielosupresión), desprovista de efectos tóxicos generales, hepatotóxicos y nefrotóxicos durante un período de 14 días, por lo tanto, es muy prometedor como un potencial fármaco inmunosupresor.

Finalmente, en 2020, Gunathilake *et al.*, informaron que el género *Haliclona* ha producido una variedad de metabolitos secundarios, comúnmente alcaloides bioactivos como: alcaloides de bis-1-oxaquinolizidina y furano herbacina sesquiterpénica, también producen metabolitos con diversas estructuras que incluyen aminas policíclicas, sesquiterpenoides, quinoles, glicoesfingolípidos, resorcinol y tetrahidropireno. La alta diversidad química y estructural de los metabolitos secundarios producidos por este género de esponja da como resultado una actividad biológica interesante como actividades citotóxicas, antifúngicas, antibacterianas,

antivirales, antipalúdicas, antiinflamatorias, neuritogénicas y hemolíticas (Gunathilake *et al.*, 2020).

5.4. Bacterias cultivables asociadas a esponjas

Se sabe que hay simbioses que pueden aislarse y cultivarse mediante métodos de cultivo clásicos o novedosos, también hay simbioses distintivos no cultivados, es decir, aún por cultivar, y simbioses que no se pueden cultivar, por ejemplo, en esponjas del género *Haliclona* se han empleado medios oligotróficos para aislar cepas de *Streptomyces*, *Verrucosisspora*, *Salinispora* y *Micromonospora*, todos géneros pertenecientes al filo Actinobacteria (cita), mientras que en simbioses sin cultivar, la metagenómica y la genómica unicelular han proporcionado información valiosa sobre la fracción no cultivada o aún por cultivar de las comunidades microbianas de esponja (Fuerst, 2014). La comprensión de la diversidad microbiana cultivable asociada a esponjas es una base importante para el aislamiento microbiano, los metabolitos y los estudios de biofunción, aunque la falta de cultivos puros para la mayoría de los microorganismos asociados a esponjas ha contribuido a una escasez de conocimiento sobre su diversidad (Santos-Gandelman *et al.*, 2013). El cultivo tradicional usando placas de agar ha sido el método más utilizado para el cultivo de bacterias asociadas a esponjas hasta la fecha (utilizado para aislar el 89.1% de las bacterias cultivables); se han probado una amplia variedad de medios de crecimiento y condiciones de cultivo para proporcionar las condiciones de crecimiento adecuadas y mejorar la cultivabilidad de las bacterias en placas de agar, sin embargo, muchas bacterias parecen incapaces de crecer en la interfaz sólido-aire, por lo tanto, se acude a las técnicas de cultivo líquido como un enfoque alternativo para cultivar bacterias, además, los cultivos líquidos pueden ser más efectivos que aquellos a base de agar para el cultivo de bacterias abundantes, pero de crecimiento lento a partir de muestras ambientales (Dat *et al.*, 2021).

En 2013, Santos-Gandelman *et al.*, evaluaron la composición de la comunidad bacteriana cultivable asociada a 11 esponjas marinas recolectadas en la costa brasileña aplicando el cultivo en placa de agar con 3 medios diferentes; medio de infusión cerebro-corazón, medio marino disuelto en agua destilada y medio marino

disuelto en agua de mar, e incubaron las placas durante 7 días a temperatura ambiente. De las 11 especies de esponjas, *Mycale microsigmatosa* presentó una mayor diversidad de bacterias cultivables, seguida de *Dragmacidon reticulatum* y *Polymastia janeirensis*, en contraste, *Arenosclera brasiliensis* e *Hymeniacion heliophila* presentaron la menor diversidad bacteriana; entre las 100 bacterias aisladas el género *Bacillus* fue el más comúnmente observado, seguido de *Kocuria*, *Brachybacterium* y *Psychrobacter* (Santos-Gandelman *et al.*, 2013)

En el estudio efectuado por Amelia *et al.* (2018), se identificaron, mediante técnicas de biología molecular y análisis del gen 16S ARNr, 14 especies bacterianas cultivables asociadas con diferentes especies de esponjas marinas en las aguas del mar de China Meridional; las especies identificadas abarcaban los filos Firmicutes (*Bacillus aquimaris*, *B. aryabhatai*, *B. cereus*, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* y *Exiguobacterium indicum*), Actinobacteria (*Brevibacterium epidermidis*, *B. iodinum* y *Kytococcus sedentarius*), Alphaproteobacteria (*Pseudovibrio denitrificans* y *Ruegeria arenilitoris*) y Gammaproteobacteria (*Alteromonas macleodii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* y *Psychrobacter celer*), todos taxa que se sabe se asocian con esponjas y producen metabolitos secundarios con la capacidad de biorremediación, la biosíntesis de nanometales y la producción de antibióticos. Las bacterias de estos grupos se han aislado previamente de esponjas marinas en áreas geográficamente dispares, como las aguas costeras de India, China, Corea del Sur, Las Bahamas, Irlanda y Brasil, lo que sugiere que posiblemente son bacterias residentes y no bacterias transitorias atrapadas temporalmente (Amelia *et al.*, 2018). En cuanto a las esponjas donde se encontraron estas bacterias, se observó que todas pertenecían a la clase Demospongiae, con la mayoría dentro de los órdenes Haplosclerida (*Gelliodes*, *Haliclona*, *Callyspongia*, *Sigmadocia* y *Arenosclera*) y Dictyoceratida (*Hyattella* y *Sarcotragus*), mientras que las esponjas del género *Spirastrella*, *Polymastia* y *Mycale* pertenecen al orden Clionaida, Polymastiida y Poecilosclerida, respectivamente (Amelia *et al.*, 2018).

En la revisión realizada por Dat *et al.* (2021), se seleccionaron un total de 4,915 secuencias de genes 16S ARNr de bacterias cultivadas de esponjas en función

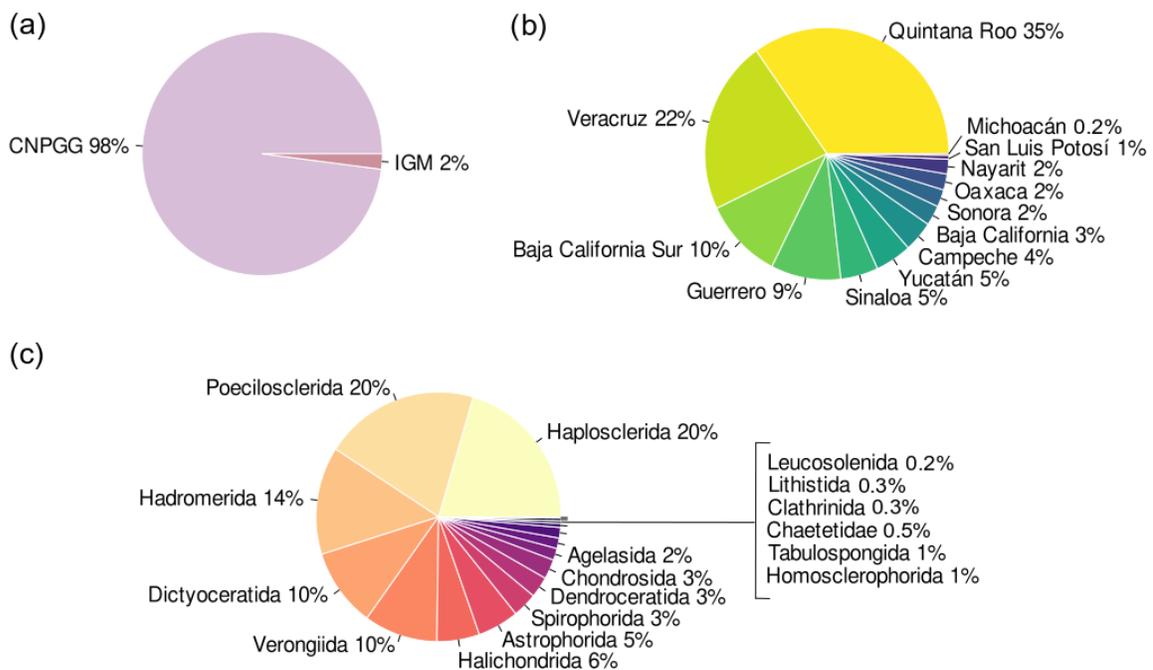
de los artículos publicados actualizados hasta 2017, recuperados del NCBI Genbank, y luego reclasificados en función de la base de datos Silva (v128) utilizando MOTHUR; con ello determinaron que las bacterias cultivables de las esponjas estaban dominadas por cuatro filos: Proteobacteria (53.8%), *Actinobacteria* (23.4%), Firmicutes (16.0%) y Bacteroidetes (5.0%), los filos restantes (Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chloroflexi y Chlorobi) representaron el <1% de las secuencias y casi todas las Proteobacteria cultivables pertenecían a dos clases; Alphaproteobacteria (29.1%) y Gammaproteobacteria (24.0%). En orden descendente, los géneros de bacterias cultivables detectados en este estudio fueron *Pseudovibrio*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Ruegeria*, *Micromonospora*, *Pseudoalteromonas*, *Labrenzia*, *Microbulbifer*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Salinispora*, *Endozoicomonas* y *Microbacterium*; varios de los géneros más abundantes se aislaron por el método en placa de agar, como *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Endozoicomonas* y *Pseudoalteromonas* (Dat et al., 2021). La mayoría de estas bacterias son una fuente prolífica y rica de productos naturales que incluyen compuestos farmacológicamente valiosos, desafortunadamente, todavía no hemos podido acceder a la mayoría de estos metabolitos secundarios, debido a que los medios de crecimiento artificiales y las condiciones de cultivo a menudo no son del todo adecuadas para imitar las condiciones naturales requeridas para el crecimiento microbiano, de hecho, sólo una fracción menor de la comunidad bacteriana (0.1 - 14%) se ha cultivado con éxito en el laboratorio (Dat et al., 2021).

5.5. Esponjas en la República Mexicana

En México el estudio del filo *Porifera* comenzó entre la década de los 70 y 80's con el Dr. Gerardo Green del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), sin embargo, las principales líneas de investigación actuales se basan en el estudio de la taxonomía de las esponjas de acuerdo a la morfología de sus elementos esqueléticos (Carballo et al., 2014) y nada más algunas se enfocan al estudio de los microorganismos simbióticos que producen metabolitos secundarios. En México existen dos colecciones formales de esponjas; (i) la Colección Nacional del *Phylum* Porifera Gerardo Green (CNPGG), la cual alberga alrededor de 16,000 ejemplares

que han sido recolectados desde el año de 1934 a la fecha y, (ii) la Colección de Esponjas, ubicada en la Unidad Académica Mazatlán del ICMYL, que cuenta con 3,000 ejemplares (Carballo *et al.*, 2014). En las 2 últimas décadas se ha logrado un importante avance en el conocimiento de las esponjas de México, en la región del Atlántico y sobre todo en el Pacífico Mexicano, aunque las investigaciones se han centrado principalmente en esponjas de arrecifes coralinos debido a su importancia ecológica en estos ecosistemas (Carballo *et al.*, 2014).

Actualmente, según los datos registrados en la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), la última actualización realizada por el ICMYL de la CNPGG fue en 2015 (CONABIO, 2020), y en el Portal de Datos Abiertos UNAM (Dirección General de Repositorios Universitarios, UNAM, 2015) se encuentran dos colecciones actualizadas; la CNPGG con 577 especies de esponjas y la colección de esponjas por el Departamento de Paleontología del Instituto de Geología de la UNAM (IGM) que cuenta con 12 especies; la mayoría de las esponjas pertenecen a los órdenes *Haplosclerida* y *Poecilosclerida*, y se han encontrado principalmente en Quintana Roo (Figura 6).



(d)

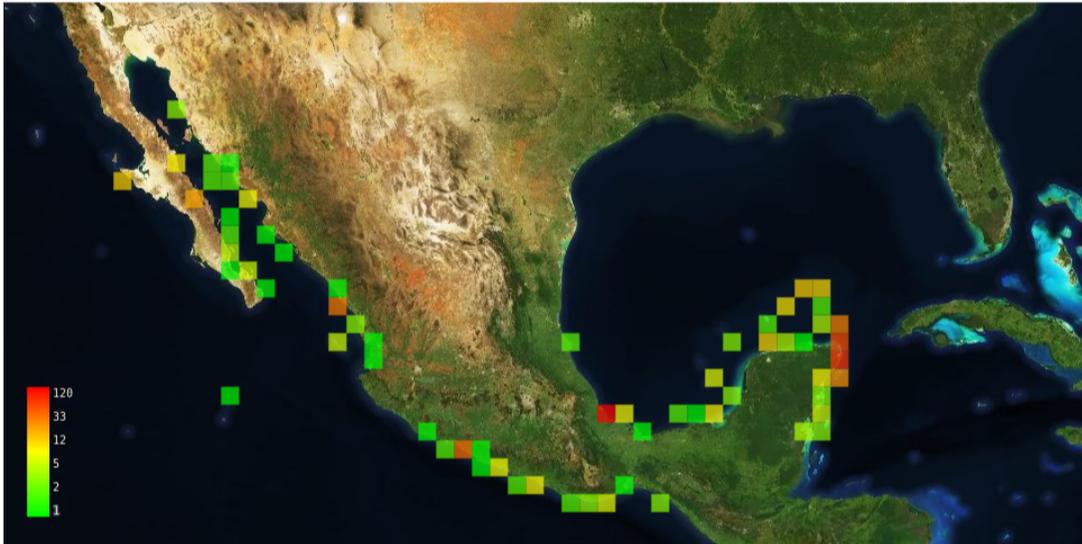


Figura 6. Datos de las Colecciones del filo Porifera en México ordenados de acuerdo al nombre de (a) la colección, (b) al Estado donde se encontró y (c) los ordenes más destacados. (d) Distribución geográfica de todas las esponjas de México que han sido reportadas en las colecciones CNPGG e IGM hasta 2015. Como se puede observar, la zona con mayor densidad de especies es la Península de Yucatán. Tomado de la Dirección General de Repositorios Universitarios, UNAM (2015).

Las familias de esponjas más abundantes son *Niphatidae*, *Aplysinidae*, *Irciniidae*, *Callyspongiidae* y *Suberitidae*; y los géneros más representativos *Ircinia*, *Callyspongia*, *Amphimedon*, *Mycale*, *Aplysina*, *Geodia* y *Suberites*. Algunos géneros de esponjas que se han reportado en México también se han encontrado en cuevas alrededor del mundo, por ejemplo, miembros del género *Ircinia* (*I. oros*, *I. variabilis* e *I. fasciculata*), del género *Aplysina* (*A. aerophoba* y *A. cavernicula*) y del género *Geodia* (*G. corticostylifera*), habitan en cuevas con profundidades de hasta 150 m (Santhanam *et al.*, 2018).

5.5.1. Esponjas en cuevas anquihalinas de México

A nivel mundial, Porifera ha sido relativamente bien estudiada en cuevas subacuáticas, sin embargo, en México las esponjas solo se conocen en dos cuevas anquihalinas: “La Quebrada” y “El Aerolito”, ambas pertenecen al sistema de cavernas anquihalinas de la Península de Yucatán y las dos están ubicadas en la Isla de Cozumel (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020). De acuerdo a la investigación de Calderón-Gutiérrez *et al.* (2017), las cuevas anquihalinas de México y su fauna se

empezaron a estudiar desde 1938, y hasta 2017 había 57 artículos relacionados con este tipo de ecosistema, al revisarlos se observó que en nada más 5 o 6 artículos mencionan brevemente a las esponjas. De todas las cuevas anquihalinas que existen en México, se observó que “El Aerolito” es una de las más ricas y diversas, con 100 especies clasificadas dentro de 10 filos, de los cuales Porifera es el más rico en contraste con el resto de las cuevas donde el filo dominante es Arthropoda; en esta cueva se identificaron 22 especies de esponjas, de las cuales 19 son de la clase Demospongiae y 3 de Calcarea, estas pertenecen, principalmente, a los órdenes Tetractinellida y Tethyida, y los géneros más abundantes son *Geodia* y *Tethya* sp., mientras que, de *Haliclona* (*Reinera*), *Agelasidae*, *Chondrosida*, *Acarnus*, *Aciculites*, *Psammastra* y *Diplastrella* sp., solo se reportó una esponja. Esta cueva presenta formaciones geológicas como estalactitas, estalagmitas, columnas, etc., una temperatura en la capa de agua marina de 26 - 28.9 °C, una salinidad en la capa de agua salobre de 17, y en la capa de agua marina de 30 - 31, además, su fauna excepcional podría deberse al aporte de energía por un manglar ubicado en la entrada principal de la cueva, y la conexión directa con el mar; pues cuenta con dos entradas, la principal es el cenote “El Aerolito del Paraíso”, y la segunda está en el Mar Caribe (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2017).

Calderón-Gutiérrez *et al.* (2018), estudiaron cuatro cuevas anquihalinas de la Península de Yucatán: “El Aerolito”, “La Quebrada”, “Tres Potrillos” y “Bambú”. Determinaron que la cueva anquihalina “El Aerolito” contiene una alta riqueza del filo Porifera, y, aunque en menor proporción, también detectaron la presencia de esponjas en “La Quebrada”, sin embargo, en las cuevas “Tres Potrillos” y “Bambú” no encontraron especies de esponjas (Figura 7). La significativa diversidad de Porifera presente en “La Quebrada” y “El Aerolito” se debe a que ambas cuevas tienen conexión directa con el mar, tienen profundidad media de 6 y 12 m, profundidad máxima de 9.7 y 27 m, respectivamente, y un largo de 9.2 y 18 km, respectivamente, además cuentan con una capa de haloclina a 4 y 7 m de profundidad, respectivamente; estas características corresponden con los patrones ecológicos que se estimaron para una alta riqueza y densidad de especies en una cueva anquihalina. Mientras que la baja diversidad reportada en “Tres Potrillos” y “Bambú”

se debe a que son cenotes tierra adentro en forma de campana que carecen de conexión directa con el mar: tienen aproximadamente 60 m de largo y una mayor profundidad de 38 m y 52 m respectivamente, a pesar de que también cuentan con la capa de haloclina a 12 y 42 m de profundidad, respectivamente, su riqueza se ve disminuida debido a que la capa se encuentra cerca del fondo de la cueva (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018).

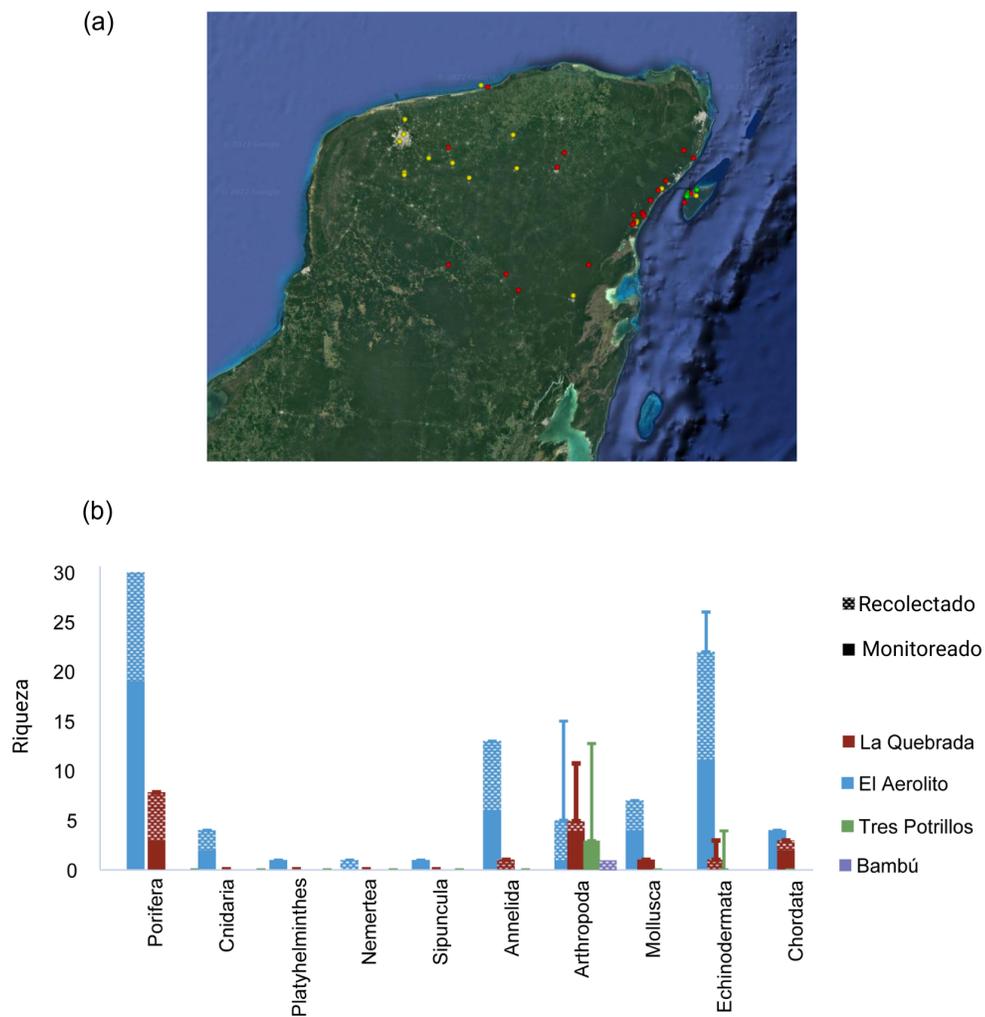


Figura 7. (a) Distribución de las cuevas anquihalinas en la Península de Yucatán que han sido reportadas de estudios realizados en 40 cenotes desde hace 80 años hasta 2017. Tomado y modificado de Calderón-Gutiérrez *et al.* (2017). (b) Riqueza de especies de las cuevas anquihalinas ubicadas en la Isla de Cozumel de la Península de Yucatán. Se puede distinguir que *Porifera* es el filo con mayor riqueza en “El Aerolito” y “La Quebrada”. La barra de error se refiere a las especies registradas en la literatura, pero no observadas en el estudio. El monitoreo se refiere a los datos recopilados a través del censo visual. Tomado y modificado de Calderón-Gutiérrez *et al.* (2018).

Gómez & Calderón-Gutiérrez (2020) también investigaron la cueva anquihalina “La Quebrada” y recolectaron 38 muestras de 10 especies de esponjas marinas, de las cuales 9 pertenecen a la clase Demospongiae y 1 a Homoscleromorpha, cabe resaltar que 6 especies eran nuevas para la ciencia. Esta cueva anquihalina tiene conexión directa con el Mar Caribe a través de ocho cenotes, el agua subterránea tiene una temperatura promedio de 28 °C y hay una variación interanual de 5.5 °C en tramos más próximos al océano y una temperatura estable de 24.8 °C tierra adentro, la salinidad del nivel inferior a la haloclina es de 38, mientras que la de la capa superior es de 12, la mayor biodiversidad de esponjas marinas se observó en el cenote más próximo al mar, no se observaron esponjas, ni arriba de la haloclina ni después del tercer cenote más próximo al mar (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020).

La mayoría de las esponjas encontradas en “La Quebrada” pertenecen a los órdenes Tetractinellida y Haplosclerida, y tres esponjas pertenecen a Scopalinida, Clionaida y Homoscleromorpha, respectivamente. Estas 10 especies resultaron de un exhaustivo esfuerzo de muestreo del cual se espera no encontrar más especies de esponjas en la zona oscura de “La Quebrada”, excepto especies crípticas o muy pequeñas (Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020). Más recientemente, en 2021, Gómez *et al.*, registraron por primera vez una esponja del género *Amphibleptula*, *A. aaktun* sp. nov., en México; esta se encontró en la cueva anquihalina “El Aerolito” a 18 m de profundidad, dicha especie pertenece a la familia Scleritodermidae del orden Tetractinellida. Hasta ahora no se han observado o estudiado esponjas en otras cuevas anquihalinas de Cozumel (únicamente en “La Quebrada” y “El Areolito”) o en las de la Península de Yucatán.

6. Metodología

6.1. Área de estudio

En septiembre de 2020, se realizó una expedición a una cueva anquihalina en el cenote Xcalak en “Bajo de Judas” (18.202979’N, -87.860717’W), en la zona oscura de la cueva se encontraron cuatro especies de esponjas distintas, de las cuales una se eligió para este proyecto, dicha esponja se encontró a 12 m de profundidad y a 30 m de largo hacia el interior, incrustada al techo de la cueva anquihalina (Figura 8).

La entrada de la cueva es una bahía con manglares y en los alrededores de este sitio es posible observar una alta cantidad de pastos marinos del género *Thalassia* sp., así como una alta densidad de medusas de la especie *Cassiopea xamachana*. La coloración del agua marina era verde limón y al ser un cenote costero, la corriente de agua de este sitio está influenciada por las mareas; de manera que, el flujo que entra arrastra un gran contenido de detritos y sedimentos del exterior al interior de la cueva. La cueva no presenta capa de haloclina ni estigobiontes.

Se utilizó una sonda multiparamétrica YSI ProQuatro para medir los datos fisicoquímicos del agua (oxígeno disuelto, salinidad, nitratos y pH). Como las muestras no eran accesibles desde la superficie, el agua se almacenó en bolsas Ziploc grandes, posteriormente, en la superficie se tomaron los datos; la medición de temperatura de estas muestras se tomó empleando el perfilador HOBO Mx 2202.

En un tubo falcón de 50 mL se recolectó la muestra de esponja (aproximadamente 40 cm³ de tejido húmedo) y se almacenó en una nevera con hielo a una temperatura de 4 °C. La muestra fue analizada y fotografiada bajo un microscopio estereoscópico y posteriormente preservada en EtOH al 96% para ser almacenada nuevamente en la nevera (Liévano & Rodríguez, 2020).

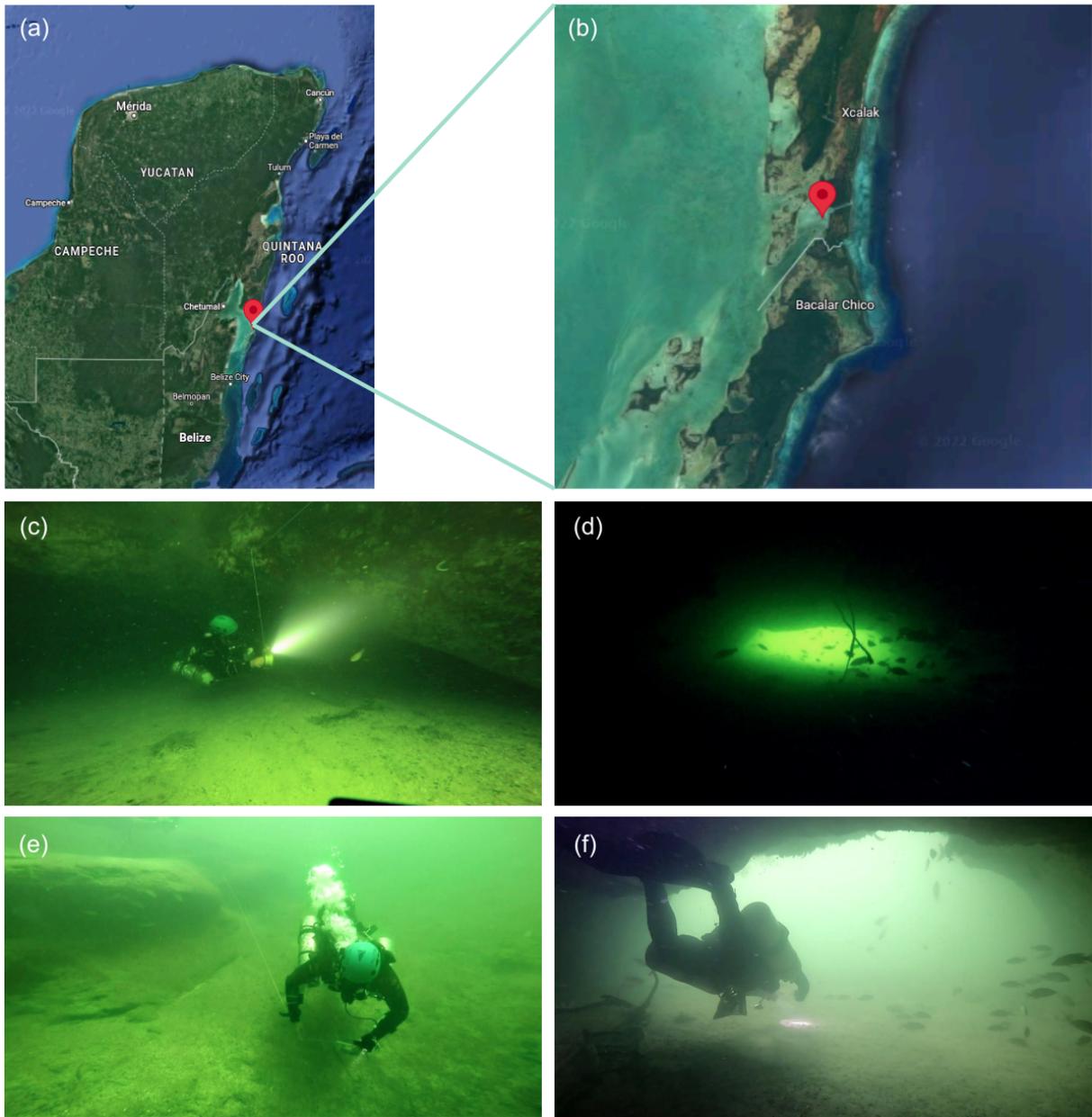


Figura 8. (a) Ubicación geográfica de la cueva perteneciente al sistema de cavernas anquihalinas de la Península de Yucatán, y (b) un acercamiento al sitio de recolección en “Bajo de Judas”: imágenes satelitales tomadas de Google (s.f.). (c) Las paredes de este sitio están conformadas por arcillas y areniscas, mientras que (e) el sedimento es de origen biogénico. (d) Zona de la cueva con intrusión de agua salina y visibilidad extremadamente pobre con (f) una entrada a 5 m de profundidad: las imágenes de la cueva se tomaron del reporte técnico escrito por Liévano & Rodríguez (2020).

6.1.1. Identificación taxonómica y secuenciación del gen 16S ARNr de la esponja colectada

Para identificar la esponja colectada, se envió una pequeña parte de la muestra conservada en etanol 96% al ICMYL de la UNAM, donde la M. en C. Diana Ugalde realizó la identificación taxonómica con el método tradicional mediante el análisis del tejido y espículas de la esponja siguiendo a Gómez & Calderón-Gutiérrez (2020). Los resultados obtenidos asignaron la taxonomía a nivel de subgénero. Por otro lado, el M. en C. Adán Rivera del LEMyPNM en su trabajo de tesis que actualmente se encuentra en progreso, utilizó el paquete bioinformático RiboTagger (Xie *et al.*, 2016) para la extracción y clasificación taxonómica de las secuencias de ADN pertenecientes a las regiones V4 a V7 del gen 16S y 18S ARNr. De las lecturas *forward* y *reverse* resultantes del proceso de secuenciación del metagenoma de la esponja, se seleccionaron aquellas que tuvieron más de 10 conteos por región y muestra. Para la identificación, se usó la base de datos en línea y la aplicación BLASTn del NCBI para cada grupo de secuencias, y se seleccionaron aquellas con un porcentaje de identidad superior al 97%. Los resultados se compararon con la información taxonómica obtenida por parte de la M. en C. Diana Ugalde, que incluye la clasificación visual y por espículas.

Para la extracción de ADNg del tejido de *Haliclona (Soestella)* (muestra de esponja E3) se empleó el Kit Miniprep D4300 de ZymoBIOMICS™ siguiendo el protocolo del fabricante. El ADNg extraído de la esponja se envió a la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos de América, donde se realizó la amplificación de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr empleando el par de cebadores 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT), que comprenden 291 pb del gen 16S, abarcando las zonas conservadas antes y después de V4. Los amplicones resultantes se secuenciaron en el mismo lugar, con la plataforma Illumina MiSeq, siguiendo el protocolo estandarizado del Proyecto del Microbioma Terrestre (EMP, por sus siglas en inglés), diseñado para procariotas (Caporaso *et al.*, 2018). Las lecturas FASTQ demultiplexadas resultantes de la secuenciación fueron enviadas vía email para su posterior análisis.

6.2. Análisis bioinformático

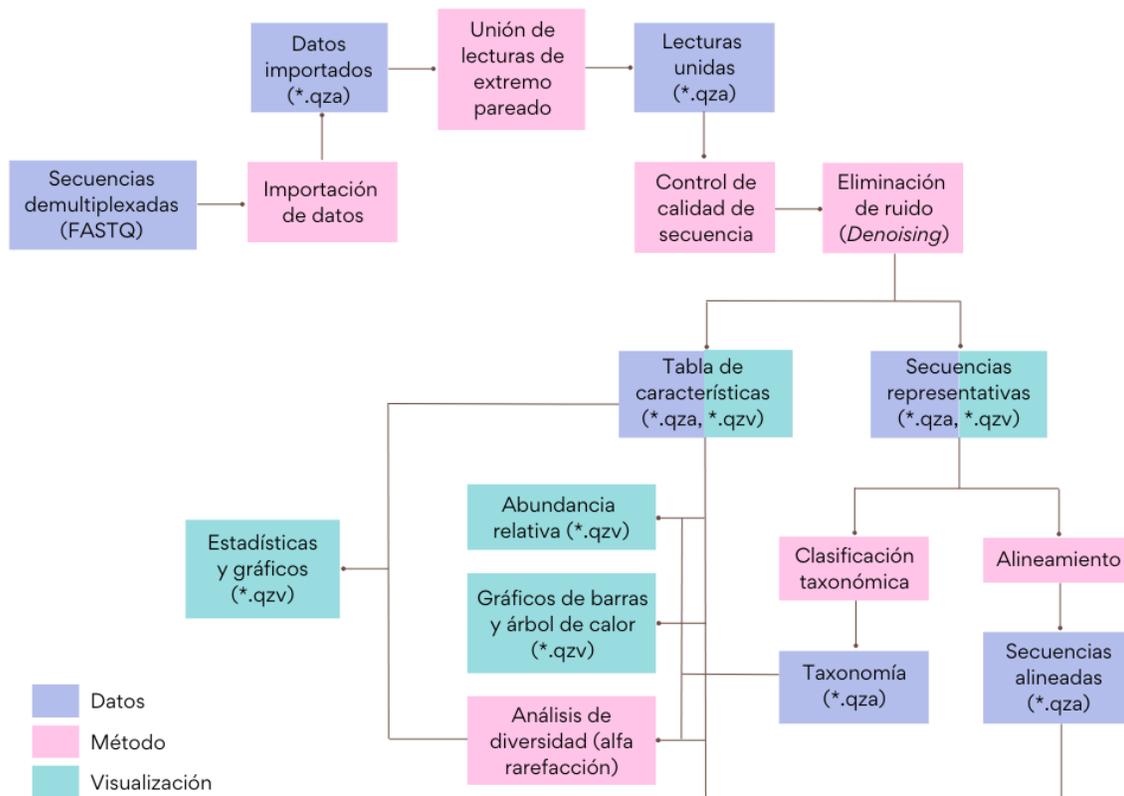


Figura 9. Esquema general del procesamiento y análisis de datos de secuenciación del microbioma de esponja ejecutado en QIIME2.

6.2.1. Instalación de QIIME2, importación de datos y tabla de metadatos

Se instaló la distribución QIIME2 core 2022.2 siguiendo las instrucciones de forma nativa en un entorno conda para Linux de 64 bits. Para obtener las lecturas completas del amplicón de la región V4 del gen 16S ARNr, las lecturas FASTQ demultiplexadas fueron procesadas utilizando el conjunto de comandos del programa QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). Cuando el rendimiento de secuenciación es superior al necesario para una muestra, las bibliotecas genómicas de varias muestras se pueden agrupar y secuenciar juntas en una sola ejecución con secuencias de código de barras específicas de la muestra insertadas en las bibliotecas; si las lecturas de secuenciación en los archivos FASTQ de salida tienen secuencias de código de barras insertadas, es necesario eliminarlas de las lecturas de secuenciación y separar los datos en muestras individuales, la demultiplexación lleva a cabo este

proceso con la referencia de las secuencias de código de barras usadas, es decir, la demultiplexación es el proceso mediante el cual las lecturas de secuenciación son asignadas a sus correspondientes muestras individuales (H. Kim *et al.*, 2020).

Las lecturas venían en dos archivos formato FASTQ para la muestra de estudio y estaban nombrados por convención con la nomenclatura de Illumina: *AMP043_S91_L001_R1_001.fastq.gz* y *AMP043_S91_L001_R2_001.fastq.gz*, donde *AMP043* es el nombre de la muestra, *S91* indica el número de muestra, *L001* indica el número de carril, *R2* indica que el archivo contiene las lecturas inversas (con *R1* indicando lecturas directas) y los últimos tres números son siempre *001* por convenio; los archivos ya venían demultiplexados. Los metadatos de la muestra se almacenaron en un archivo de texto separado por tabulaciones (*.tsv), donde cada fila representa una muestra y cada columna una categoría de metadatos (la primera línea es un encabezado que contiene los nombres de categoría de metadatos), este archivo se validó con una herramienta de validación de metadatos basada en navegador, *Keemei* (Rideout *et al.*, 2016), que comprueba el formato correcto y ayuda a identificar cualquier error en el archivo de metadatos (Figura 10). Con multiQC se visualizó la calidad de las lecturas (Ewels *et al.*, 2016) y posteriormente, se importaron como formato Casava 1.8 demultiplexado de extremo pareado FASTQ a un artefacto (*.qza) usando el programa QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019).

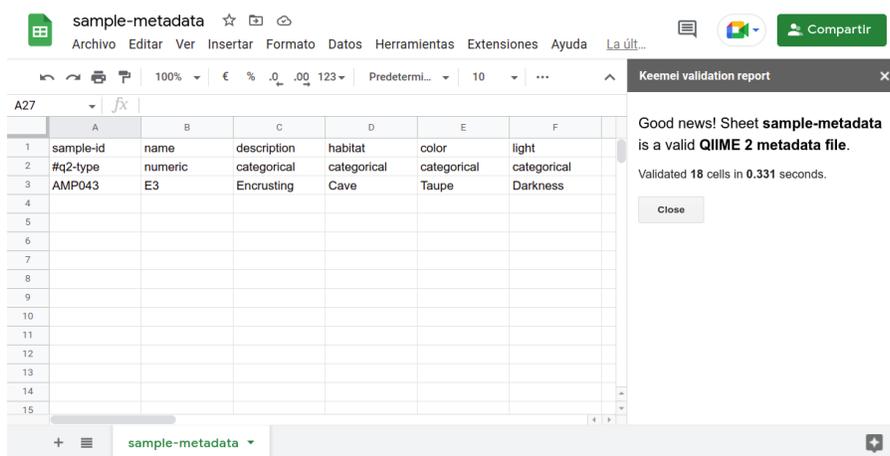


Figura 10. Metadatos de la muestra secuenciada en formato (*.tsv) validada para QIIME2 con la herramienta *Keemei*.

La tabla de metadatos contiene las categorías de la muestra con base en su clave de identificación (ID), descripción, hábitat, color de esponja y si está expuesta a la luz. Solo se analizó una muestra por lo que, solo hay una fila de datos en la tabla. La tabla de metadatos validada fue útil, junto con otros archivos para obtener la curva de rarefacción y el gráfico de barras para la asignación taxonómica.

6.2.2. Control de calidad y ensamblaje de las secuencias

La secuenciación de extremos emparejados secuencia cada fragmento de ADN inicial (más largo que la longitud de lectura real) de ambos extremos, generando dos lecturas por fragmento: la primera lectura en orientación hacia adelante (del inglés *forward*) y la segunda lectura en orientación de complemento inverso (del inglés *reverse*) (H. Kim *et al.*, 2020). Para obtener las lecturas unidas se realizó el ensamblaje de las secuencias *forward* y *reverse*, posteriormente, para obtener secuencias con una precisión $\geq 99\%$, estas fueron recortadas según su calidad que se estableció con un *Phred Score* (Q) mínimo de 20. El control de calidad se ejecutó usando el programa Deblur (Amir *et al.*, 2017), con el cual se eliminaron las secuencias ruido (*denoising*) indicando una longitud de 250 pb para cada lectura, los resultados obtenidos con este método son dos visualizaciones QIIME2 (*.qzv), una contiene los recuentos/frecuencias de cada secuencia única en cada muestra del conjunto de datos, es decir, indica el número de veces que se observa cada variante de secuencia de amplicón (ASV) en la muestra y, la otra los identificadores de entidades a las secuencias que representan.

6.2.3. Construcción de la curva de rarefacción

Las métricas de diversidad alfa resumen la estructura de una comunidad ecológica con respecto a su riqueza (número de grupos taxonómicos), uniformidad (distribución de abundancias de los grupos) o ambas (Willis, 2019). Para determinar si la riqueza de la muestra E3 se secuenció por completo se realizó el trazado del gráfico de rarefacción alfa empleando las secuencias representativas y la tabla de frecuencias asociadas a cada lectura a una profundidad de muestreo máxima de 15,000, este valor que se proporcionó en el comando `--p-max-depth` para construir el

gráfico de rarefacción, el cuál se determinó revisando la información de la tabla de frecuencias, donde se reporta que 23,222 fue el número de máximo de frecuencias, elegir un valor que esté alrededor de 6,000 pudo funcionar bien, pero se aumentó a 15,000 para asegurar que la curva en el gráfico de rarefacción resultante se nivelara y así retener la mayoría de las características en la muestra.

6.2.4. Asignación taxonómica

La asignación taxonómica a las secuencias de los ASV se llevó a cabo alineando las secuencias representativas contra 3 bases de datos: (i) Greengenes (versión 13_8 agrupado en 99% de similitud) de la región 515F/806R cuyo clasificador se encuentra disponible en <https://docs.qiime2.org/> (McDonald *et al.*, 2011; Bokulich *et al.*, 2018); (ii) SILVA (versión 138 con 99% de homología), el clasificador se construyó dirigido a la región 515F/806R del gen 16S ARNr (Yilmaz *et al.*, 2013; Robeson *et al.*, 2020); y (iii) NCBI (versión BLAST+ 2.13.0 con homología \geq 95%) (“Database Resources of the National Center for Biotechnology Information”, 2015). Además, para permitir una visualización de la estructura de la comunidad microbiana y transmitir la estructura jerárquica de las clasificaciones taxonómicas se construyó un árbol de calor, comparando los 160 ASV en función de su ocurrencia en términos de número de lecturas distribuidas en la muestra de esponja. Se emplearon los programas RStudio (RStudio, 2021) e InkScape (Developers, 2021) para la construcción y edición de los gráficos de barras (paquete R: *barplot*) y el árbol de calor (paquete R: *Metacorder* (Foster *et al.*, 2017)) de la asignación taxonómica a partir de los resultados obtenidos con QIIME2. El conjunto de comandos que se ejecutó en el sistema operativo Ubuntu 20.04 (Linux - 64 bits) está disponible en el Anexo I.

6.3. Cultivo y ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

6.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja

El cultivo de microorganismos a partir del tejido de la esponja colectada fue realizado por el Dr. José Carlos Parada, alumno de la Dra. Alejandra Prieto-Davó e

integrante del LEMyPNM en Sisal Yucatán, empleando el método de las diluciones seriadas. Para ello se pesó 1 g de tejido húmedo de la muestra E3 que estaba almacenada en EtOH al 96% y se colocó en un tubo de ensayo (tubo A) con 9 mL de agua peptonada al 1% dónde se agitó vigorosamente. Posteriormente, se hicieron diluciones hasta 10^{-7} g tejido húmedo/mL: esto se logró transfiriendo 1 mL del tubo A, a otro (tubo B) que contenía 9 mL de agua peptonada al 1%, se agitó vigorosamente y se repitió el proceso transfiriendo 1 mL del tubo B a otro (tubo C) con 9 mL de agua peptonada al 1% y así sucesivamente 4 veces más. Luego se inoculó 0.1 mL de cada dilución en placas de agar y se dispersó en la superficie con la ayuda de una varilla acodada.

Los medios empleados para el cultivo fueron: (i) Agar marino, preparado con 5 g de almidón, 2 g de extracto de levadura, 1 g de peptona y 9 g de agar bacteriológico por cada 500 mL de agua de mar, es un medio selectivo que favoreció a microorganismos halotolerantes y halofílicos, con un tiempo de incubación promedio de 48 h a 25 °C; y (ii) Agar agua, preparado únicamente con 9 g de agar bacteriológico por cada 500 mL de agua de mar, en el cual se desarrollaron los microorganismos que extraen los nutrientes disponibles en el agua de mar, con un tiempo de incubación indefinido a 25 °C.

Las placas de agar con el inóculo se incubaron por una semana más del tiempo promedio de incubación para observar la presencia de actinomicetos. Posteriormente, se seleccionaron únicamente las colonias que presentaron pigmentación y/o halos de inhibición. Las colonias seleccionadas se aislaron por el método de estría cruzada en placa de agar marino para su descripción colonial y microscópica con la prueba de tinción de Gram. Para su conservación, se tomó una colonia aislada de la placa y se inoculó en un matraz con 25 mL de caldo marino. Se incubó en agitación constante (130 rpm) a 25 °C hasta la presencia de turbidez en el medio. Posteriormente, en criotubos individuales se colocaron 500 µL de cada bacteria crecida en caldo marino con 500 µL de glicerol en una proporción 1:1 glicerol:agua para su almacenamiento a -80 °C.

6.3.2. Purificación e identificación de la cepa bacteriana NCA-454

El cultivo axénico de la cepa bacteriana NCA-454 aislada de la esponja de cueva anquihalina se realizó usando la técnica de resiembra en placa de agar por estría bajo condiciones asépticas. Las placas de agar se incubaron a una temperatura de 34°C por 24 h. El medio de cultivo para la caja petri se preparó con extracto de levadura (4 g/L), bactopectona (2 g/L), almidón de maíz (10 g/L), sales marinas (32 g/L) y agar bacteriológico (18 g/L). Antes de su uso, el medio fue esterilizado en autoclave con calor húmedo a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1.1 kg/cm². La fuente de carbono empleada para su crecimiento fue almidón y D-glucosa, y la fuente de nitrógeno, bactopectona y extracto de levadura.

Para la identificación de la bacteria, se preparó el medio DSC-ASW a pequeña escala, siguiendo las indicaciones de Jayanetti *et al.* (2019): almidón de maíz (5 g/L), glucosa (10 g/L), bactopectona (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y sales marinas (32 g/L). El medio se esterilizó en autoclave con calor húmedo a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1.1 kg/cm². Se utilizó una pequeña cantidad de colonia de la cepa NCA-454 (aproximadamente la punta del asa) para inocular el medio por el método de siembra en picadura y se incubó en agitación constante (120 rpm) a temperatura ambiente hasta la presencia de turbidez en el medio. Posteriormente, se tomó del medio un volumen aproximado que contenía 50 - 100 mg peso húmedo de células bacterianas y se llevó a la microcentrífuga a 10,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y las células bacterianas fueron resuspendidas empleando 200 µL de agua isotónica. Para la identificación de la cepa bacteriana, se realizó una extracción y purificación del ADNg de la cepa bacteriana NCA-454 se empleó el Kit Miniprep de ZymoBIOMICS™ siguiendo el protocolo del fabricante.

Para comprobar la presencia e integridad del ADNg se ejecutó una electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon 25 mL de una disolución al 1% de agarosa pura y 5 µL de reactivo colorante SYBR® Safe DNA Gel Stain. La disolución se vació en el molde para preparar el gel con el peine que generó los pozos para la muestra. Se tomaron 5 µL de la muestra de ADNg y se mezclaron con 2 µL de reactivo colorante Blue Juice™ Gel Loading Buffer de Invitrogen, estos 7 µL se

colocaron en el tercer pozo del gel, en el primer pozo se colocó el marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. Este marcador está compuesto por 12 bandas lineales de ADN de doble cadena y es adecuado para el análisis de bandas de ADN en electroforesis en gel de agarosa. El equipo de electroforesis se programó a 80 V y 3.0 A, se hizo pasar un campo eléctrico a través del gel sumergido en una disolución buffer durante 45 min aproximadamente. Al terminar el tiempo, el gel se colocó en una cámara de luz UV y se tomó una fotografía.

El ADN_g extraído de la cepa NCA-454 se amplificó en el termociclador del Conjunto E empleando el par de cebadores 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) a una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ y temperatura de 60 °C; dichos cebadores comprenden la región completa del gen 16S ARNr dando como resultado un producto de 1465 pb aproximadamente. Posterior a la amplificación, se realizó otra electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el mismo procedimiento redactado anteriormente, con el que se verificó que los fragmentos amplificados estaban puros. Los amplicones se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, usando el par de cebadores 357F (CTCCTACGGGAGGCAGCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) que se dirigen desde la región V3 hasta V9 del gen 16S ARNr con una longitud de secuencia de 1135 pb. La taxonomía de la cepa bacteriana NCA-454, se asignó mediante la comparación de las secuencias resultantes en formato (*.ab1) contra la base de datos del NCBI utilizando la herramienta web *nucleotide* BLAST+ 2.13.0.

6.3.3. Obtención de los extractos de la cepa bacteriana NCA-454

En primer lugar, la bacteria NCA-454 se cultivó en pequeña escala (600 mL) por el I.Q.I. Daniel Hernández, para revisar si alguno de sus extractos tenía actividad antimicrobiana. Una vez establecido el potencial antimicrobiano de este microorganismo, se decidió escalar su cultivo (9 L de medio DSC-ASW) para la obtención de cantidades adecuadas de extracto para su análisis químico. Así, a partir de un pre-inóculo de la bacteria en 600 mL del mismo medio (Figura 11a), el cual se dejó crecer durante 5 días a temperatura ambiente y con agitación constante (100 rpm), se inocularon con 100 mL del cultivo, 6 matraces Fernbach con 1.5 L de medio

DSC-ASW estéril cada uno (Figura 11b) bajo condiciones asépticas. Los cultivos se dejaron en agitación constante durante 10 días a temperatura ambiente y con agitación constante (100 rpm) (Figura 11c), y al término de este tiempo, se añadieron 200 mL de MeOH a cada matraz y se dejaron reposar por 30 - 40 minutos (Figura 11d). Luego, cada matraz se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 25 °C y el pellet y el sobrenadante se separaron por decantación (Figura 11e).

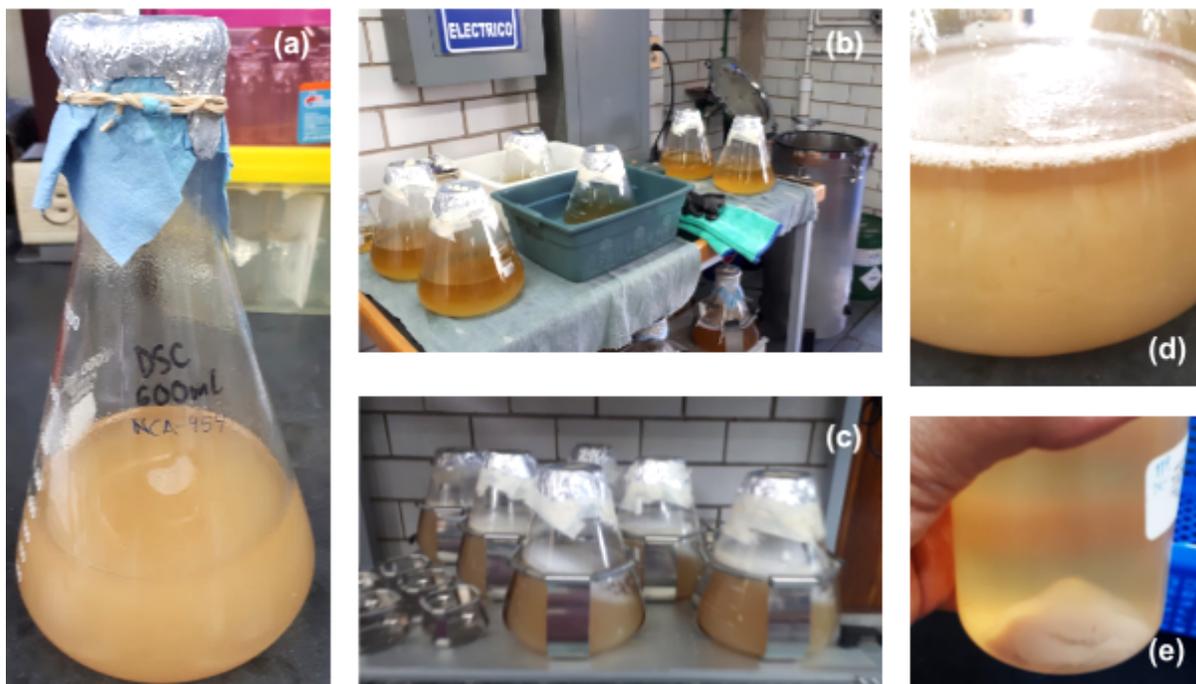


Figura 11. Inóculo de la cepa NCA-454 en 600 mL de medio DSC-ASW (a), el cual se transfirió a seis matraces Fernbach de 3.0 L con suficiente medio de cultivo esterilizado en autoclave para cultivar la cepa a mediana escala (b). Durante la agitación constante de 10 días se logró apreciar el cambio de turbidez en el medio debido al crecimiento celular y la producción de biomasa (c), al añadir MeOH al medio se observó como el pellet bacteriano se fue asentando en el fondo (d), y finalmente este se separó del sobrenadante por centrifugación y decantación (e).

La obtención de los extractos del sobrenadante se realizó mediante el uso de la resina Amberlita® XAD-7 de Sigma-Aldrich en una proporción de 18 g de resina por litro de sobrenadante (Figura 12b). Los matraces con la resina se dejaron en agitación constante (120 rpm) durante 12 h. Posteriormente, toda la resina se filtró a vacío y a cada matraz se le añadieron 250 mL de AcOEt. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 40 min (120 rpm). Transcurrido el tiempo, la fase orgánica se filtró por gravedad y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro (Figura 12c) y luego al vacío en un rotaevaporador. Este proceso se repitió tres veces, obteniéndose ~500

mg de extracto crudo (extracto 01004-48-17). Por otra parte, los extractos de la resina se obtuvieron mediante una maceración de la misma con MeOH durante 20 min de agitación constante a 120 rpm. Este extracto se repitió dos veces (extracto 01004-48-18).

Finalmente, los extractos del pellet bacteriano se obtuvieron también por maceración con 250 mL de AcOEt (Figura 12a). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 2h (120 rpm). Transcurrido el tiempo, la fase orgánica se separó mediante filtración por gravedad y se secó sobre en Na_2SO_4 anhidro (Figura 12d) y luego al vacío en un rotaevaporador. Este proceso se repitió dos veces obteniéndose ~500 mg de extracto (extracto 01004-48-19). Por último, la resina se sometió al mismo procedimiento, pero utilizando MeOH de extracción (extracto 01004-48-20) (Jayanetti *et al.*, 2019).

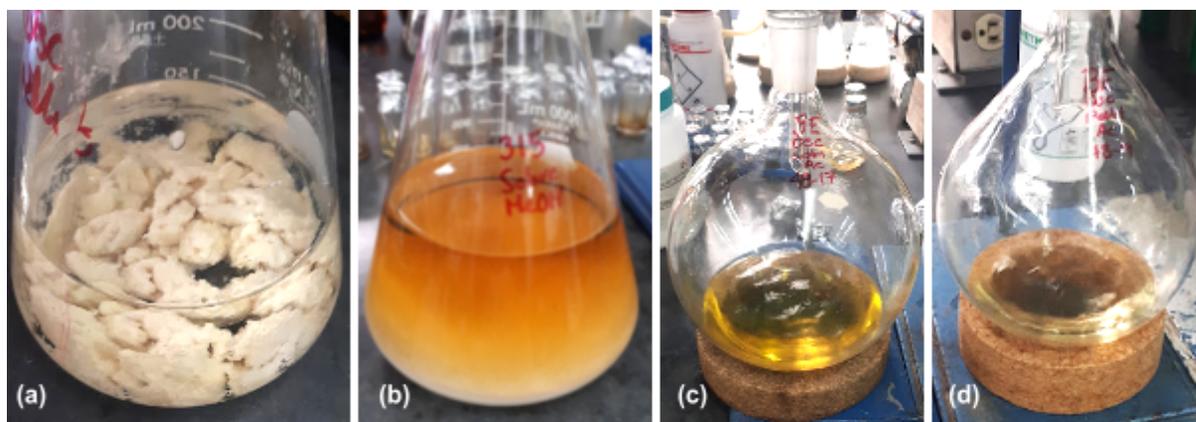


Figura 12. Extracción del pellet bacteriano con AcOEt; se puede observar que la fase orgánica tiene una coloración amarilla muy ligera (a), y extracción del sobrenadante que contiene la resina con MeOH; la coloración de la fase orgánica es de color naranja muy intenso (b). La extracción usando el disolvente AcOEt es menos agresiva que con el MeOH debido a la diferencia de polaridad. La fase orgánica de las extracciones en el sobrenadante (c) y en el pellet (d) con los compuestos extraídos se filtró en Na_2SO_4 anhidro para eliminar la humedad.

6.4. Prueba de actividad metabólica MTT en microplaca de 96 pozos

Con el objetivo de determinar si los extractos crudos presentan actividad biológica, se realizó un ensayo de susceptibilidad contra bacterias patógenas empleando como colorante revelador al bromuro de MTT.

6.4.1. Preparación de los microorganismos patógenos de prueba, solución reveladora de MTT, soluciones Stock de antibióticos y soluciones de los extractos

La metodología se ejecutó de acuerdo al reporte técnico del bioensayo hecho por Martínez (2021). Las bacterias empleadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 sensible (MSSA) y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina (MRSA). Dichas bacterias se mantenían congeladas en medio de cultivo Caldo Müller-Hinton (CMH) y se resembraron en el mismo medio 24 h antes del ensayo biológico. El medio de cultivo CMH se preparó a partir del reactivo comercial a una concentración de 37 g/L. Transcurrido el tiempo, se efectuó la suspensión de estos microorganismos en tubos de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril, adicionando alícuotas de 100 μ L del microorganismo hasta alcanzar visualmente la turbidez del estándar de McFarland (0.5, 5105 UFC/mL). El estándar de turbidez 0.5 escala de McFarland se preparó previamente en un matraz volumétrico de 100 mL, agregando 500 μ L de una solución de BaCl₂ al 1% y llevando al aforo con una solución de H₂SO₄ al 1%.

La solución de MTT 97.5% se preparó con una concentración de 5 mg/mL en MeOH. Para ello, 51.3 mg del reactivo MTT se disolvieron en 10 mL de MeOH. Como controles positivos del ensayo se emplearon los antibióticos ampicilina sódica y clorhidrato de vancomicina, a partir de una solución stock (1.0 mg/mL) de cada antibiótico en el medio CMH y se realizó una dilución a un volumen mínimo de 300 μ L con medio de cultivo a una concentración final de 8 mg/mL y 0.05 mg/mL, respectivamente. Los extractos de prueba (01004-48-17, 01004-48-18, 01004-48-19 y 01004-48-20) se prepararon a una concentración de 1.0 mg/mL usando como disolvente DMSO al 10%. De la disolución anterior se tomó una alícuota de 10 μ L y se diluyó en 90 μ L de DMSO al 10% para obtener la disolución de cada extracto a una concentración de 0.1 mg/mL.

6.4.2. Ensayo de las curvas de antibióticos

La curva de antibiótico se construyó por duplicado en la fila A y B para cada antibiótico, se empleó ampicilina sódica para MSSA y clorhidrato de vancomicina

para MRSA (Figura 13). Con la pipeta multicanal se colocaron 50 μ L de medio de cultivo CMH en los pozos 2 - 12, en el pozo 1 se colocó la solución del antibiótico puro a evaluar (100 μ L). Del primer pozo se transfirió un volumen de 50 μ L al segundo pozo y se homogeneizó con la pipeta multicanal, del segundo pozo se transfirieron 50 μ L al tercer pozo y se mezcló, el proceso se repitió hasta el pozo 9 y los últimos 50 μ L de la mezcla se desecharon (Figura 13). Posteriormente, se adicionó un volumen de 50 μ L de DMSO al 10% en el pozo 11, se mezcló y se desecharon 50 μ L, este es el control de disolvente. En los pozos 1 - 11 se adicionó 100 μ L de medio CMH y 200 μ L en el pozo 12, el pozo 10 es el control de crecimiento y el pozo 12 el control de esterilidad. En los pozos 1 - 11 se adicionó 100 μ L de la suspensión de microorganismo de prueba y se llevó a incubar la microplaca por 24 h a 34 °C. Transcurrido el tiempo se adicionaron 10 μ L de la solución de MTT a todos los pozos y se incubó por 30 min más.

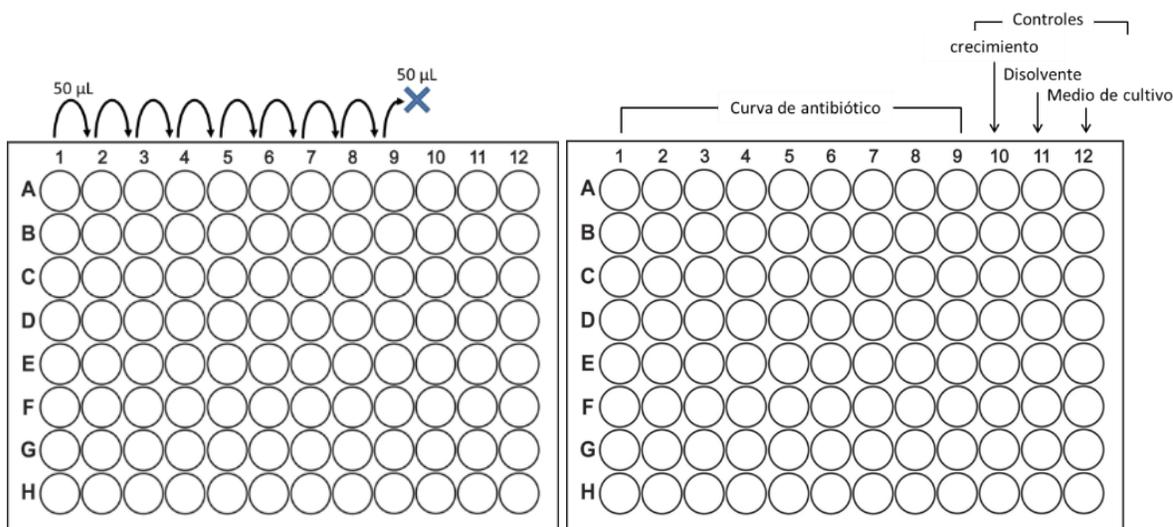


Figura 13. Se muestran las microplacas de 96 pozos con señalamientos de la metodología empleada para construir la curva de antibiótico. Tomado de Martínez (2021).

6.4.3. Ensayo de los extractos y cuantificación de la actividad biológica

Para los extractos 01004-48-17, 01004-48-18, 01004-48-19 y 01004-48-20, se colocó por duplicado 50 μ L de cada uno a la primera concentración (1 mg/mL) y en la siguiente fila 50 μ L de la segunda concentración (0.1 mg/mL) (Figura 14). Posteriormente, a cada pozo se le adicionó 100 μ L de medio de cultivo CMH y 100 μ L de suspensión de microorganismo de prueba, la microplaca se incubó por 24 h a

34 °C y al finalizar este periodo se le adicionó a cada pozo 10 µL de la solución de MTT y se incubó bajo las mismas condiciones durante 30 min más. Las concentraciones finales de evaluación de los extractos fueron de 200 y 20 µg/mL. La microplaca de 96 pozos con los ensayos para la curva de antibióticos y extractos se llevó al lector de absorbancia de microplacas BioRad iMark para cuantificar el nivel de actividad antimicrobiana que exhibió cada pozo. El instrumento se controló desde una computadora con el programa Microplate Manager 6 y se realizó la lectura a una longitud de onda de 490 y 608 nm.



Figura 14. A la izquierda se muestra el procedimiento para evaluar los extractos en la microplaca de 96 pozos. A la Derecha el lector de absorbancia de microplacas iMark, la microplaca de 96 pozos se colocó en la parte derecha del instrumento donde señala la flecha blanca.

Se calculó el porcentaje de inhibición a partir de los resultados de absorbancia obtenidos con el lector de microplacas BioRad iMark con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{A_{\text{POZO}} - A_{\text{BLANCO}}}{A_{\text{DMSO}} - A_{\text{BLANCO}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde A_{POZO} es la absorbancia del pozo que contiene el extracto, del cual se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al crecimiento del microorganismo patógeno, A_{BLANCO} es el control de esterilidad, representado por la absorbancia del pozo 12 de la curva de antibiótico (medio de cultivo) y A_{DMSO} es el control del disolvente de solubilización del formazán. Como se ejecutó el ensayo por duplicado, los resultados de la absorbancia de cada extracto, así como los resultados del blanco

y del disolvente, se promediaron y con esos valores se calculó el porcentaje de inhibición.

6.4.4. Perfil metabólico preliminar de extractos bacterianos asociados a la esponja

Los extractos crudos obtenidos a mediana escala de la cepa NCA-454 asociada a una esponja del ambiente anquihalino, fueron analizados usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) por el I.Q.I. Daniel Hernández del Laboratorio 125 de Productos Naturales. Para ello, se prepararon disoluciones de los extractos a una concentración de 10 mg/mL en dioxano-metanol 50:50, que posteriormente se inyectó en el equipo de HPLC, el cual se compone de una bomba cuaternaria, un automuestreado y los detectores de fotiodos (PDA) y de dispersión de luz evaporativa (ELSD). La fase estacionaria constó de una columna C18 KINETEX® y la fase móvil se compuso de 0.1% ácido fórmico en H₂O(A)-ACN(B) empleando el siguiente gradiente de elución: 0 - 5 min, 15% B; 5 - 20 min, 15 - 100% B; 20 - 25 min, 100% B; 25 - 26 min, 100 - 15% B; 26 - 32 min, 15% B) (Figura 15). El flujo empleado fue de 1 mL/min.

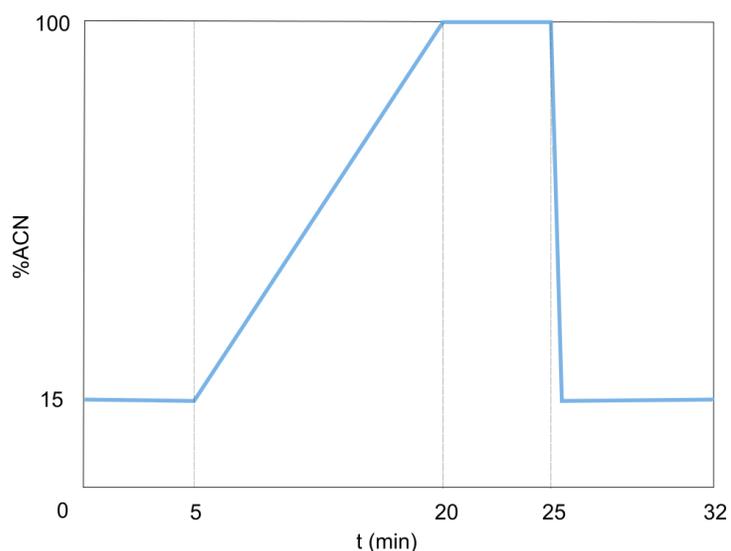


Figura 15. Método general de elución por gradiente 85:15 H₂O-ACN, empleado para analizar los extractos crudos en HPLC.

7. Resultados

7.1. Caracterización fisicoquímica de la cueva anquihalina

La cueva anquihalina ubicada en “Bajo de Judas”, Xcalak, tiene conexión directa al mar y ecosistemas de manglares en la entrada, lo que le proporciona materia orgánica disuelta en forma de detritos y de sedimentos del exterior. Cerca de su entrada se reportó mayor riqueza de especies (se observó una alta cantidad de pastos marinos del género *Thalassia* sp., así como una alta densidad de medusas de la especie *Cassiopea xamachana*), mientras que esta disminuyó dentro de la cueva con el aumento de la distancia lineal desde el mar. El sedimento de la cueva es de origen biogénico con una alta cantidad de conchas de gasterópodos. No cuenta con capa de haloclina y las características fisicoquímicas del agua del sitio de recolección son similares, tanto en la zona del espejo, donde hay luz solar, como dentro de la cueva, donde hay oscuridad total.

El parámetro fisicoquímico *Specific Conductance* (SPC) la conductancia específica o conductividad, es la medida estándar de la capacidad del agua para pasar el flujo eléctrico corregida a 25 °C. Como se observa en la tabla 1, el valor de SPC reportado en el espejo fue de 52,545 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a una temperatura de 30.4 °C, mientras que en la cueva fue de 53,178 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 31.0 °C, además a medida que la conductividad aumenta la resistividad disminuye de 17.90 en el espejo a 16.49 Ωm en la cueva. La salinidad tanto en el espejo como en la cueva se mantiene constante (34.45 - 34.55 ppt), no existen cambios bruscos en los diferentes niveles de profundidad (1 y 12 m) probablemente debido a que no presenta una capa de haloclina, lo cual también influye en el pH de la cueva, que es ligeramente alcalino (>8) y tiene una variación pequeña conforme aumenta la profundidad. La salinidad del agua contribuye a la conductividad, aunque la variación es pequeña, de 34.45 a 34.55 ppt, se observa que conforme aumenta la salinidad también aumenta la conductividad. El TDS (del inglés *Total Dissolved Solids*) es la cantidad de sólidos disueltos totales en el agua de mar, el valor reportado en el espejo fue de 34,125 mg/L (34.13 ppt) y en la zona de la cueva de 34,450 mg/L (34.45 ppt), ambos valores

son aproximadamente iguales a la salinidad reportada para cada zona. La temperatura del agua aumentó ligeramente a medida que la profundidad incrementó, pasó de 30.4 en 1 m a 31.0 °C en los 12 m. Por el contrario, el oxígeno disuelto (DO, del inglés *Dissolved Oxygen*) disminuyó en la cueva, de 4.24 a 3.77 mg/L, con el aumento de la profundidad. El contenido de nitratos tomado con el sensor, aumentó en la zona de la cueva con 6.34 mg/L, mientras que en la zona del espejo disminuyó hasta 4.30 mg/L.

Tabla 1. Datos fisicoquímicos del agua en el área de estudio. Donde: SPC es la conductividad, C la conductancia, TDS es el total de sólidos disueltos, N - NO₃⁻ es el contenido de nitratos y DO el oxígeno disuelto.

Variables fisicoquímicas	Espejo	Cueva
Profundidad (m)	1	12
Temperatura (°C)	30.4	31.0
SPC (μS/cm)	52545	53178
C (μS/cm)	58157	60755
Resistividad (Ωm)	17.19	16.49
TDS (mg/L)	34125	34450
Sal (ppt)	34.45	34.55
pH	8.02	8.22
N - NO ₃ ⁻ (mg/L)	4.30	6.34
DO (mg/L)	4.24	3.77

7.1.1. Identificación taxonómica de la esponja colectada

La identificación taxonómica de la esponja fue confirmada usando una combinación de análisis espicular y análisis bioinformático de las regiones V4 a V7 de los genes 16S y 18S ARNr. Los resultados del análisis de las lecturas *forward* y *reverse* con RiboTagger que se compararon utilizando la base de datos en línea y la aplicación BLASTn del NCBI con un porcentaje de identidad superior al 97%, revelaron que la esponja colectada en este estudio, pertenece al género *Haliclona* y

subgénero *Soestella* (Tabla 2). Este análisis se complementó con los resultados de taxonomía clásica espicular y de otras características morfológicas efectuados por la M. en C. Diana Ugalde, los cuales asignaron la taxonomía de la esponja hasta un nivel de género. Con el análisis bioinformático no fue posible identificar la taxonomía de la esponja colectada hasta especie debido a que las secuencias se empalmaban con las de otras especies, sin embargo, sí fue posible identificar el subgénero. La esponja colectada, *Haliclona (Soestella)* (Figura 16), es un organismo sésil que se encontró asociada al techo de la cueva, por lo que se clasificó como incrustante, tiene una coloración marrón claro, su textura es porosa y lisa, con un aspecto semejante al biofilm, y aparte de los montículos osculares, presenta ósculos distribuidos en todo el cuerpo.



Figura 16. Fotografía de *Haliclona (Soestella)* tomada en la zona oscura de la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak. Tomado de Liévano & Rodríguez (2020).

Tabla 1. Taxonomía sistemática asignada a la esponja.

Nivel taxonómico	Asignación
Filo	<i>Porifera</i>
Clase	<i>Demospongiae</i>
Orden	<i>Haplosclerida</i>
Familia	<i>Chalinidae</i>
Género	<i>Haliclona</i>
Subgénero	<i>Soestella</i>

7.2. Análisis bioinformático

El análisis de la microbiota de la esponja *Haliclona (Soestella)* que habita en una cueva anquihalina de la Península de Yucatán se efectuó utilizando amplicones del gen 16S ARNr. La secuenciación de extremos emparejados en plataforma Illumina MiSeq de la muestra E3 produjo 101,298 secuencias *forward* y 101,298 secuencias *reverse*, con una longitud promedio de 291 pb.

7.2.1. Control de calidad y eliminación de ruido de las secuencias

Luego de parear el *forward* y el *reverse* y aplicar un control de calidad (con Q mínimo de 20) obtuvimos 87,887 secuencias de alta calidad. Después de eliminar secuencias de ruido con el programa Deblur (longitud de 250 pb) obtuvimos 70,276 secuencias de las cuales 3,422 secuencias fueron truncadas porque excedían dicha longitud. Las 17,611 lecturas restantes que se eliminaron se dividen en 15,674 lecturas que excedían el máximo de bases ambiguas, más 1,937 lecturas que medían menos de 250 pb (Tabla 3). Las 70,276 secuencias de alta calidad fueron agrupadas en 160 variantes de secuencia de amplicón (ASVs, por sus siglas en inglés) y constituyen un grupo de fragmentos de secuencia con coincidencias exactas.

Tabla 3. Estadísticas del control de calidad de las secuencias con Deblur.

ID de la muestra	Lecturas totales de entrada	Lecturas totales retenidas	Lecturas truncadas	Lecturas demasiado cortas después del truncamiento	Lecturas que exceden el máximo de bases ambiguas
AMP043 (E3)	87,887	70,276	3,422	1,937	15,674

7.2.2. Análisis de la curva de rarefacción

El análisis de rarefacción (Figura 17) mostró que la muestra fue secuenciada a una profundidad suficiente, ya que la curva se acerca a una asíntota, es decir, a una pendiente de cero, cercana a las 5,000 lecturas de secuencias recuperadas por amplicón, más allá de esa profundidad de muestreo, la recolección de secuencias adicionales no resulta en la observación de más ASVs. El análisis de la curva de

rarefacción indicó que la riqueza de la comunidad microbiana presente en la muestra de *Haliclona (Soestella)* se capturó por completo durante el proceso de secuenciación, ya que se llegó a la asíntota.

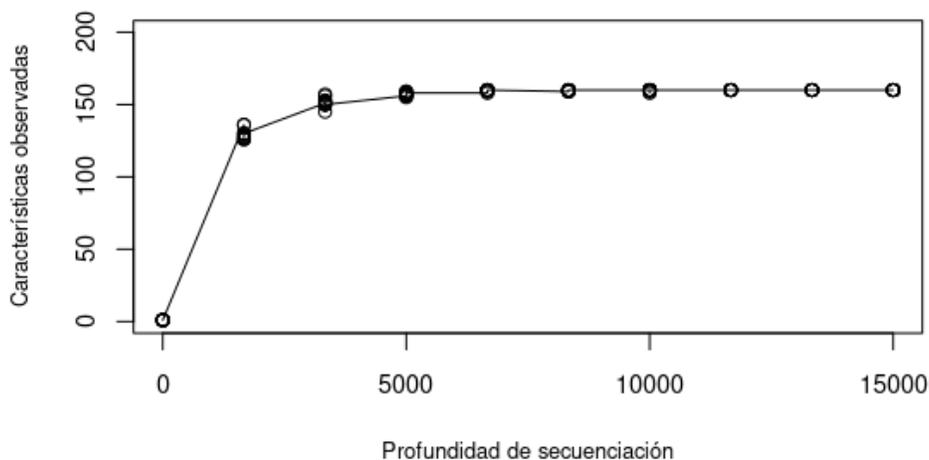


Figura 17. Curva de rarefacción basada en la medida de diversidad filogenética alfa.

7.2.3. Comparación de la asignación taxonómica del microbioma de *Haliclona* utilizando diferentes bases de referencia

Con el objetivo de determinar cuál es la mejor base de datos para evaluar la comunidad microbiana de *Haliclona (Soestella)*, se sometieron los 160 ASVs a 3 bases de datos de 16S ARNr distintas. La asignación taxonómica se realizó comparando las secuencias representativas de cada ASV con secuencias de referencia de tres bases de datos especializadas en secuencias del gen 16S ARNr: SILVA, Greengenes y NCBI.

En cuanto a filo, clase, familia y género, SILVA fue la base de datos más exitosa (Figura 18), con un porcentaje de asignación taxonómica del 96, 96, 57 y 33%, respectivamente, y un total del 4, 4, 25, 43 y 67% de lecturas “sin asignar”, respectivamente. Greengenes obtuvo una mayor asignación a nivel orden (84%) que cualquiera de las otras dos bases de datos y también logró asignar un alto porcentaje de la taxonomía a nivel filo y clase, con 94% en ambas. NCBI tuvo su mayor éxito en la asignación con respecto al género (32%), sin embargo, en comparación con SILVA, NCBI asignó menos géneros.

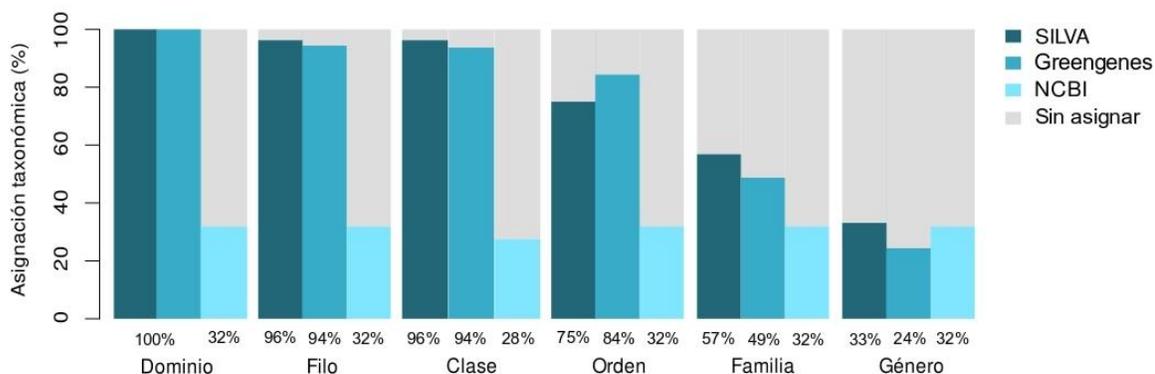


Figura 18. Comparación del porcentaje de asignación taxonómica de la comunidad microbiana asociada a la esponja *Haliclona (Soestella)* entre las bases de datos SILVA 138 99%, Greengenes 13_8 99% y NCBI BLAST+ 2.13.0 \geq 95%.

7.2.4. Asignación taxonómica del microbioma de *Haliclona (Soestella)*

Debido a la robustez de la base de datos SILVA 138, esta se utilizó para el análisis taxonómico de 70,276 lecturas de *Haliclona*. En total se encontraron 8 filos, 11 clases, 23 órdenes, 21 familias y 18 géneros bacterianos junto con 1 filo, 1 clase, 1 orden, 1 familia y 1 género arqueano (Figura 19). El 83.3% del total de lecturas y el 93.8% de los ASVs de la comunidad microbiana (Bacteria y Archaea) se asignaron a Bacteria. Dentro de Bacteria, Proteobacteria (con un 68.6% de abundancia relativa), fue el filo de mayor abundancia, seguidos por: Campylobacterota (5.2%), Bacteroidetes (5.1%), Desulfobacterota (2.11%) y Actinobacteria (1.71%). Los filos asignados como “Otros” (Figura 19) corresponden a Cyanobacteria (0.2%), Verrucomicrobia (0.1%) y Chloroflexi (0.1%).

En general, las clases Gammaproteobacteria (41.6%) y Alphaproteobacteria (27.0%) fueron las más dominantes del microbioma, seguidas por Campylobacteria (5.2%) y Bacteroidia (5.1%) con abundancias relativas bajas. A nivel de orden, Rhodobacterales (35.0%), Cellvibrionales (15.0%) y Campylobacterales (6.9%) tuvieron la mayor abundancia. Mientras que las familias Rhodobacteraceae (36.9%), Halieaceae (15.8%) y Sulfurospirillaceae (6.3%) fueron las más abundantes. Por último, los géneros de mayor abundancia fueron *Sulfurospirillum* (33.6%), *Desulfovibrio* (15.6%), *Ulvibacter* (15.4%), *Pseudomonas* (8.4%) y *Ruegeria* (7.3%). El 16.7% de las lecturas totales se asignaron a Archaea. En este dominio solo un filo

fue detectado, Crenarchaeota (16.9%), que fue el segundo más abundante de todo el microbioma e incluyó a la clase Nitrososphaeria (16.9%), el orden Nitrosopumilales (22.6%), la familia Nitrosopumilaceae (23.9%) y, en cuanto a género, a *Candidatus Nitrosopumilus* (1.3%) como el único representante de este dominio.

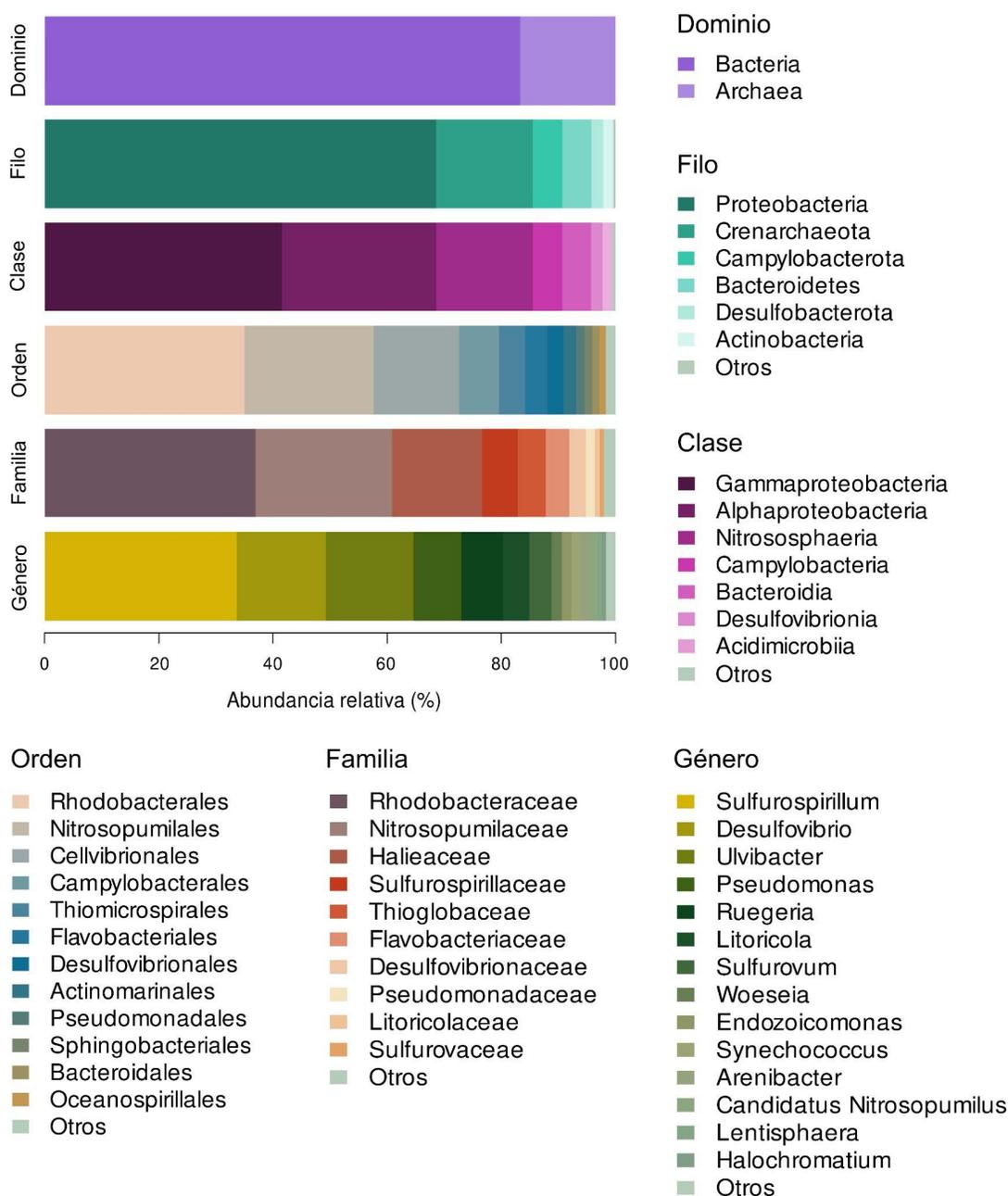


Figura 19. Perfil de la comunidad microbiana asociada a *Haliclona (Soestella)* procesada con QIIME2. La taxonomía de los 160 ASVs se asignó usando SILVA 138 con un 99% de homología en la secuencia. La taxa con abundancias relativas $\leq 0.5\%$ se agruparon como "Otros".

Para examinar las distribuciones jerárquicas, la abundancia y diversidad de la comunidad microbiana dentro de *Haliclona (Soestella)* se realizó un árbol de calor, en donde el tamaño y el color de los nodos están relacionados con la abundancia de los microorganismos (Figura 20). La comunidad microbiana fue dominada por *Bacteria* (Figura 19) con 150 de los 160 ASVs totales (Figura 20). Dentro de este dominio, el filo Proteobacteria fue el más abundante con 76 de 160 ASVs asignados y estuvo representado por los géneros: *Pseudomonas* (8.4%), *Ruegeria* (7.3%), *Litoricola* (4.6%), *Woeseia* (1.8%), *Endozoicomonas* (1.7%) y *Halochromatium* (0.7%) (Figura 20). Por otra parte, la mayoría de los géneros asignados del filo Proteobacteria pertenecen a la clase Gammaproteobacteria, por lo que fue la más diversa dentro de este filo, mientras que solo un género, *Ruegeria*, perteneció a Alphaproteobacteria.

El segundo filo más abundante fue Crenarchaeota, el cual fue el único filo arqueal cuya única familia Nitrosopumilaceae, tuvo un género asignado: *Candidatus Nitrosopumilus* (1.3%), que fue asignado a 3 de los 10 ASVs arqueales (Figura 20), por lo que resultaron 7 ASVs sin asignación de género. El tercer filo con una alta abundancia fue Campylobacterota con 11 ASVs asignados, de este se identificó un único orden, Campylobacterales, el cual estuvo representado por dos géneros, uno con la mayor abundancia relativa dentro del microbioma *Sulfurospirillum* (33.6%), y otro con poca abundancia, *Sulfurovum* (3.9%) (Figura 19, Figura 20). El cuarto filo más abundante fue Bacteroidetes con 27 de 160 ASVs, dentro del cual cuatro de los cinco géneros asignados pertenecieron a la familia Flavobacteriaceae: *Ulvibacter* (15.4%), *Arenibacter* (1.5%), *Polaribacter* (0.5%) y *Aquibacter* (0.4%); y el último género, *Candidatus Aquirestis* (0.4%) perteneció a la familia Saprospiraceae (Figura 20). El quinto filo más abundante fue Desulfobacterota con 5 ASVs asignados, de los cuales 4 se asignaron al género *Desulfovibrio* (15.6%) y 1 quedó sin asignar.

Los filos bacterianos Verrucomicrobia, Cyanobacteria y Chloroflexi, estuvieron representados por un solo género: *Lentisphaera* (1.0%), *Synechococcus* (1.6%) y *Leptolinea* (0.5%), respectivamente (Figura 20). Actinobacteria con 18 ASVs asignados, estuvo mayormente representado por el orden Actinomarinales, pero no se lograron asignar familias ni géneros. Además, el árbol reveló taxa que contiene

solo linajes grises, como Chloroflexi y algunos órdenes de Bacteroidetes, Desulfobacterota y Proteobacteria, como Rhodothermales, Cytophagales, Chitinophagales, Desulfobacterales, Thalassobaculales y Methylococcales, lo que indica que estos grupos taxonómicos están mal representados en la base de datos de secuencias de referencia SILVA 138 99%, debido a la poca cantidad de lecturas que se obtuvieron.

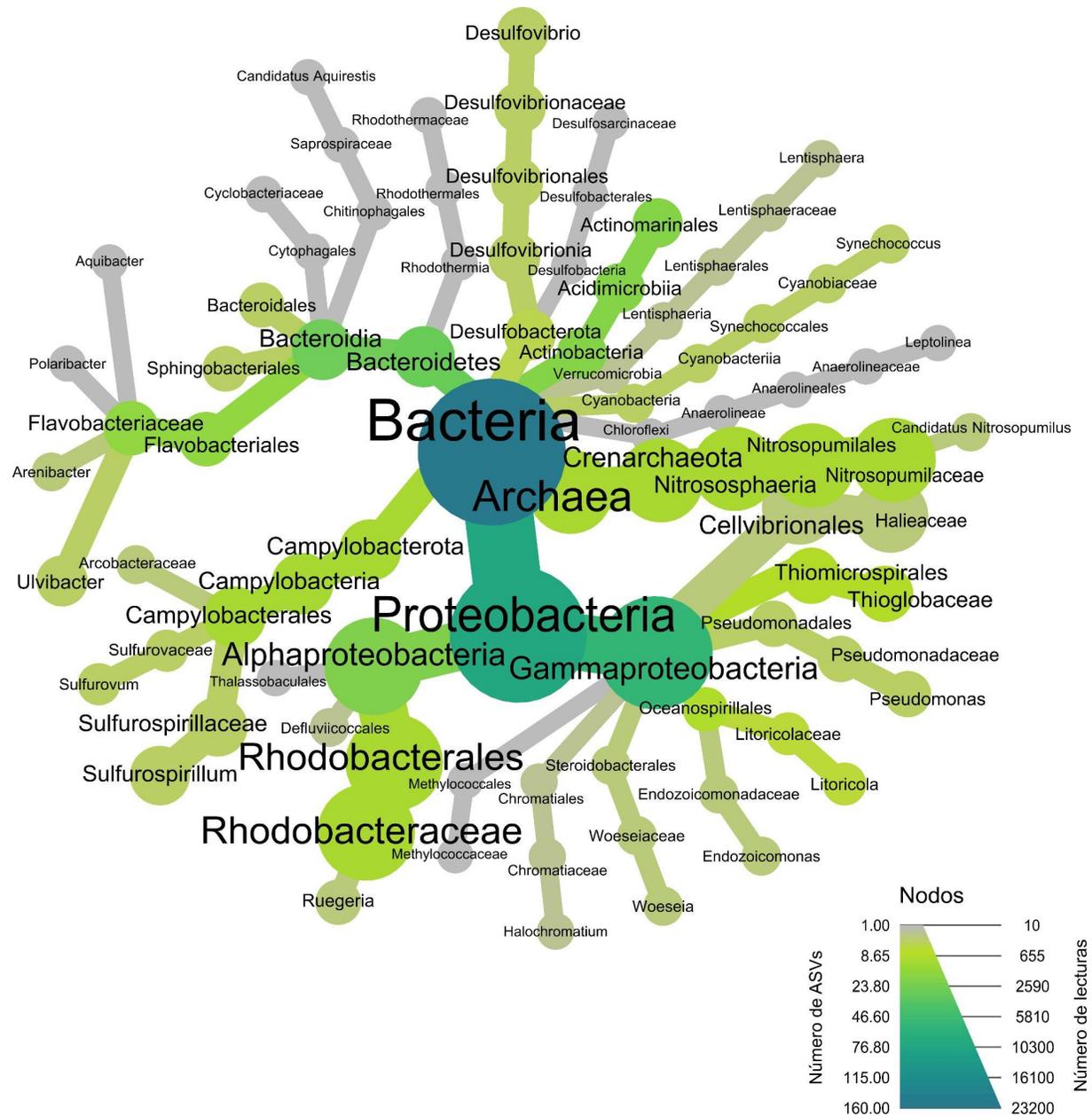


Figura 20. Árbol de calor que muestra la jerarquización taxonómica asignada por SILVA 138 99% al microbioma de *Haliclona* (*Soestella*). El color del nodo representa el número de ASVs que

están bien caracterizados, mientras que el tamaño del nodo indica la cantidad de ASVs asignados a cada taxón y el ancho del borde indica la cantidad de lecturas.

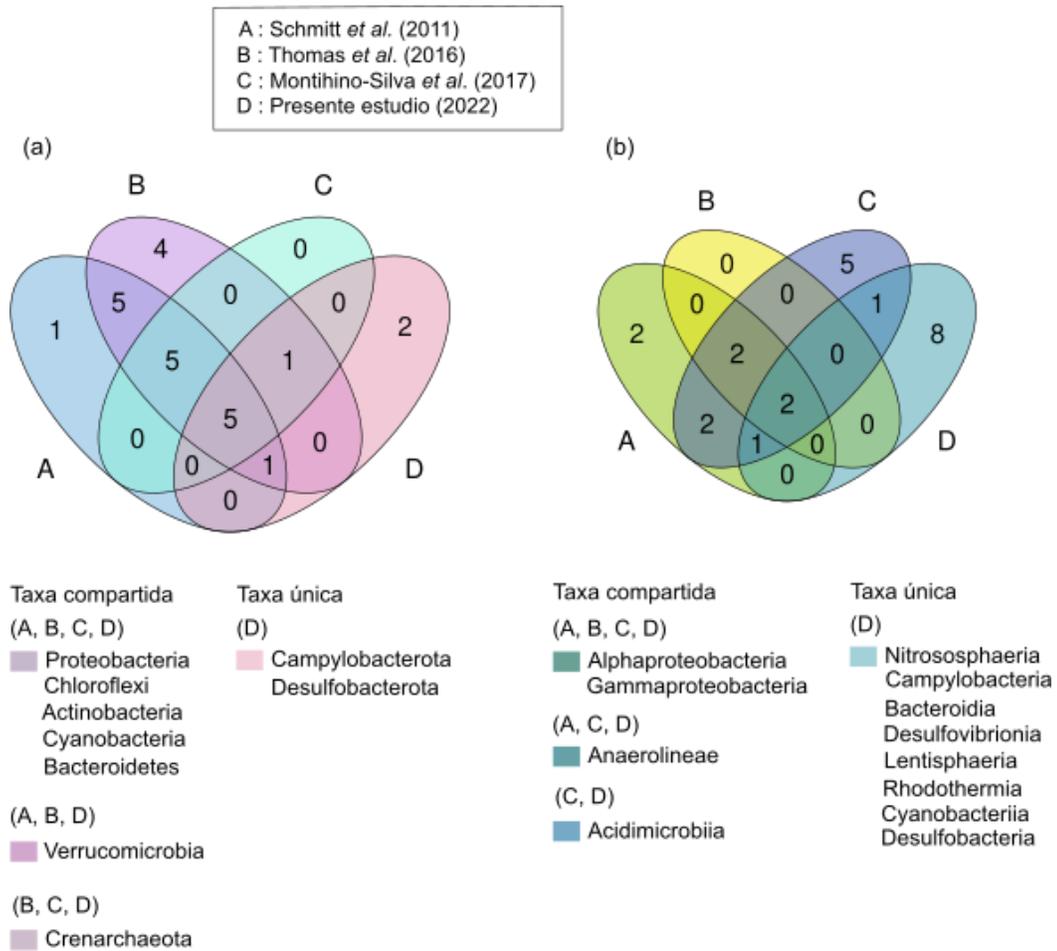


Figura 21. Diagramas de Venn que resumen la cantidad de taxa en el microbioma de esponja compartida entre los estudios globales A, B y C, contra los resultados obtenidos en el presente estudio de la esponja *Haliclona (Soestella)*; a nivel de (a) filo y (b) clase.

Finalmente, para comparar los resultados obtenidos en este proyecto con los 3 estudios del microbioma de esponja más importantes que se han hecho a nivel mundial: Schmitt *et al.* (2011), Thomas *et al.* (2016) y Moitinho-Silva *et al.* (2017) (Sección 5.1), se elaboraron los diagramas de Venn-Euler a nivel filo y clase. En cuanto a filo hay 5 taxa que comparten en común los 3 estudios del microbioma de esponja con *Haliclona (Soestella)*: Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria y Bacteroidetes (Figura 21a). Mientras que en clase solo coincidieron 2 taxa: Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria (Figura 21b).

Específicamente con el estudio del Proyecto del Microbioma de Esponja realizado por Moitinho-Silva *et al.* (2017), la esponja del presente estudio compartió 6 filos: los 5 ya mencionados anteriormente y el filo Crenarchaeota, este filo arqueal también estuvo presente en el estudio de Thomas *et al.* (2016). El filo Verrucomicrobia detectado en *Haliclona (Soestella)* también se reportó en los estudios de Schmitt *et al.* (2011) y Thomas *et al.* (2016). Los únicos dos filos de *Haliclona (Soestella)* que no se reportaron en ninguno de los otros estudios fueron Campylobacterota y Desulfobacterota (Figura 21a). La clase Anaerolineae estuvo presente en los estudios de Schmitt *et al.* (2011) y Moitinho-Silva *et al.* (2017), mientras que la clase Acidimicrobiia fue la única que *Haliclona (Soestella)* compartió exclusivamente con el Proyecto del Microbioma de la Esponja. A diferencia del filo, en el nivel clase se encontraron más taxa únicas asociadas a la esponja de estudio con 8 divisiones: Nitrososphaeria, Campylobacteria, Bacteroidia, Desulfovibrionia, Cyanobacteriia, Lentisphaeria, Rhodothermia y Desulfobacteria (Figura 21b).

7.3. Cultivo a mediana escala de *Nocardiopsis dassonvillei*

En el estudio dependiente de cultivo se investigó una de varias cepas cultivables que se aisló de la esponja colectada, la cepa NCA-454, la cual se identificó a nivel de especie como *Nocardiopsis dassonvillei*. Esta bacteria se estudió mediante el crecimiento a mediana escala, la obtención de extractos crudos y una prueba de actividad antimicrobiana. Se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición que tuvo cada extracto de la cepa bacteriana tanto a pequeña como mediana escala. También se presentan los resultados de la identificación taxonómica de la cepa NCA-454, asignada por medio de secuenciación y análisis del gen 16S ARNr.

7.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja

A partir de la muestra de *Haliclona (Soestella)* en total lograron aislar 13 cepas bacterianas en medio agar marino y agar agua, 2 de ellas fueron enviadas desde el Laboratorio C de Ecología Marina y Productos Naturales Marinos (LEMyPNM) ubicado en Sisal, Yucatán al Laboratorio 125 del Conjunto E de la Facultad de

Química en Ciudad Universitaria (CU), donde solo una de estas 2 cepas se cultivó y estudió, la cepa bacteriana NCA-454. Dicha cepa se escogió porque fue la única que, en ensayos previos a pequeña escala, presentó extractos con actividad antimicrobiana parcial contra dos cepas de *Staphylococcus aureus*: MRSA y MSSA.

7.3.2. Identificación de la cepa bacteriana NCA-454

Para corroborar la calidad e integridad del ADNg extraído de la cepa y del amplicón de su 16S ARNr, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La banda del ADNg extraído comparada con el ADN marcador 1 Kb Plus DNA Ladder colocado en el carril 1, muestra una longitud aproximada de 10,000 pb y su pureza es de una concentración mayor a 10 ng/mL (Figura 22a). El amplicón resultante de la amplificación del gen 16S ARNr por PCR (Figura 22b), tiene una longitud cercana a 1500 pb indicada con el ADN marcador 1 Kb Plus DNA Ladder colocado en el primer pocillo, por lo que corresponde con el tamaño esperado del fragmento.

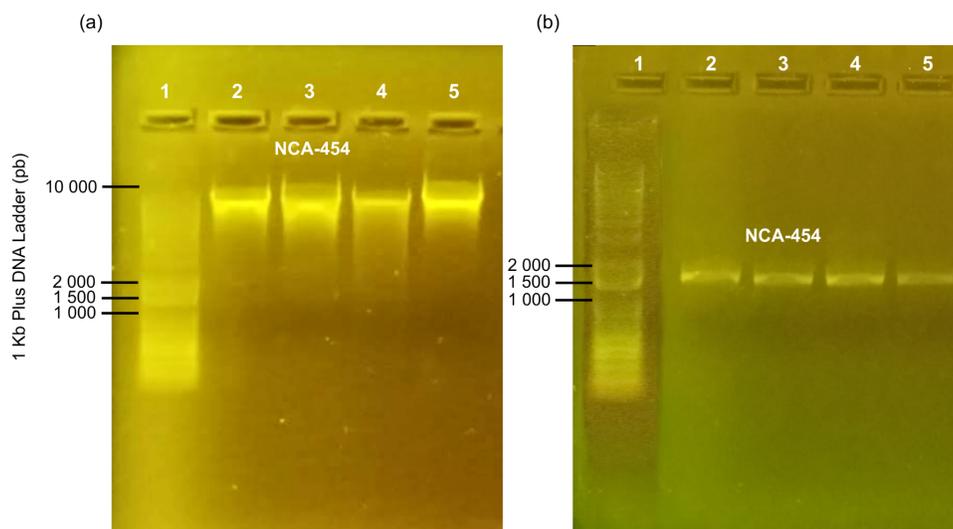


Figura 22. Fotografía del gel de agarosa teñido: (a) ADN genómico de la cepa bacteriana NCA-454 y (b) producto de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr; ambos en el carril 3 de cada gel. El ADN marcador se colocó en el carril 1. En el carril 2, 4 y 5 hay muestras de otras bacterias que no conciernen a esta investigación.

La secuenciación del amplicón del gen 16S ARNr de la cepa bacteriana NCA-454 resultó en una secuencia con una longitud de 1064 pb en formato (*.ab1). El análisis bioinformático de dicha secuencia empleando *nucleotide* BLAST+ 2.13.0, devolvió la asignación taxonómica hasta nivel de especie (Tabla 4) con un porcentaje

de identidad del 99%, un *e-value* de 0.0 y un porcentaje de cobertura del 98%. La cepa bacteriana NCA-454 aislada de la esponja *Haliclona (Soestella)* proveniente de la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak, se identificó como *Nocardiosis dassonvillei*, la cual pertenece al filo Actinobacteria, que fue detectado previamente como parte del microbioma de la esponja estudiada. *N. dassonvillei* es una bacteria de color blanco a beige, con forma redonda, pulverulenta y crece hundida en el medio (Figura 23).

Tabla 4. Taxonomía sistemática asignada a la cepa bacteriana NCA-454.

Nivel taxonómico	Asignación
Filo	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinomycetia</i>
Orden	<i>Streptosporangiales</i>
Familia	<i>Nocardiosaceae</i>
Género	<i>Nocardiosis</i>
Especie	<i>Nocardiosis dassonvillei</i>



Figura 23. Fotografía del cultivo axénico de la cepa bacteriana NCA-454 (*Nocardiosis dassonvillei*) en caja de Petri con medio A1 rico en sales. Obtenido mediante la técnica de siembra por estría en placa de agar.

7.3.3. Extractos obtenidos de la cepa bacteriana *Nocardiopsis dassonvillei*

Se prepararon en total 8 extractos de la bacteria *Nocardiopsis dassonvillei*, de los cuales 4 fueron obtenidos de los cultivos en pequeña escala y 4 de los de mediana escala (Tabla 5): 2 extractos metanólicos del pellet bacteriano y del sobrenadante y 2 extractos de AcOEt del pellet bacteriano y del sobrenadante. Los extractos en pequeña escala presentaron coloraciones distintas, los del sobrenadante (01004-37-32 y 01004-37-40) eran cafés, y los del pellet bacteriano, el 01004-37-36 y 01004-37-44 era anaranjado y café-rojizo, respectivamente (Figura 24a). Por otra parte, los extractos en mediana escala del sobrenadante (01004-48-17 y 01004-48-18) y uno obtenido de pellet bacteriano con AcOEt (01004-48-19) presentaron un color café muy oscuro, y el extracto 01004-48-20 obtenido del pellet bacteriano con MeOH, mostró una coloración amarilla-anaranjada (Figura 24b).

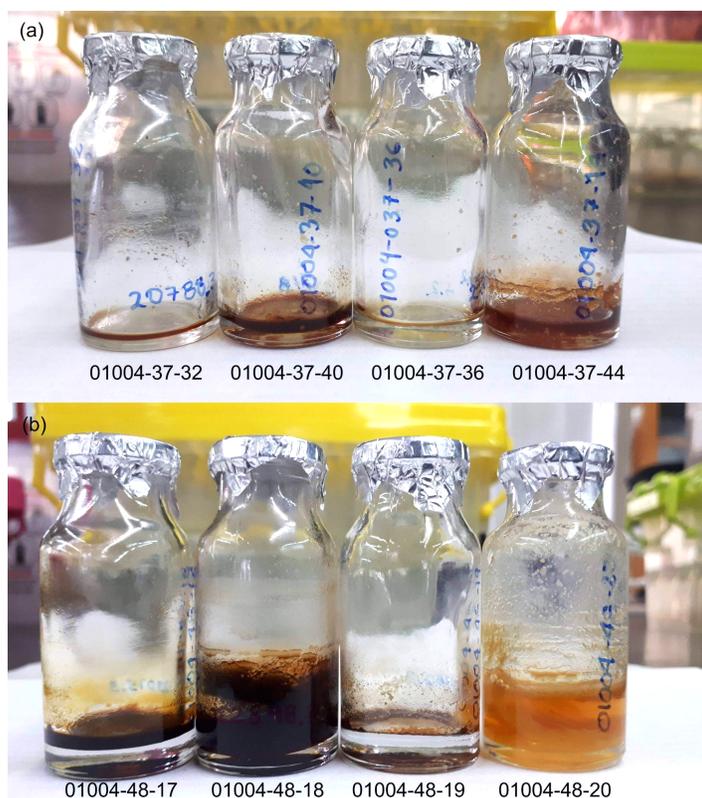


Figura 24. Fotografías de los extractos crudos: (a) pequeña y (b) mediana escala, obtenidos luego de evaporar el exceso de cada disolvente empleado.

Tabla 5. Rendimientos de los extractos obtenidos a mediana escala de *N. dassonvillei*.

Relación de claves Laboratorio 125		Origen del extracto	Disolvente de extracción	Rendimiento [mediana escala] (mg)
Pequeña escala	Mediana escala			
01004-37-32	01004-48-17	Sobrenadante	AcOEt	297.6
01004-37-40	01004-48-18	Sobrenadante	MeOH	3510.1
01004-37-36	01004-48-19	Pellet bacteriano	AcOEt	53.3
01004-37-44	01004-48-20	Pellet bacteriano	MeOH	3172.7

Cabe mencionar que los rendimientos de los extractos en pequeña escala fueron del orden de 5-10 mg, por lo que únicamente se emplearon para su evaluación biológica. Por otra parte, los rendimientos de los extractos metanólicos en mediana escala fueron mayores que los de AcOEt, obteniéndose 3510.1 mg y 3172.7 mg de los extractos metanólicos del sobrenadante y del pellet, y 297.6 mg y 53.3 mg de los extractos de AcOEt del sobrenadante y del pellet, respectivamente (Tabla 5).

7.4. Prueba de actividad metabólica MTT y caracterización por HPLC

La actividad biológica de los extractos crudos de la cepa NCA-454 se determinó por el porcentaje de inhibición que presentaron frente a las cepas patógenas: MSSA y MRSA (Figura 25, Figura 26). Además, se obtuvo un perfil cromatográfico parcial de cada extracto a mediana escala utilizando la técnica de HPLC en fase reversa.

7.4.1. Ensayo de actividad metabólica: prueba del MTT

A partir de las curvas de antibióticos, se pudo determinar la absorbancia promedio del disolvente (Tabla 6, pocillo 11), 1.639 a 490 nm y 2.184 a 608 nm para MRSA, y, 1.998 a 490 nm y 2.838 a 608 nm para MSSA, y la absorbancia promedio del blanco (Tabla 6, pocillo 12), 0.115 a 490 nm y 0.070 a 608 nm para MRSA, y, 0.148 a 490 nm y 0.104 a 608 nm para MSSA. Estos valores se emplearon en la fórmula de la ecuación 1 (Anexo II) para calcular el porcentaje de inhibición de cada extracto a partir de su resultado de absorbancia obtenido con el lector de microplacas

BioRad iMark (Tabla 7). Los colores en las tablas 6 y 7, se asignaron con base en la observación visual de la disolución en la microplaca cuando ésta se reveló luego del periodo de incubación.

En la reacción de reducción del bromuro de MTT a su formazán (Figura 4), llevada a cabo en este ensayo, a medida que el formazán se formó por la reducción enzimática de la sal de tetrazolio de color amarillo claro a color morado, mayor fue la absorbancia y menor resultó el porcentaje de inhibición del extracto evaluado contra el patógeno de prueba. El color morado observado en la mayoría de los pocillos que contienen los ocho extractos (Figura 25, Figura 26), indicó que hubo actividad enzimática por parte del patógeno de prueba, sin embargo, el extracto no inhibió su actividad metabólica porque no presentó actividad biológica, y por ello el MTT se transformó a su formazán de color púrpura intenso. Solo uno de los cuatro extractos obtenidos a mediana escala, el 01004-48-19, fue particularmente activo contra MSSA y, el extracto 01004-48-20 fue parcialmente activo contra la misma cepa (Figura 26b), ambos extractos se obtuvieron del pellet bacteriano de la cepa posiblemente identificada como *Nocardiosis dassonvillei*. El primer extracto mencionado proviene de la fase metanólica y el segundo de aquella con acetato de etilo.

La actividad de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) varió según la cepa utilizada, para MRSA utilizando clorhidrato de vancomicina como antibiótico, la MIC fue de 12.5 µg/mL. Mientras que para MSSA usando ampicilina sódica la MIC fue de 4.0 mg/mL (Tabla 6). Algunos extractos inhibieron parcialmente la actividad metabólica de MSSA a una concentración de 200 µg/mL, mientras que el antibiótico empleado en la curva, ampicilina sódica, la inhibió a una MIC de 4000 µg/mL, lo que podría ser un indicio de que los extractos presentan una mayor actividad biológica.

La construcción de la curva de antibiótico sirve como un estándar para la comparación de la MIC en compuestos puros, sin embargo, con respecto a los extractos la curva de antibióticos fue útil por las absorbancias del blanco (medio de cultivo) y del disolvente (DMSO), los controles que se emplearon para determinar los porcentajes de inhibición (Tabla 7).

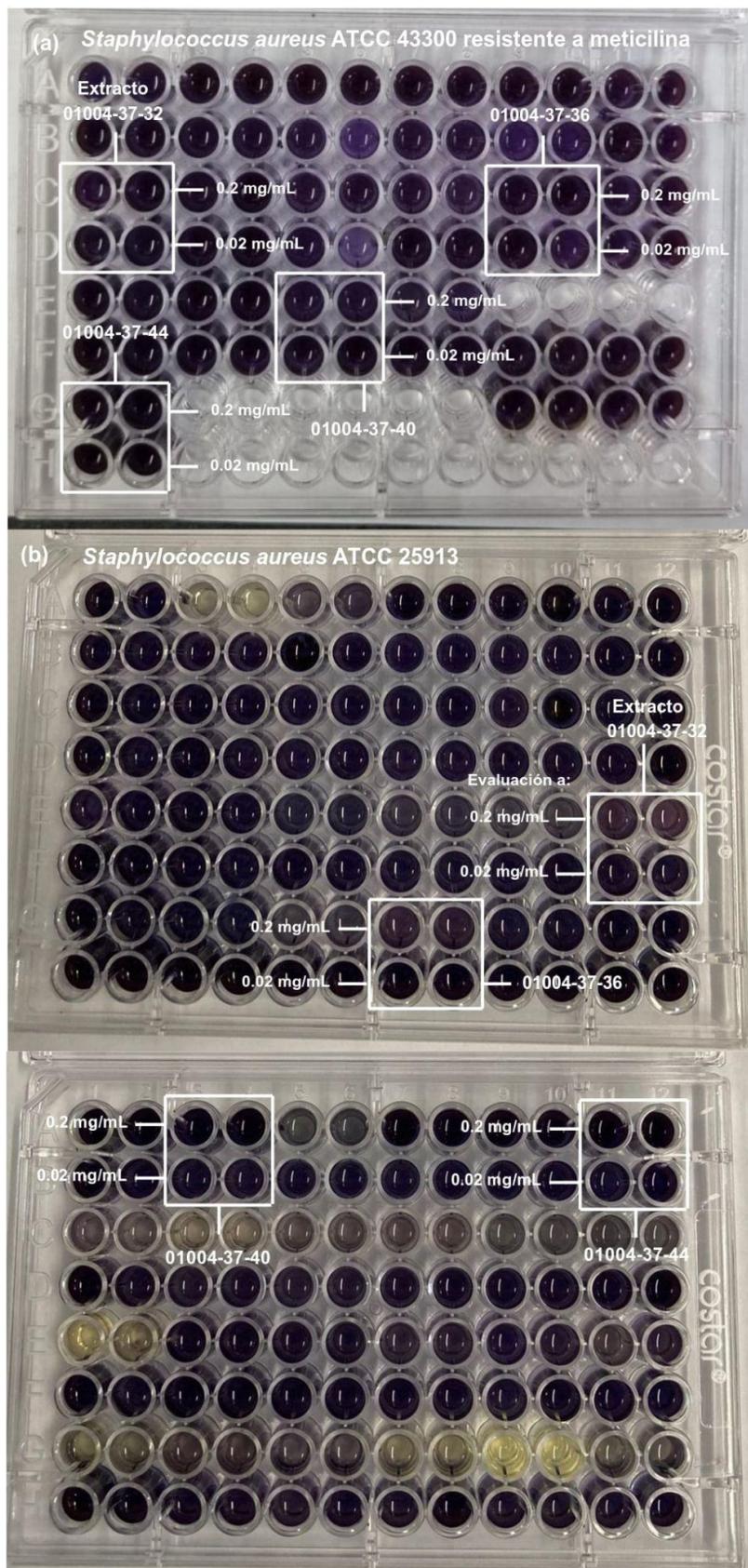


Figura 25. Fotografías de la evaluación de actividad antimicrobiana en microplacas de 96 pozos de los extractos a pequeña escala contra (a) MRSA y (b) MSSA, usando bromuro de MTT como colorante.

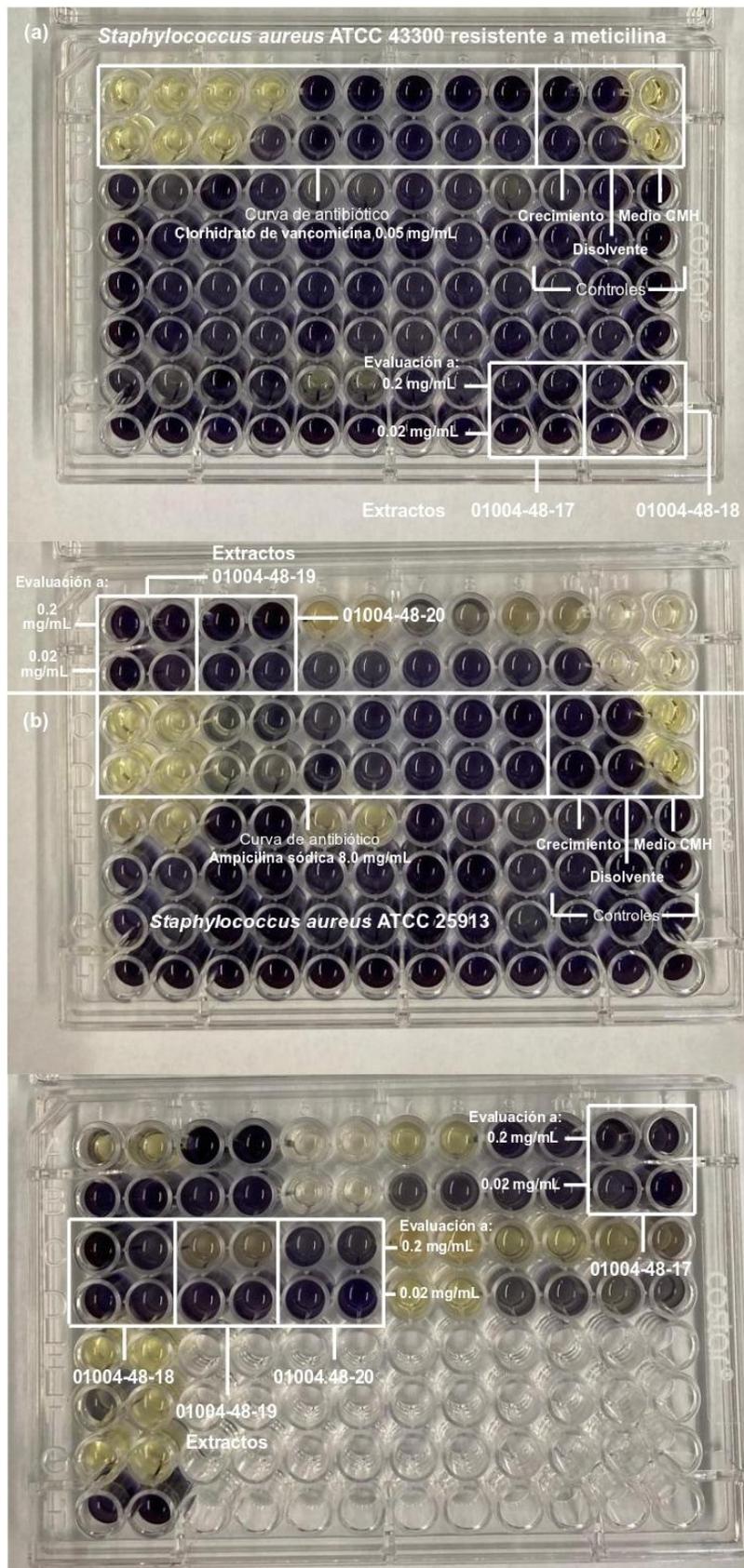


Figura 26. Fotografías de la evaluación de actividad antimicrobiana en microplacas de 96 pozos de los extractos a mediana escala contra (a) MRSA y (b) MSSA, usando bromuro de MTT como colorante. También se muestra la curva de antibiótico para cada bacteria en sus respectivas placas.

Tabla 6. Absorbancia promedio y concentración de las curvas de antibióticos en la prueba de actividad antimicrobiana.

* Pocillo donde se determinó la MIC de cada antibiótico.

Pocillo microplaca	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 resistente a meticilina Antibiótico: clorhidrato de vancomicina			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25913 Antibiótico: ampicilina sódica		
	C (µg/mL) Antibiótico	Absorbancia promedio		C (µg/mL) Antibiótico	Absorbancia promedio	
		490 nm	608 nm		490 nm	608 nm
1	50.0	0.084	0.061	8000	0.145	0.130
2	25.0	0.086	0.060	4000*	0.213	0.214
3	12.5*	0.098	0.067	2000	0.592	0.760
4	6.25	0.572	0.689	1000	0.857	1.150
5	3.125	1.916	2.681	500	1.130	1.514
6	1.563	1.829	2.495	250	0.977	1.262
7	0.781	2.078	1.829	125	1.095	1.415
8	0.391	1.450	1.902	62.5	1.212	1.529
9	0.195	1.944	1.377	31.25	1.606	2.202
10	Control de crecimiento	1.948	1.539	Control de crecimiento	1.625	2.195
11	Control de disolvente	1.639	2.184	Control de disolvente	1.998	2.838
12	Control de medio CMH	0.115	0.070	Control de medio CMH	0.148	0.104

De los primeros cuatro extractos obtenidos a pequeña escala, que ya habían sido previamente evaluados contra las dos cepas de *Staphylococcus aureus*, solo dos, el 01004-37-32 y 01004-37-36, presentaron una inhibición parcial del 50.3 y 47.0%, respectivamente, contra MSSA a una concentración de 200 µg/mL (0.2 mg/mL) y longitud de onda de 608 nm (Figura 25b, Tabla 7). Todos los extractos a pequeña escala no mostraron alta actividad antimicrobiana contra MRSA a ninguna de las dos concentraciones empleadas (200 y 20 µg/mL) (Figura 25a, Tabla 7), y por esa razón no se obtuvieron las lecturas de absorbancia en el lector de microplacas, ya que la evaluación visual reveló que no había presencia de actividad antimicrobiana (Tabla 7).

Posteriormente, cuando se obtuvieron los otros cuatro extractos a mediana escala, ninguno de ellos presentó un porcentaje de inhibición alto contra MRSA (Figura 26a), solo uno, el 01004-48-19 a una concentración de 200 µg/mL y longitud de onda de 608 nm, mostró un alto porcentaje de inhibición (del 81.32%) contra MSSA; mientras que el extracto metanólico, 01004-48-20 a 200 µg/mL y 608 nm, tuvo un porcentaje de inhibición parcial del 70.0% contra la misma bacteria patógena (Figura 26b). Los extractos, 01004-48-17 y 01004-48-18, presentaron porcentajes de inhibición menores al 33% a 490 nm y menores al 45% a 608 nm contra MSSA, y contra MRSA salieron con porcentajes menores al 32% a 490 nm y menores de 43% a 608 nm, sin embargo, ambos extractos presentaron cada uno dos evaluaciones donde salieron sin actividad (Tabla 7).

Tabla 7. Absorbancia promedio y porcentaje de inhibición de los extractos crudos de *Nocardioopsis dassonvillei* contra dos cepas patógenas de *S. aureus*.

* No se midió la absorbancia en el lector de microplacas.

** S/A: Sin actividad biológica. El porcentaje de inhibición resultó menor al 0.0%.

Clave extracto	C (µg/mL) extracto	490 nm		608 nm	
		Absorbancia promedio	Inhibición (%)	Absorbancia promedio	Inhibición (%)
Patógeno de prueba: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 resistente a meticilina					
01004-37-32	200	Evaluación visual sin índices de actividad*	S/A**	Evaluación visual sin índices de actividad	S/A
01004-37-40			S/A		S/A
01004-37-36			S/A		S/A
01004-37-44			S/A		S/A
01004-48-17		1.280	31.10	1.280	42.77
01004-48-18		1.890	S/A	1.890	13.89
01004-48-19		2.119	S/A	2.119	3.05
01004-48-20		2.885	S/A	2.885	S/A
01004-37-32	20	Evaluación visual sin índices de actividad	S/A	Evaluación visual sin índices de actividad	S/A
01004-37-40			S/A		S/A
01004-37-36			S/A		S/A
01004-37-44			S/A		S/A

01004-48-17		2.349	S/A	2.349	S/A
01004-48-18		2.180	S/A	2.179	0.24
01004-48-19		1.902	S/A	1.902	13.32
01004-48-20		1.280	31.10	1.280	42.77
Patógeno de prueba: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25913					
01004-37-32	200	1.325	34.66	1.433	50.28
01004-37-40		1.764	11.28	1.869	34.48
01004-37-36		1.396	30.79	1.524	46.98
01004-37-44		3.087	S/A	3.609	S/A
01004-48-17		1.341	35.50	1.780	38.69
01004-48-18		1.548	24.30	2.101	26.94
01004-48-19		0.668	71.91	0.615	81.32
01004-48-20		0.985	54.77	1.162	61.30
01004-37-32	20	1.526	23.94	1.643	42.67
01004-37-40		1.538	23.30	2.175	23.38
01004-37-36		1.956	1.01	2.198	22.55
01004-37-44		1.922	S/A	2.760	2.19
01004-48-17		1.532	25.20	1.896	34.44
01004-48-18		1.390	32.87	1.761	39.40
01004-48-19		1.339	35.60	1.540	47.47
01004-48-20		1.406	32.01	1.862	35.69

7.4.2. Perfiles metabolómicos de los extractos bacterianos de *Nocardiosis dassonvillei* asociado a la esponja *Haliclona (Soestella)*

Los extractos del cultivo en mediana escala de *N. dassonvillei* fueron analizados mediante HPLC a una concentración de 10 mg/mL. Los cromatogramas resultantes con el detector de ELSD se ilustran en la Figura 27. En el extracto 01004-48-19, el cual mostró el mayor porcentaje de inhibición contra MSSA se observan 14 picos (Figura 27a), siendo el prominente el que eluye a un tiempo de

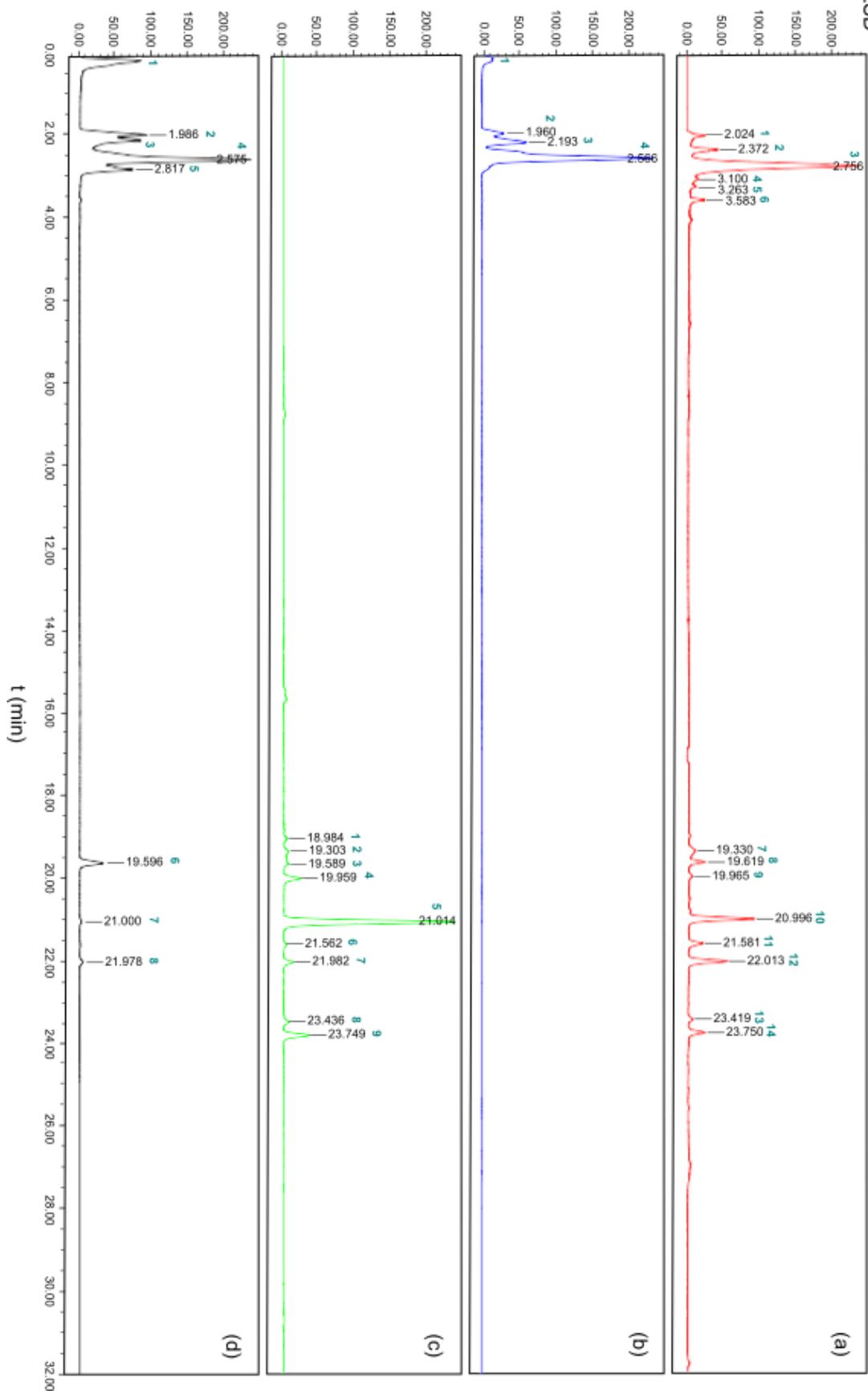
retención de 2.756 min (Tabla 8). En el cromatograma del extracto 01004-48-20, el cual presentó una inhibición parcial media contra MSSA, se observaron 4 picos a tiempos de retención menores (Figura 27b). El pico más prominente de este cromatograma se observa en un tiempo de retención de 2.566 min (Tabla 8). El cromatograma del extracto 01004-48-17 reveló la presencia de 9 picos a tiempos de retención mayores (Figura 27c), siendo el de 21.014 min el más abundante en la muestra. Por último, en el extracto 00104-48-18 se observaron 8 picos (Figura 27d), y de la misma forma que el cromatograma del extracto más activo; se encontraron picos tanto en tiempos de retención bajos como altos. El pico más prominente de este cromatograma se observó a 2.575 min (Tabla 8).

Tabla 8. Tiempos de retención de los picos observados en los cromatogramas obtenidos por HPLC de los extractos a mediana escala.

* S/I: Sin información del tiempo de retención. No se reportó en el software con el que se controló el equipo de HPLC.

Pico	01004-48-19	01004-48-20	01004-48-17	01004-48-18
1	2.024	S/I*	18.984	S/I
2	2.372	1.960	19.303	1.986
3	2.756	2.193	19.589	S/I
4	3.100	2.566	19.959	2.575
5	3.263		21.014	2.817
6	3.583		21.562	19.596
7	19.330		21.982	21.000
8	19.619		23.436	21.978
9	19.965		23.749	
10	20.996			
11	21.581			
12	22.013			
13	23.419			
14	23.750			

ELSD



Columna: LC Kinetex C18 (100 Å, 150 mm, 4.6 mm, 5 µm)
Fase móvil: A: 0.1%v/v ácido fórmico en H₂O
 B: ACN (acetonitrilo)
Gradiente:

Tiempo (min)	0	5	20	25	32
% B	15	15	100	100	15

Flujo: 1.0 mL/min
Detector: ELSD - PDA

Figura 27. Perfil cromatográfico de los extractos crudos a mediana escala de *Nocardioopsis dassonvillei* asociada a *Haliclona (Soestella)*. Cromatograma de (a) 01004-48-19, (b) 01004-48-20, (c) 01004-48-17 y (d) 01004-48-18.

8. Discusión de resultados

8.1. Caracterización fisicoquímica de la cueva anquihalina

La diversidad de especies disminuyó en el interior de la cueva anquihalina, en comparación con la entrada del cenote donde hay ecosistemas de manglares, probablemente por la exposición a un mayor estrés térmico y osmótico (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018), las conexiones al mar y el ecosistema exportador de energía en la entrada son una fuente importante de materia orgánica que permite la existencia de animales invertebrados, como las esponjas, que además cuentan con comunidades microbianas simbióticas.

Las mediciones de conductividad (SPC) tomadas tanto en la zona del espejo como dentro de la cueva, tuvieron valores parecidos a los encontrados en el agua de mar (55,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Fondriest Environmental, Inc., 2014) y se observó que el valor de SPC aumentó con la temperatura, lo cual coincide con los resultados de estudios previos, donde se ha demostrado que la temperatura del agua de mar influye fuertemente en la conductividad de la misma (Zheng *et al.*, 2018). Hacia el interior de la cueva la SPC cambió de 52545 a 53178 $\mu\text{S}/\text{cm}$, la razón de esta diferencia, es decir 53178 dividido entre 52545, es de 1.01, mientras que la temperatura experimentó un cambio de 30.4 en el espejo a 31.0 con una razón de 1.02, lo cual respalda las observaciones previas de Zheng y colaboradores. La conductividad es importante en términos de calidad del agua de mar, la mayoría de los cuerpos de agua mantienen una conductividad constante que se puede usar como referencia para futuras mediciones, un cambio significativo ya sea debido a inundaciones naturales, evaporación o contaminación provocada por el hombre, puede ser muy perjudicial para la calidad del agua (Fondriest Environmental, Inc., 2014).

Contrario a la conductividad, la resistividad es una medida de la oposición del agua al flujo de una corriente eléctrica a lo largo de una distancia, por lo cual, como el contenido de iones en el agua de mar era mayor en el interior de la cueva, se generó una mayor corriente a través de la solución a causa de los iones disueltos que tienen cargas eléctricas (García, s.f.) y, en consecuencia, la oposición del agua a

dicha corriente se vio disminuida, dando como resultado una menor resistividad dentro de la cueva (paso de 17.19 a 16.49 Ωm , con una diferencia de 0.70 Ωm). La conductividad del agua de mar también se ha utilizado para medir y estudiar la salinidad del mar, en general, se acepta que la conductividad del agua de mar es proporcional a la salinidad del agua de mar (Zheng *et al.*, 2018). Se observó que, a medida que aumentaba la SPC, también aumentaba la salinidad, pues la salinidad es la concentración total de todas las sales inorgánicas disueltas en el agua que contribuyen al valor de SPC (Fondriest Environmental, Inc., 2014).

Los valores de pH encontrados en la cueva corresponden a valores del pH del agua de mar, que es aproximadamente de 8.0 (Madigan *et al.*, 2015), y se mantuvo constante a lo largo de toda la columna de agua estudiada. La materia orgánica suspendida se oxida por los microorganismos, aumenta la acidez del agua debido a la producción de CO_2 , el cual forma ácido carbónico que se disocia y disminuye el pH (Ilfie & Kornicker, 2009), por ello el pH es menor en la zona del espejo donde la cantidad de materia orgánica es mayor. Los sólidos disueltos totales (TDS, por sus siglas en inglés) combinan la suma de todas las partículas de iones que tienen menos de 2 micras (0.0002 cm): esto incluye todos los electrolitos disociados que componen las concentraciones de salinidad, y otros compuestos como la materia orgánica disuelta (Fondriest Environmental, Inc., 2014). La concentración de TDS tomada en ambas zonas fue aproximadamente igual a la concentración de sales, por lo que se puede sugerir que el agua de esta cueva está libre de partículas orgánicas disueltas, incluyendo contaminantes, ya que en aguas residuales o áreas contaminadas los TDS pueden incluir solutos orgánicos (como hidrocarburos y urea) además de los iones de sal (Fondriest Environmental, Inc., 2014) los cuales incrementan el valor de TDS.

Los TDS suelen ser bajos para las fuentes de agua libres de contaminación, para agua dulce es de menos de 500 mg/L, mientras que el agua de mar y el agua salobre contienen de 500 a 30,000 y de 30 a 40,000 mg/L de TDS, respectivamente (Moran, 2018). Se ha demostrado que en zonas de agua dulce, las actividades humanas como la agricultura, el uso del agua, los procesos industriales y la minería,

pueden aumentar el nivel de TDS en los cuerpos de agua desde 270 hasta 1170 mg/L, provocando un efecto tóxico en los animales acuáticos como peces, anfibios y macroinvertebrados (Chen *et al.*, 2021). Más aún, en zonas de agua marina contaminadas (e.g. la extracción de petróleo y gas), el valor de los TDS ha logrado alcanzar los 244,000 mg/L (Scanlon *et al.*, 2020). Por otro lado, en un entorno prístino como la “Cuenca de Maliau” en Malasia, el valor de TDS registrado en distintos puntos fluctuó de 20 a 250 mg/L y la conductancia (C, del inglés *Conductance*) entre 28 y 259 $\mu\text{S}/\text{cm}$, siendo las zonas con contenidos de TDS y C más altos las ubicadas cerca de sitios expuestos a actividades antropogénicas (Mokhtar *et al.*, 2009). Se recomienda realizar estudios futuros de esta cueva anquihalina para comparar los valores de C, SPC, salinidad y TDS, y así poder determinar si el área ha sido contaminada con el paso del tiempo.

En 2009, Iliffe & Kornicker, efectuaron un estudio de los perfiles fisicoquímicos en la cueva anquihalina del Cenote 27 escalones, Akumal, México, y determinaron que la temperatura del agua generalmente aumenta con la profundidad (Iliffe & Kornicker, 2009), este hallazgo también se observó en la cueva del presente estudio, ya que la temperatura incremento de 30.4 a 31.0 °C en espejo y cueva, respectivamente, siendo un valor mayor al reportado en otras cuevas anquihalinas que se han estudiado de la Península de Yucatán (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2017; Gómez & Calderón-Gutiérrez, 2020; Suarez-Moo *et al.*, 2022). Este fenómeno de incremento de temperatura asociado con la profundidad ha sido reportado en otras cuevas costeras, donde se sugiere que es debido a la intrusión del mar (Suarez-Moo *et al.*, 2022).

Entre los parámetros fisicoquímicos del sitio de recolección, el contenido de nitratos presentó la variación más notable pasando de 4.30 mg/L en el espejo a 6.34 mg/L en la cueva. Esta fluctuación podría reflejar la influencia de la entrada de agua marina y su efecto en la comunidad microbiana de la esponja, la cual contiene filos que contribuyen en las transformaciones de nitrógeno dentro de *Haliclona sp.* (*Soestella*). El contenido de nitratos, mayormente alto en la cueva, se puede deber a que el agua proviene principalmente del mar y del ecosistema de manglares que se

encuentra en la entrada de la cueva, pues ambos proveen de materia orgánica al ecosistema anquihalino; la posterior degradación de dicha materia orgánica libera sustancias como los nitratos (Suárez-Moo *et al.*, 2022). El agua que llega al interior de la cueva también es filtrada por las esponjas que se encuentran en su interior, por ello y por la presencia de los filos detectados en *Haliclona (Soestella)*, se sugiere que los microorganismos de la esponja podrían estar involucrados en procesos como la nitrificación, e.g., el flujo de nitrógeno más común en esponjas es la producción de NO_2^- y NO_3^- ; se hipotetiza que el NH_3 y NO_2^- se acumulan dentro de la esponja y su posterior conversión a NO_3^- es una solución para eliminar compuestos tóxicos cuando rebasan cierta concentración en el hospedador (Feng & Li, 2019).

Es normal observar que la cantidad de oxígeno disuelto (DO, por sus siglas en inglés) disminuye con la profundidad, esto se debe a que aumenta la distancia lineal con las aguas superficiales donde se efectúa el intercambio de oxígeno con la atmósfera (Illiffe & Kornicker, 2009). El agua en el interior de la cueva resultó ser ligeramente hipóxica en comparación con la zona del espejo, en donde existe una conexión con la atmósfera, los valores más bajos de O_2 disuelto pueden deberse a que el interior sin luz de la cueva no hay producción fotosintética de oxígeno; más aún, las masas de agua estables y estratificadas también restringen la mezcla vertical y el intercambio de oxígeno con las aguas superficiales (Illiffe & Kornicker, 2009). El valor de DO dentro de la cueva se encuentra dentro de los niveles más bajos de hipoxia (Riding *et al.*, 2019), este parámetro influenciado por el nivel de oxígeno atmosférico, la temperatura, la salinidad y las corrientes marinas, es importante en términos de la riqueza de especies en un hábitat, pues se ha observado que la diversidad de esponjas varía directamente con la disponibilidad de oxígeno. Muchas esponjas toleran la hipoxia ($\text{DO} = 2$ a 4 mg/L) y pueden sobrevivir a la anoxia ($\text{DO} < 2$ mg/L), mientras tanto, muchos invertebrados se ven estresados por estas condiciones (Spietz *et al.*, 2015; Riding *et al.*, 2019). El DO encontrado en el espejo y cueva también fue mayor al reportado en otras cuevas costeras y del interior de la Península de Yucatán (Suarez-Moo *et al.*, 2022). La cantidad relativamente alta de DO dentro de la cueva en “Bajo de Judas”, favoreció un ambiente donde destaca la presencia de Porifera, organismos previamente

observados en cuevas como “El Aerolito” y “La Quebrada” (Calderón-Gutiérrez *et al.*, 2018). Dentro de la cueva se observaron cuatro especies distintas de esponjas, de las cuales, la esponja *Haliclona* (*Soestella*) se eligió para este proyecto.

8.1.1. Identificación taxonómica de la esponja colectada

La esponja del presente estudio se identificó como miembro de *Haliclona* (*Soestella*), correspondiendo a sus caracteres morfológicos reportados para el taxón al que pertenece (Weerdt, 2012). La esponja es del orden Haplosclerida, el cual es muy diverso en México y en Quintana Roo (Gestión General de Repositorios Universitarios, UNAM, 2015), por lo que es común encontrar especímenes de este taxón ubicados en las costas de la Península de Yucatán. Este género presenta una forma de crecimiento irregularmente masiva e incrustante: cuando una esponja crece de forma irregularmente masiva puede alcanzar hasta 20 cm de longitud y un espesor de 10 cm, y cuando es incrustante puede introducirse sobre otro cuerpo o superficie sin mezclarse con él (Green, 1976; Weerdt, 2012). La esponja del presente estudio se encontró incrustada en el techo de la cueva y creciendo de manera robusta a su alrededor. Los ósculos no tienen una distribución determinada; generalmente están aislados y distribuidos en el cuerpo (Green, 1976), su consistencia varía de suave a moderadamente firme y la superficie es uniforme o algo irregular con un color que varía de marrón claro a marrón oscuro (Weerdt, 2012).

Chalinidae es la familia más diversa dentro del orden Haplosclerida y la más complicada en la identificación taxonómica debido a la escasez, simplicidad, y alta variabilidad de sus caracteres taxonómicos. *Haliclona* es el género con más especies de esta familia (Bispo *et al.*, 2014), con más de 700 especies incluidas en la Base de datos Mundial de Porifera (<https://www.marinespecies.org/porifera/>), de las cuales 122 corresponden a esponjas del subgénero *Soestella*, (Álvarez *et al.*, 2022). En México existen 9 registros de Chalinidae, (todos ellos del género *Haliclona*), de los cuales 3 se encontraron en Quintana Roo, 2 en Baja California Sur, 2 en Campeche, 1 en Chiapas y 1 en Yucatán. Los únicos dos subgéneros reportados hasta ahora con 3 y 6 especies, respectivamente, han sido siendo *Haliclona* y *Reniera* (Dirección

General de Repositorios Universitarios, UNAM, 2015). Por lo tanto, es la primera vez que se incluiría un registro de una esponja perteneciente al subgénero *Soestella* en México.

El presente estudio pretende evaluar el potencial de los microorganismos asociados a la esponja *Haliclona* aislada de la cueva de Bajo de Judas, QR. como fuente de compuestos bioactivos, ya que, desde 1994, se han aislado y caracterizado hasta 103 metabolitos secundarios tipo alcaloides, los cuales provienen de especies conocidas y desconocidas de *Haliclona* (Zhu *et al.*, 2019).

8.2. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático del microbioma de la esponja *Haliclona* (*Soestella*) se realizó empleando el conjunto de secuencias de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr. Sin embargo, las regiones hipervariables del 16S ARNr exhiben diferentes grados de diversidad de secuencias, y ninguna región hipervariable única es capaz de distinguir entre todas las bacterias (Chakravorty *et al.*, 2007).

8.2.1. Influencia de la región secuenciada en el microbioma

La región V4 es la mejor subregión para el estudio filogenético y taxonómico, particularmente a nivel de filo, y ha sido utilizada en la caracterización del microbioma de diversas esponjas del género *Haliclona* sp. (como *H. oculata*, *H. fulva*, *H. mediterránea*, *H. mucosa*, *H. indisticti*, *etc.*), además de esponjas pertenecientes a *Ircinia* sp. (como *I. strobilina*, la cual se ha reportado repetidamente en México) (Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017). Estas y otras varias cientos de esponjas representativas de la clase Demospongiae se incluyeron en el Proyecto del Microbioma de Esponja que emplea V4. También se ha demostrado, según los resultados del análisis del gen 16S en esponjas del género *Aplysina*, *Halichondria*, *Igernella* y *Tedania*, que usando la región V4 se puede obtener un alto número de géneros revelados por el conjunto de cebadores específicos de la región V4 en la plataforma Illumina MiSeq (Q. Yang *et al.*, 2019).

La elección de esta región específica (V4) para el análisis del gen 16S ARNr se debió al rendimiento superior que ha mostrado en estudios previos del microbioma de esponja, incluso con el conocimiento bien documentado del sesgo significativo por parte de los cebadores tanto en la riqueza como en la uniformidad de la comunidad microbiana cuando se apunta a diferentes regiones (Valenzuela-González *et al.*, 2015; Q. Yang *et al.*, 2019; Bukin *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2020). Otros estudios señalan que las regiones que van de V4 a V6 son las más adecuadas para estudios de ambientes extremos (como el ecosistema anquihalino), con nuevos linajes bacterianos (Yang *et al.*, 2016). Otras clases de regiones como V3 y V7, son las más variables y son diferentes entre órdenes y familias, mientras que V2 y V8, son las más rápidas en evolución y pueden distinguir entre géneros y especies (Bukin *et al.*, 2019).

También es importante mencionar que existen sesgos en las estimaciones cuantitativas de la abundancia entre la comunidad bacteriana y arqueal, los cuales se relacionan con la elección de la región hipervariable dentro del gen 16S ARNr y con la plataforma de secuenciación (Tremblay *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el análisis de V4 para muestras naturales presenta un menor sesgo, debido a que los amplicones V4 mostraron la mayor similitud con los perfiles de la comunidad determinados por la secuenciación en plataforma Illumina MiSeq (Tremblay *et al.*, 2015). Sin embargo, cada muestra es diferente, por lo que es relevante conocer el rango y las limitaciones de los pares de cebadores del gen 16S rRNA para amplificar adecuadamente los microorganismos de interés (Tremblay *et al.*, 2015). Por ello se recomienda, para futuros análisis, emplear una combinación de cebadores que incluyan al menos dos regiones hipervariables que pertenezcan a distintas clases, y así lograr capturar mucho mejor la composición taxonómica de la comunidad microbiana.

8.2.2. Control de calidad y eliminación de ruido de las secuencias

En el control de calidad de las secuencias de 16S ARNr y en el proceso de eliminación del ruido (*Denoising*, en inglés) se empleó Deblur (Bokulich *et al.*, 2013), pues este método utiliza perfiles de error de secuencia para asociar lecturas de

secuencia erróneas con la secuencia biológica real de la que se derivan, lo que dio como resultado ASVs de alta calidad.

Lo anterior se aplicó en dos pasos, en primer lugar, se usó un proceso de filtrado de calidad inicial basado en puntuaciones de calidad: las secuencias se filtraron por su puntaje de calidad, el cual se escogió con valor de $Q = 20$, porque en los sistemas de secuenciación Illumina, las puntuaciones *Quality Score* o niveles de calidad de *Phred* son una propiedad relacionada logarítmicamente con las probabilidades de error de base (Illumina, 2011), por ejemplo, si se asigna una puntuación $Q = 30$ a una base, esto equivale a la probabilidad de 1 base incorrecta en 1000, lo que significa que la precisión de la base es del 99.9% (Ewing & Green, 1998); una precisión de base más baja, como la empleada aquí, del 99% ($Q = 20$) fue suficiente para filtrar las secuencias, pues la probabilidad de una base incorrecta es de 1 en 100. En segundo lugar, se aplicó un filtrado de calidad que truncó las secuencias en la posición 250, pues a un mayor valor de longitud el puntaje de calidad promedio cae por debajo de 20.

8.2.3. Análisis de la curva de rarefacción

Aunque la medida de diversidad alfa normalmente aumenta en función de la profundidad de secuenciación (Hall & Beiko, 2018), la acumulación de características observadas (ASVs) parece estancarse, es decir la curva alcanzó la asíntota, lo que sugiere que se tuvo una suficiente profundidad de muestreo con la que se capturó a la mayoría de los taxa presentes en la comunidad microbiana de *Haliclona* (*Soestella*). Lo anterior propone que si se realiza un esfuerzo de secuenciación adicional quizás no se produzcan cambios en la recuperación de nuevos taxa, (Hall & Beiko, 2018). Para muestrear las variaciones específicas del microbioma se recomienda que en vez de aumentar la profundidad de secuenciación se incremente el número de especímenes de *Haliclona*.

8.2.4. Comparación de la asignación taxonómica del microbioma de *Haliclona* utilizando diferentes bases de referencia

La asignación taxonómica es un componente principal en el análisis de la comunidad microbiana; en consecuencia, la elección de la base de datos del gen 16S ribosomal es importante, ya que puede afectar el análisis posterior y la interpretación de la composición de la comunidad (Park & Won, 2018). La diferencia observada entre los porcentajes de asignación de cada base de datos utilizada para este estudio puede deberse a distintos factores. En primer lugar, SILVA, Greengenes y NCBI emplean diferentes enfoques para obtener una jerarquía taxonómica y la clasificación posterior de las secuencias de genes de ARNr. Por ejemplo, Greengenes proporcionó la taxonomía de bacterias y arqueas basándose en árboles filogenéticos que se construyeron a partir de secuencias 16S ARNr con datos de bases públicas (entre ellas NCBI y RPD) y han pasado un filtrado de calidad (Park & Won, 2018). SILVA también proporcionó una taxonomía para bacterias y arqueas basada en árboles filogenéticos representativos para los genes ARNr de subunidades grandes y pequeñas (Yilmaz *et al.*, 2013), sin embargo, su jerarquía taxonómica y rango se construyeron de acuerdo con los marcos taxonómicos de Bergey, con la Lista de nombres Procarióticos con Posición en la Nomenclatura (LPSN, por sus siglas en inglés) y con una curación manual (Park & Won, 2018).

Por otro lado, NCBI contiene secuencias de muchos organismos cuya taxonomía es seleccionada manualmente en función de la literatura sistemática actual utilizando más de 150 fuentes, así como algunas bases de datos específicas dedicadas a grupos particulares de organismos (Balvočiūtė & Huson, 2017). Con ellas, se asigna la taxonomía realizando un alineamiento con la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés) contra la base de datos mencionada. Por otra parte, Greengenes contiene datos de secuencias que no se han actualizado desde mayo de 2013 (Park & Won, 2018), mientras que la última versión de SILVA se liberó en 2019 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>) y la LPSN, que asigna la taxonomía sistemática en SILVA, se actualizó en 2020 (Parte *et al.*, 2020). Aunque

los archivos de clasificación taxonómica en NCBI se actualizan diariamente; su método de asignación taxonómica basada en alineamientos puede generar errores de divergencia en secuencias que no son 100% idénticas y al final dar una asignación incorrecta. Por esas razones se eligió SILVA como la base de datos principal para evaluar la comunidad microbiana de *Haliclona* (*Soestella*).

8.2.5. Asignación taxonómica del microbioma de *Haliclona* (*Soestella*)

El dominio Bacteria conformó el 83.3% del microbioma asignado y Archaea el 16.7%. Este resultado coincidió con lo reportado en estudios globales del microbioma de esponja (Schmitt *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017), cuyos resultados mostraron que las bacterias constituyen un mayor promedio al de arqueas dentro de la comunidad microbiana. La esponja *Haliclona* (*Soestella*) albergó una comunidad microbiana diversa típica de las bacterioesponjas o esponjas HMA (del inglés *High Microbial Abundance*), las cuales establecen relaciones con consorcios microbianos densos y complejos que pueden constituir hasta un 40% de su biomasa (Schmitt *et al.*, 2011).

La gran diversidad de filos detectados en la esponja de este estudio, indicó que *Haliclona* (*Soestella*) puede ser considerada una bacterioesponja, pues se le asignaron 9 en comparación con esponjas que carecen de densos consorcios microbianos o esponjas LMA (del inglés *Low Microbial Abundance*), como *Polymastia* sp., en la que solo 2 filos fueron detectados (Giles *et al.*, 2012). En general, el patrón de la comunidad bacteriana en las esponjas LMA se caracteriza por una baja diversidad a nivel de filo. Las esponjas LMA muestran a Proteobacteria como el filo más dominante y una ausencia de otros filos típicos de las esponjas HMA (Giles *et al.*, 2012). En la *Haliclona* estudiada, 4 de los filos encontrados (Chloroflexi, Actinobacteria, Proteobacteria y Cyanobacteria), se conocen como filos indicadores de una esponja HMA (Moitinho-Silva *et al.*, 2017): por lo que la presencia de estos taxa sugieren que la esponja estudiada podría pertenecer a la clasificación HMA.

El filo Proteobacteria, tuvo una gran abundancia y diversidad en la esponja *Haliclona* estudiada. Este filo es comúnmente dominante y abundante en el

ambiente marino, ya sea como planctónico o simbiótico (Bibi & Azhar, 2021), de hecho, se ha demostrado que las proteobacterias constituyen una proporción importante de las comunidades microbianas simbióticas asociadas con la esponja *Haliclona* sp., independientemente de su ubicación geográfica (Sipkema *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2013; Jasmin *et al.*, 2015). Miembros del filo Proteobacteria han sido asociados con funciones relacionadas con ciclos biogeoquímicos como producción de enzimas extracelulares, fijación de nitrógeno, y en funciones de manipulación de la reproducción del hospedero, producción de metabolitos secundarios y la defensa química del hospedero (Bibi & Azhar, 2021). Proteobacteria, junto con Actinobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi y Verrucomicrobia, contribuyen en la degradación y asimilación del carbono orgánico, en la nutrición heterótrofa de la esponja y a las transformaciones de nitrógeno, como la fijación, nitrificación, desnitrificación, asimilación de NH_3 y NO_3^- , entre otros, lo cual es de relevancia porque las esponjas producen NH_3 como parte de sus desechos metabólicos (Feng & Li, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Dentro de Proteobacteria, la clase Gammaproteobacteria fue la más abundante, seguida por Alphaproteobacteria. Estos grupos bacterianos han sido reportados como dominantes en el microbioma de esponjas marinas de diferentes hábitats (Bibi & Azhar, 2021), teniendo especies de bacterias oxidantes del azufre (SOB, del inglés *Sulfur Oxidizing Bacteria*), las cuales pueden utilizar el azufre generado por el metabolismo energético de la esponja con el fin de eliminar productos metabólicos que son tóxicos para el hospedero (Jensen *et al.*, 2016).

El género más abundante de la clase Gammaproteobacteria fue *Pseudomonas*, el cual ha sido reportado como uno de los microorganismos principales derivados de esponjas para el cultivo y aislamiento de compuestos bioactivos (Cheng *et al.*, 2020). Las pseudomonas son bacterias Gram-negativas conocidas por su extrema versatilidad y adaptabilidad, están ampliamente distribuidas en el ambiente, incluyendo suelo, agua, y en varios organismos hospederos donde participan en una variedad de interacciones (Ye *et al.*, 2015). Este género bacteriano ya se ha identificado en otros miembros de *Haliclona*, como las

cepas *Pseudomonas fluorescens* H40 y H41 y *P. aeruginosa* H51, aisladas de la esponja *Haliclona* sp. (recolectada en la costa de Río de Janeiro, Brasil), las cuales mostraron una alta actividad antimicrobiana contra bacterias clínicas y marinas como: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a la vancomicina y bacilos gramnegativos multirresistentes (*E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* sp.) (Santos *et al.*, 2010). Actualmente, estas cepas farmacorresistentes se consideran un problema de salud pública, debido a que su resistencia se está propagando rápidamente (Ye *et al.*, 2015). El segundo género más abundante, *Litoricola*, no ha sido ampliamente reportado, pero se sabe que es una bacteria marina quimioheterótrofa Gram-negativa (Choi *et al.*, 2010). *Woeseia* fue el tercer género más abundante y ha sido reportada previamente como presente dentro del microbioma de esponjas (Najafi *et al.*, 2018). Las bacterias del género *Endozoicomonas* de la clase Gammaproteobacteria, también detectadas por 16S ARNr en este estudio, son conocidas como endosimbiontes distribuidos globalmente y se ha encontrado que sus genomas están enriquecidos en genes para el transporte de carbono como azúcar, lo que indica un papel en el ciclo de carbohidratos a su hospedero (Campana *et al.*, 2021). Además, han sido reportadas en asociaciones con miembros de *Haliclona* sp. desempeñando un papel importante en la adquisición y suministro de nutrientes, en la estructuración del microbioma hospedero y en el estado de salud del holobionte (Bartz *et al.*, 2018). Se encontró información muy limitada respecto a este taxón, pero se ha reportado que *Endozoicomonas* identificada de *M. oxymycale* posee actividades antimicrobianas (Ruocco *et al.*, 2021).

En la clase Alphaproteobacteria se identificó el orden Rhodobacterales como el más abundante, y con un único género, *Ruegeria*, el cual fue el quinto con mayor abundancia. Este género de bacterias Gram-negativas ha sido aislado con alta frecuencia, sin importar el método de cultivo utilizado (Dat *et al.*, 2021). Se han descubierto metabolitos bioactivos potenciales a partir de los extractos de *Ruegeria* sp. asociados a esponjas, los cuales exhibieron actividad antimicrobiana moderada contra bacterias y hongos patógenos (Mitova *et al.*, 2004; Bibi *et al.*, 2020).

Crenarchaeota, perteneciente a Archaea, es actualmente conocido como Thaumarchaeota (F. Zhang *et al.*, 2014), fue el segundo filo más abundante en el microbioma de *Haliclona*. Este filo se ha detectado en esponjas ubicadas en diferentes océanos (Zhang *et al.*, 2014; Pallela & Ehrlich, 2016; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017), aunque la composición y estructura de la comunidad de arqueas varía dependiendo de la especie esponja. Los simbioses del dominio Archaea en esponjas, han sido descritos como arqueas oxidantes de amoníaco (AOA del inglés *Ammonia Oxidizing Archaea*) (F. Zhang *et al.*, 2014), por lo que pueden estar desempeñando un papel clave en la desintoxicación de amonio para *Haliclona* (*Soestella*) y afectar significativamente el ciclo de nitrógeno del ecosistema en el que ambos se encuentran. Los miembros de este filo también pueden fijar CO₂ utilizando energía obtenida de la oxidación del amoníaco (F. Zhang *et al.*, 2014). El único género que se asoció a este filo fue *Candidatus Nitrosopumilus*, el cual fue dominante, y coincide con el estudio llevado a cabo por Turon & Uriz (2020), donde el análisis de 68 muestras pertenecientes a 19 especies de esponjas reveló que *Ca. Nitrosopumilus* era el taxón más abundante en la mayoría de las especies del estudio, en particular fue abundante en *Haliclona* sp., donde representó más del 50% de la abundancia relativa de arqueas. En otro estudio, efectuado por Steinert *et al.* (2020), donde se analizó la abundancia relativa de taxones bacterianos y arqueales de 13 esponjas marinas, se encontró que las esponjas de la clase Demospongiae estaban dominadas por miembros de la familia Nitrosopumilaceae, principalmente por *Ca. Nitrosopumilus*.

A diferencia de las bacterias, el dominio de las arqueas no suele explorarse a profundidad en el análisis de las comunidades microbianas asociadas a esponjas y, en consecuencia, los cebadores establecidos (515F/806R) que amplificaron la región V4 del gen 16S ARNr están principalmente dirigidos a las secuencias bacterianas y no a las de arqueas. En general son escasos los cebadores arqueales en comparación con la variedad de cebadores que se dirigen a las secuencias bacterianas (Fischer *et al.*, 2016). Además, en la actualidad no existe información disponible sobre bioactividades *in vitro* de cultivos de arqueas y sus extractos, ni compuestos bioactivos identificados de arqueas asociadas a esponjas, quizás debido

a la dificultad que se requiere para cultivarlas (Hardoim & Costa, 2014). Por ello, todavía es necesario determinar qué otros taxa arqueales se encuentran presentes en *Haliclona (Soestella)* empleando los pares de cebadores seleccionados diseñados para el dominio arqueal (Fischer *et al.*, 2016), así como hallar métodos para que sea posible cultivarlos y explorar su bioactividad (Hardoim & Costa, 2014).

El tercer filo más abundante fue Campylobacterota, dentro de este taxón se detectó el género *Sulfurospirillum*, el de mayor abundancia dentro de todo el microbioma de *Haliclona (Soestella)* sp. Este género consta de bacterias versátiles, a menudo microaerófilas, que crecen con muchos sustratos diferentes y se encuentran principalmente en sedimentos, agua subterránea, suelo, o en hábitats ricos en compuestos de azufre (Goris & Diekert, 2016). *Sulfurospirillum* se ha descrito en otras esponjas como una bacteria reductora de azufre (SRB del inglés *Sulfur-Reducing Bacteria*) (Cain, 2020). Se ha determinado que varias especies de esponjas, entre ellas *Haliclona (Gellius)*, tienen simbioses que contienen genes involucrados en el ciclo del azufre (Jensen *et al.*, 2016; Cain, 2020). Los pocos estudios referentes a hábitats marinos en los que se ha encontrado este género, llegaron a la conclusión de que *Sulfurospirillum* sp. también se encuentra en sedimentos marinos superficiales, hábitats de aguas profundas o en relación simbiótica con gusanos tubícolas (Goris & Diekert, 2016). Un segundo género que se asignó a este filo, pero con una abundancia relativa baja fue *Sulfurovum*, el cual es está descrito como bacterias oxidantes del azufre (SOB), en general ha sido identificado en cuevas, fuentes hidrotermales y regiones volcánicas (Marziah *et al.*, 2016). Dada la importancia de los microorganismos SOB encontrados en esta esponja, se sugiere que en estudios futuros sobre el microbioma de *Haliclona* se contemplen las interacciones que puedan tener estos microorganismos con la esponja y el ambiente, tomando en cuenta una mayor información ambiental como azufre y fósforo que no fueron colectados en el muestreo del presente estudio).

El filo Bacteroidetes, al igual que Proteobacteria, fue de los que tuvo más órdenes identificados, y resultó en cuarto lugar de abundancia dentro del microbioma asignado con SILVA 138. En general, este filo se ha encontrado repetidamente en

esponjas alrededor de todo el mundo (Schmitt *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017). La familia con mayor abundancia en el microbioma de *Haliclona sp.* dentro de este filo fue Flavobacteriaceae. Los aspectos prácticos y las aplicaciones reportadas para los miembros de esta familia están relacionados con sus hábitats y en el caso del microbioma de *Haliclona sp.* podrían estar relacionados con el funcionamiento geoquímico de la esponja. Algunos de estos aspectos reportados incluyen, la síntesis de varias enzimas potencialmente útiles en la industria o la medicina, renovación de materia orgánica en suelo, agua y plantas de tratamiento de aguas residuales; descomposición de pesticidas e insecticidas (Bernardet & Nakagawa, 2006). El género más abundante dentro de Flavobacteriaceae fue *Ulvibacter*, dicho taxón ha sido detectado en esponjas como *Haliclona pilosus* y *Haliclona (Rhizoniera) sp.*, en alta abundancia (Ruocco *et al.*, 2021). Sin embargo, no existen reportes sobre la actividad metabólica que pueden tener otros géneros encontrados dentro del filo Bacteroidetes como *Ulvibacter*, *Arenibacter*, *Polaribacter*, *Aquibacter* y *Ca. Aquirestis*.

En el quinto filo más abundante, Desulfobacterota, se pudo identificar al género *Desulfovibrio*, que fue el segundo más abundante en todo el microbioma después de *Sulfurospirillum*. Este género es ampliamente reconocido como parte de las bacterias marinas reductoras de sulfato (SRB) asociadas a esponja s(D. Zhang *et al.*, 2015). La reducción del sulfato es el proceso de aceptación de electrones más importante para la descomposición de la materia orgánica, debido a que libera nutrientes que puede aprovechar la esponja para su crecimiento (D. Zhang *et al.*, 2015) lo cual sugiere que la presencia en gran abundancia de *Desulfovibrio* está asociada a una función biogeoquímica importante dentro del microbioma de *Haliclona (Soestella)*. A pesar de que existen varios estudios de la presencia y cultivo de *Desulfovibrio* (Lavy *et al.*, 2013; Dat *et al.*, 2021), no hay estudios de acerca de su capacidad de producción de metabolitos secundarios, aunque sí acerca de su carácter patógeno oportunista en humanos y animales debido a las endotoxinas que componen su membrana externa (Wolny *et al.*, 2010).

El filo Actinobacteria se ha detectado repetidamente en esponjas de todo el mundo (Schmitt *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017). Se piensa que Actinobacteria participa activamente en el ciclo de carbono y nitrógeno de su holobionte, ya que, en otras esponjas, se han encontrado ciertos genes asignados a miembros de este filo implicados en la degradación y asimilación del carbono, así como genes capaces de realizar la conversión de nitrógeno orgánico disuelto a amoníaco (NH_3) inorgánico (Feng & Li, 2019), que, como se mencionó anteriormente, de suma importancia porque la esponja produce NH_3 como parte de sus desechos metabólicos. También se ha descrito el papel de las actinobacterias en la transformación de NO_3^- a N_2 , mediante el proceso de desnitrificación (Feng & Li, 2019). Pese a que en este estudio, Actinobacteria solo se detectó hasta el nivel orden con un solo taxón, los 18 ASVs sin asignación de género podrían incluir nuevas bacterias cultivables capaces de producir nuevos compuestos bioactivos. Algunos géneros dentro de este filo, comúnmente reportados como productores de metabolitos secundarios bioactivos pertenecen a *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Salinispora* y *Nocardiopsis* (Jiang *et al.*, 2007; Dat *et al.*, 2021), todos ellos han sido aislados de una amplia variedad de esponjas, entre ellas las que pertenecen al género *Haliclona* sp. (Jiang *et al.*, 2007).

Los 3 filos con menor abundancia encontrados en *Haliclona* (*Soestella*) fueron Cyanobacteria, Verrucomicrobia y Chloroflexi, los cuales tuvieron una asignación en cada nivel taxonómico hasta llegar a los géneros *Synechococcus*, *Lentisphaera* y *Leptolinea*, respectivamente. Pese a que se encontraron con baja abundancia relativa, estos filos han sido reportados como bacterias simbióticas dominantes en el microbioma de distintas especies de las esponjas marinas (Schmitt *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017). Estos filos son conocidos por producir metabolitos secundarios bioactivos como policétidos, alcaloides, ácidos grasos, péptidos y terpenos en esponjas marinas (Pallela & Ehrlich, 2016), y en cuanto a su relación simbiótica con estos invertebrados, se cree que mejoran significativamente su potencial de crecimiento, ya que se han encontrado genes de fijación de nitrógeno que pertenecen a los filos Cyanobacteria y Verrucomicrobia (Feng & Li, 2019). La fijación de nitrógeno requiere condiciones anaeróbicas, por lo

cual debe ocurrir en regiones anóxicas dentro a la esponja o en compartimientos anaeróbicos dentro de las bacterias, y las cianobacterias cuentan con dichos compartimientos que limitan la difusión de O₂ (Zhang *et al.*, 2019). *Synechococcus* se ha reportado previamente en esponjas de distintos géneros, entre ellos *Haliclona* (Usher *et al.*, 2004; Konstantinou *et al.*, 2018). Se ha reportado la producción de metabolitos en cepas de *Synechococcus* asociadas a esponjas y se encontró que estas presentan actividad principalmente contra *Staphylococcus aureus* (Konstantinou *et al.*, 2020) sin embargo, los datos sobre la producción de compuestos naturales a partir de *Synechococcus* sp., y cianobacterias asociadas a esponjas en general, son escasos. Las bacterias del filo Verrucomicrobia se encuentran en ambientes marinos como organismos de vida libre o como simbioses de hospederos eucariotas, y, se ha encontrado frecuentemente relacionado con esponjas (Sizikov *et al.*, 2020). Por último, los miembros de Chloroflexi son de particular interés porque son representativos del microbioma en esponjas HMA, en particular la clase Anaerolineae (Bayer *et al.*, 2018) que se alcanzó a detectar en la esponja de estudio. En los miembros de este filo se han encontrado genes implicados en la degradación y asimilación del carbono orgánico en esponjas (Feng & Li, 2019), por lo que, los simbioses Chloroflexi podrían estar implicados la degradación de la materia orgánica disuelta (DOM, por sus siglas en inglés) en *Haliclona* (*Soestella*), ya que se sabe que las esponjas se alimentan de DOM (Bayer *et al.*, 2018).

La comparación entre los resultados obtenidos en el presente estudio con los resultados obtenidos en otros tres estudios previos (Schmitt *et al.*, 2011, Thomas *et al.*, 2016 y Moitinho-Silva *et al.*, 2017), reveló que existen algunos taxa que todos comparten, lo que puede usarse para evaluar la existencia de un microbioma central entre esponjas de la misma o de distintas especies, entre diferentes ubicaciones geográficas, ambientes y tiempos. El término "microbioma central" se ha utilizado ampliamente en la ecología microbiana para referirse a cualquier conjunto de taxones microbianos que son compartidos entre dos o más muestras de un huésped o entorno de interés (Neu *et al.*, 2021). Para nuestro caso, el microbioma central de esponja observado en las cuatro taxonomías de los diferentes estudios, fue

conformado por 5 filos (Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria y Bacteroidetes) y 2 clases (Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria). Es posible que la existencia del microbioma central de esponja esté influenciado, principalmente, por la evolución del microbioma dentro de su huésped (Lurgi *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha proporcionado evidencia de que, además del tipo de esponja (es decir, HMA o LMA), porque las esponjas HMA generalmente comparten una gran fracción de microbios con otras esponjas dentro de su microbioma central, también las interacciones bióticas con el ambiente impulsan el ensamblaje de microorganismos centrales más íntimamente asociados a las esponjas (Lurgi *et al.*, 2019). Lo anterior podría explicar la presencia de las 8 clases que solo se detectaron en la esponja de este estudio, debido a la influencia del ambiente anquihalino, el cuál es distinto a los tipos de ambientes que se estudiaron en los otros 3 estudios con los que se comparó el microbioma de las esponjas.

8.2.5.1. Influencia del ambiente anquihalino en la comunidad microbiana de *Haliclona (Soestella)*

A los microorganismos los afecta notablemente el estado químico y físico del ambiente. Hay cuatro factores principales que controlan su crecimiento: temperatura, pH, disponibilidad de agua y oxígeno (Madigan *et al.*, 2015). La temperatura que se detectó en la cueva anquihalina oscila entre 30 - 31 °C, por lo que se podría proponer que las comunidades microbianas asociadas a *Haliclona (Soestella)* son bacterias mesófilas como *Sulfurospirillum*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Endozoicomonas*, entre otras, de los géneros detectados en este estudio, los cuales han sido reportados en distintos ambientes, en animales de sangre caliente, y en ambientes acuáticos y terrestres de las latitudes templadas y tropicales. Dentro de los filos Proteobacteria, Campylobacterota, Desulfobacterota, Actinobacteria y Cyanobacteria existen especies bacterianas que han podido ser aisladas teniendo una temperatura de crecimiento que va desde 8 hasta 48 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento a 39 °C (Madigan *et al.*, 2015), por lo que el espejo y la cueva son lugares en los que podrían desarrollarse.

Al igual que con la temperatura, cada microorganismo tiene un valor óptimo de pH para su crecimiento, en la mayoría de los ambientes naturales, el pH puede estar entre 3 y 9 (Madigan *et al.*, 2015), para el caso de la cueva el pH fue de 8.22, valor ligeramente mayor al del agua de mar (8.0) (Madigan *et al.*, 2015). Esto último quizás puede explicarse por el origen de la cueva en Xcalak, ya que los procesos kársticos que tuvieron sitio en ella (Gerovasileiou & Voultziadou, 2012) facilita la presencia de suelos carbonatados que aumentan el pH dentro de este tipo de ecosistemas. Los géneros microbianos identificados con SILVA 138, presentan un pH óptimo de crecimiento entre 6-8 (Madigan *et al.*, 2015), en este rango proliferan los microorganismos principalmente alcalófilos y neutrófilos. Los géneros más abundantes de todo el microbioma en *Haliclona (Soestella)*, *Sulfurospirillum* y *Desulfovibrio*, son alcalófilos, pues presentan un pH óptimo de crecimiento entre 7 y 8 (Stolz *et al.*, 1999; Kushkevych *et al.*, 2019), por lo que el pH alcalino de la cueva puede ser uno de los factores abióticos que influye en sus altas abundancias.

La disponibilidad de agua también es un factor importante para el crecimiento de comunidades microbianas dentro de sus holobiontes, depende de la humedad del ambiente y es función de la concentración de solutos disueltos en el agua de la cueva, los microorganismos que viven en este tipo de ambientes pueden ser tanto halotolerantes como halófilos, los primeros crecen con NaCl entre 1 - 4%, aunque pueden tolerar cierta concentración de sal, crecen mejor en ausencia de ella, mientras que los segundos, crecen mejor en ambientes con 3 - 12% de NaCl (Madigan *et al.*, 2015). En la cueva anquihalina se registró una cantidad de sal de 34.55 ppt (que equivale a 3.46%), este valor incluye todas las sales disueltas en el agua (como NaCl), por lo que se sugiere que el microbioma de la esponja *Haliclona (Soestella)*, está conformado por microorganismos halotolerantes y halófilos, ya que es salino. Cabe mencionar, que la mayoría de la microbiota aislada de *Haliclona (Soestella)* creció bien a valores de salinidad del mar (alrededor del 3.5%).

El oxígeno que se consume en las aguas al interior de la cueva se renueva del aire en la superficie, por una afluencia de agua en la superficie, o por mezcla o difusión desde el mar abierto en capas más profundas (Sket, 2019). Por esa razón, la

capa superficial (zona del espejo) presenta mayores niveles de oxigenación ($DO_{\text{Espejo}} = 4.24 \text{ mg/L}$), mientras que para el interior de la cueva, observamos un decremento en el oxígeno ($DO_{\text{Cueva}} = 3.77 \text{ mg/L}$). Es probable que el DO desempeñe un papel importante en la configuración de la composición de la comunidad bacteriana en *Haliclona* (*Soestella*). Bacteria y Archaea pueden desarrollarse en aguas hipóxicas ($DO = 2.0 - 4.0 \text{ mg/L}$) mientras realizan funciones relevantes en la mineralización de la materia orgánica y otros ciclos biogeoquímicos (Spietz *et al.*, 2015). Los microorganismos detectados en este proyecto son capaces de crecer tanto en condiciones con mucha disponibilidad de DO como en condiciones hipóxicas, por ello se clasifican en su mayoría como aerobios facultativos, microaerófilos y anaerobios aerotolerantes (Madigan *et al.*, 2015). Pese a que la concentración de DO en el agua del océano suele oscilar entre 7 y 8 mg/L (VIMS, 2022), la concentración de DO en la cueva (3.77 mg/L) es más que suficiente para soportar a diversas bacterias con formas de vida aeróbicas.

8.3. Cultivo a mediana escala de *Nocardiopsis dassonvillei*

8.3.1. Aislamiento y siembra de los microorganismos cultivables de esponja

Se sabe que la mayoría de las bacterias cultivadas de esponjas provienen de Actinobacteria, taxón del cual se han aislado alrededor de 7,000 compuestos con actividad antimicrobiana, antitumoral y anticancerígena (Fuerst, 2014; Pallela & Ehrlich, 2016), especialmente, de los miembros que pertenecen a *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Verrucosispora*, *Salinispora* y *Nocardiopsis* (Jiang *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2020; Dat *et al.*, 2021). Por lo tanto, las investigaciones realizadas en el Laboratorio 125 de Productos Naturales en la Facultad de Química, UNAM (bajo la supervisión del Dr. Mario Figueroa y la ayuda del I.Q.I. Daniel Hernández), sobre el cultivo de bacterias asociadas a la esponja de estudio y la obtención de extractos crudos, emplearon medios de cultivo aerobios y ricos en nutrientes, dirigidos específicamente a los actinomicetos, para el descubrimiento de fármacos (Lavy *et al.*, 2013). Este estudio demuestra que existe una fracción cultivable de bacterias de la esponja *Haliclona* (*Soestella*) es diversa, ya que se lograron aislar 13 cepas

bacterianas y que la cepa NCA-454 tiene potencial como fuente de agentes antimicrobianos médicamente relevantes.

8.3.2. Identificación de la cepa bacteriana NCA-454

La técnica de electroforesis en gel de agarosa es muy usada para determinar la presencia de ADN_g y para determinar si los fragmentos de ADN_g amplificados por PCR tienen el tamaño adecuado antes de ser secuenciados (Madigan *et al.*, 2015). Con base en el par de cebadores empleados (27F/1492R) para la amplificación del gen 16S ARNr de la cepa bacteriana NCA-454, se esperaban fragmentos de aproximadamente 1465 pb, y con el gel se corroboró el tamaño de los amplicones, pues están a la altura de 1500 pb como lo indica el ADN marcador. Debido a que en el proceso de secuenciación se empleó otro par de cebadores (357F/1492R), no es de extrañar que el tamaño de la secuencia resultante fuese menor (1064 pb) que el tamaño del amplicón que se tenía. Las bandas del amplicón que son de menor peso molecular que el ADN_g extraído, se observan más abajo en el gel debido a que su menor tamaño les permitió migrar más rápidamente a través del gel, del ánodo hacia el cátodo, esto sucedió porque los grupos fosfato del ADN tienen cargas negativas que fueron atraídas por el electrodo positivo (Skoog *et al.*, 2008).

El amplicón obtenido fue secuenciado y su identificación utilizando *nucleotide* BLAST+ 2.13.0 con valores de porcentaje de identidad de 99%, cobertura de 98% y un e-value (0.0) cerca de cero, indica que la cepa NCA-454 tiene una secuencia de 16S ARNr similar a una cepa identificada como *Nocardiosis dassonvillei*, la cual se ha reportado como una especie bacteriana Gram-positiva de la clase *Actinomycetia* mesófila y aerobia, halotolerante, que presenta micelio, aislada a partir de una gran variedad de hábitats naturales, como suelo y sedimentos marinos, de diferentes materiales vegetales y animales, así como de pacientes humanos (Sun *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2018). Los resultados del análisis bioinformático para conocer el microbioma de la esponja *Haliclona (Soestella)* incluyen el filo *Actinobacteria*, sin embargo, no se alcanzó a detectar la presencia de la clase *Actinomycetia* ni del género *Nocardiosis*. La experiencia en el campo microbiológico muestra que aquellas bacterias que se cultivan fácilmente no son las que abundan en las bases

de datos de secuencias 16S (Dat *et al.*, 2021), por lo que es normal aislar bacterias que no se hayan detectado en el análisis del microbioma de *Haliclona (Sostella)* en este estudio.

8.3.3. Extractos obtenidos de la cepa bacteriana *Nocardiopsis dassonvillei*

Los extractos de *N. dassonvillei* se obtuvieron con el propósito de detectar actividad antimicrobiana, pues ya se ha demostrado que los extractos crudos de esponja presentan actividad antibacteriana en ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano o la muerte celular (Kelly *et al.*, 2003). Los extractos metanólicos tuvieron un mayor rendimiento que los obtenidos usando acetato de etilo (AcOEt) como disolvente. Esto se puede explicar por la diferencia de polaridad que existe entre ambos disolventes, la cual depende de la constante dieléctrica o del momento dipolar de la sustancia: a mayor momento dipolar mayor polaridad (Klein, 2021). El metanol (MeOH) presenta un momento dipolar más grande que el AcOEt, por ello, es capaz de extraer muchas de las sustancias producidas por las bacterias, debido a su alta polaridad (Klein, 2021).

Se sabe que los metabolitos secundarios son moléculas que frecuentemente contienen grupos funcionales con alta polaridad (Santhanam *et al.*, 2018), como alcoholes (-OH), carbonilos (C=O), aminas (-NRH), entre otros, los pares de electrones libres de estos grupos interactúan formando más puentes de hidrógeno con el grupo hidróxilo del metanol que con el grupo éster del acetato de etilo. La presencia de los grupos alquilo unidos al carbonilo y al oxígeno en el acetato de etilo disminuyen la capacidad de interacción con los pares de electrones libres para formar puentes de hidrógeno (Klein, 2021). Por lo tanto, la polaridad del AcOEt y su capacidad de solvatar a otras moléculas para así poder disolverlas y con ello extraerlas, son menores que las del MeOH (Klein, 2021). Como consecuencia de estas interacciones intermoleculares, las masas de los extractos metanólicos tienden a ser mayores. No obstante, eso no significa que en los extractos donde se usó AcOEt no haya presencia de metabolitos secundarios interesantes, de hecho, se han reportado extractos crudos bioactivos empleando ambos disolventes de extracción (Gunathilake *et al.*, 2020; Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021). Más aún, el extracto

crudo que presentó el porcentaje de inhibición más alto en este estudio (01004-48-19), proviene de la fase extraída usando acetato de etilo como disolvente.

8.4. Prueba de actividad metabólica MTT y caracterización por HPLC

8.4.1. Ensayo de actividad metabólica: prueba del MTT

Las estimaciones básicas de bioactividad en extractos crudos son técnicas basadas en la reducción de MTT en microplacas de 96 pozos, para la determinación de bacterias multirresistentes, evaluación de la formación de biopelículas o incluso, como se aplicó en este estudio, para la cuantificación indirecta de compuestos antibacterianos (Grela *et al.*, 2018). Este ensayo colorimétrico presentó varias ventajas por ser de fácil aplicación y por ser eficaz en obtener resultados precisos y confiables de los ensayos que miden la viabilidad celular de las células de dos cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* para reducir compuestos como el bromuro de MTT. Con ello se logró evaluar la capacidad de los extractos crudos obtenidos de *Nocardiosis dassonvillei* para inhibir la actividad metabólica de la bacteria patógena.

S. aureus es una bacteria Gram-positiva de suma importancia debido a que está clasificada como patógeno ESKAPE (acrónimo que comprende seis patógenos bacterianos altamente virulentos y resistentes a los antibióticos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), por lo que es considerada como patógeno de prioridad crítica número uno por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el cual se requieren urgentemente nuevas terapias (Aslam *et al.*, 2018). Además, con la actual pandemia por SARS-CoV-2, el uso indiscriminado de los antibióticos en el 70-95% de los casos de coronavirus combinado con la farmacorresistencia generalizada de patógenos como *S. aureus*, contribuyó a las complicaciones asociadas con el COVID-19 (Rivera-Chávez *et al.*, 2022).

Las actividades antibacterianas de los extractos crudos obtenidos en este estudio proporcionan evidencia de que las bacterias aisladas de *Haliclona*

(*Soestella*), como *Nocardiopsis dassonvillei*, podrían tener potencial para superar a las bacterias patógenas, por lo que esto requiere su posterior estudio en el descubrimiento de fármacos. Cabe destacar que cerca del sitio de colecta de la muestra de *Haliclona (Soestella)* en Xcalak, Q. Roo (Figura 10), hay un registro sobre otra esponja encontrada en Boca Bacalar Chico, Othón P. Blanco, la esponja *Haliclona (Reniera) implexiformis*, de la cual existe una investigación sobre el aislamiento y caracterización de las lectinas, metabolitos secundarios con potencial antibacteriano para inhibir células viables de *Staphylococcus aureus* (Andrade, 2022).

Los actinomicetos son una fuente relevante de nuevos compuestos bioactivos, y uno de los géneros farmacéutica y biotecnológicamente valiosos que atraen la investigación de productos naturales es el género *Nocardiopsis*, principalmente por su capacidad para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios que explican su amplia gama de actividades biológicas (Ibrahim *et al.*, 2018). Además, *N. dassonvillei* ha sido reconocido como uno de los géneros más abundantes de Actinobacteria que se han aislado y cultivado de esponjas (Dat *et al.*, 2021). Según la revisión de Ibrahim *et al.* (2018), desde enero de 2015 hasta febrero de 2018 los metabolitos secundarios que fueron aislados del género *Nocardiopsis* fueron principalmente policétidos, péptidos cíclicos, macrólidos, dicetopiperazinas, α -pironas, γ -pironas, alcaloides, naftoquinonas, fenazinas y derivados de fenoxazina, que son responsables de un amplio espectro de efectos farmacológicos y biológicos, principalmente como antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antitumoral y citotóxico.

Ya se ha realizado investigación previa sobre los extractos bioactivos del género *Nocardiopsis*, del cual se aisló la 1,6-dihidroxifenazina que fue activa contra *Bacillus* sp. (Dashti *et al.*, 2014). Los extractos de la cepa *Nocardiopsis* sp. HR-4 halotolerante que se obtuvo de la isla de Jeung-do en Corea, a partir de muestras de suelo salino hipersalino, mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *E. faecalis* y *M. luteus*, así como propiedades antifúngicas contra *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Ibrahim *et al.*, 2018). Por otro lado, la investigación química de la cepa

Nocardiosis sp. CNQ115 obtenida de sedimentos marinos recolectados en las costas del sur de California condujo al aislamiento de los nocarimidazoles A y B como dos nuevos alcaloides: el nocarimidazol A mostró actividades antibacterianas débiles contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*, con valores de MIC de 64 µg/mL (Ibrahim *et al.*, 2018). Algunos de los compuestos que se han aislado de las cepas *Nocardiosis* sp. LS150010, *Nocardiosis* sp. NHF48 y *Nocardiosis* sp. CNQ-115, han exhibido actividad antibacteriana significativa contra MRSA con valores de MIC de 6.25, 12.5 y 32.0 µg/mL (Ibrahim *et al.*, 2018). Mientras que en este estudio el extracto crudo 01004-48-19 mostró actividad antibacteriana moderadamente fuerte contra MSSA a una concentración de 200 µg/mL.

También se han encontrado investigaciones de *N. dassonvillei* y su asociación con las esponjas marinas para producir metabolitos secundarios bioactivos. Lo cual es de gran relevancia porque indica que la bacteria aislada en el presente estudio puede tener un gran potencial biotecnológico, sobre todo en la producción de antimicrobianos. Por ejemplo, en 2009, Selvin *et al.*, lograron aislar 11 actinomicetos de la esponja marina *Dendrilla nigra* recolectada en la costa suroeste de la India. Entre estos actinomicetos, los extractos y fracciones de *Nocardiosis dassonvillei* MAD08 mostraron una actividad del 100% contra patógenos Gram-positivos y Gram-negativos resistentes a múltiples fármacos probados como: *Staphylococcus aureus* MTCC 2940 y *Pseudomonas aeruginosa* PC3.

En otro estudio, X. Zhang *et al.* (2021) lograron aislar y caracterizar las estructuras químicas de las dassonmicinas A y B, a partir de la cepa *Nocardiosis dassonvillei* SCSIO 40065 asociada con la esponja marina *Petrosia* sp. Las actividades antibacterianas de las dassonmicinas se evaluaron mediante el método de microdilución en CMH frente a 10 cepas patógenas, y ambas moléculas mostraron actividades antibacterianas contra *B. subtilis* 1064, *M. luteus* SCSIO ML01, *S. aureus* ATCC 29213 y MRSA con valores de MIC que oscilan entre 8 y 64 µg/mL, también encontraron que las dassonmicinas A y B exhibieron citotoxicidades moderadas contra cuatro líneas celulares de cáncer humano (X. Zhang *et al.*, 2021).

8.4.2. Perfiles metabolómicos de los extractos bacterianos de *Nocardiosis dassonvillei* asociado a la esponja *Haliclona (Soestella)*

El método de HPLC en fase reversa se empleó porque ha demostrado ser la técnica analítica más útil para el análisis y la caracterización química de antibióticos (Skoog *et al.*, 2008). Se calcula que tal vez más de las tres cuartas partes de todas las separaciones mediante HPLC se llevan a cabo en columnas con rellenos de fase inversa, por su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, por su amplia aplicabilidad a sustancias que son de interés farmacológico (Skoog *et al.*, 2008).

El método de este estudio usó una fase estacionaria que tiene un revestimiento enlazado de carácter no polar (columna C18, n-octildecilo) y una fase móvil polar: el agua tiene un índice de polaridad de 10.2, mientras que el acetonitrilo de 5.8 y son miscibles entre sí (Skoog *et al.*, 2008), por lo que, las sustancias químicas que se separaron de los extractos crudos, salieron en orden de las más polares a las menos polares, conforme avanzó el tiempo en el eje de las abscisas. Esto sucedió porque los compuestos de los extractos emigraron de acuerdo con las interacciones intermoleculares con la columna; los compuestos más polares presentaron menores tiempos de retención porque la fase móvil los eluyó primero, mientras que las menos polares se retuvieron más tiempo en la columna.

No se conoce por completo el mecanismo por el cual esta superficie retiene moléculas, al parecer es bastante complejo (Skoog *et al.*, 2008). Se sabe que hay una fuerte atracción entre el eluyente polar y las moléculas polares en la mezcla que pasa a través de la columna, pero no hay mucha atracción entre las cadenas de hidrocarburo adheridas a la sílice (la fase estacionaria) y las moléculas polares en la fase móvil, por lo tanto, las moléculas polares de la mezcla pasan la mayor parte de su tiempo moviéndose con el eluyente, mientras que los compuestos no polares en la mezcla tienden a formar atracciones con los grupos de hidrocarburos debido a las fuerzas de dispersión de Van der Waals (Sarker & Nahar, 2015).

Luego de pasar a través de la columna en el equipo de HPLC, las muestras pasaron al detector de dispersión de luz (ELSD). En este detector, los eluyentes junto con el extracto que provenían de la columna, pasaron a un nebulizador donde se transformaron en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno o aire, después, dicha niebla pasó por un tubo a temperatura controlada donde tuvo lugar la evaporación de la fase móvil (eluyentes), lo que originó partículas finas del analito (sustancias de los extractos), las cuales pasaron a través de un haz de láser, y finalmente, la radiación dispersada por estas partículas se midió con un detector de arreglo de fotodiodos para generar la señal en el cromatograma (Skoog *et al.*, 2008). Esto indica que, mientras mayor fue el número de partículas (de un determinado analito contenido en el extracto) que pasaron por el detector, mayor resultó la señal del pico respecto al eje de las ordenadas. Además, el área que se forma bajo la curva de un cierto pico está directamente relacionada con la concentración del analito (Skoog *et al.*, 2008), dentro de la mezcla compleja que contiene cada extracto crudo. Por ello los picos más prominentes de cada extracto crudo corresponden a sustancias con mayor concentración dentro de la mezcla compleja.

Emplear un programa de gradiente por elución en la HPLC de fase reversa suele ser la opción más preferible cuando se analizan e intentan separar e identificar compuestos de una mezcla compleja (Sarker & Nahar, 2015). Debido a las propiedades químicas de la fase estacionaria, al principio de la separación cuando la proporción de ACN era menor que la del agua y, en consecuencia, la fase móvil era altamente polar, salieron varios picos que señalan compuestos polares presentes en los extractos 01004-48-19, 01004-48-20 y 01004-48-18, entre el minuto 0 - 5. Posteriormente, cuando se incrementó la proporción del ACN y, por lo tanto, bajó la polaridad de la fase móvil, se observaron las señales de los compuestos con menor polaridad en los extractos 01004-48-19, 01004-48-17 y 01004-48-18, entre 18 - 24 min. Solo los extractos 01004-48-19 y 01004-48-18 presentaron ambas clases de compuestos. En el extracto 01004-48-20 únicamente se detectó la presencia de 3 compuestos altamente polares entre el minuto 1 - 3, y en el 01004-48-17 se detectaron 9 compuestos de menor polaridad entre el minuto 18 - 24. Cabe resaltar que el extracto de mayor interés en este estudio (01004-48-19) por exhibir un alto

porcentaje de inhibición contra MSSA en el ensayo del MTT, fue el que tuvo el mayor número de picos, con 14 sustancias detectadas en la mezcla compleja que incluyen 8 compuestos de baja y 6 de alta polaridad.

Como se había mencionado anteriormente, las sustancias de interés que buscamos en este estudio son capaces de disolverse en sustancias polares como el metanol o de mediana polaridad como el acetato de etilo, por ello se emplearon como disolventes de extracción. Con base en el perfil cromatográfico y las características químicas de los extractos crudos, se sugiere que estos podrían contener grupos funcionales polares como ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas, amidas, entre otros. Por lo que se ha visto en muchas investigaciones y revisiones (Dashti *et al.*, 2014; Amelia *et al.*, 2018; Santhanam *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019; Bibi *et al.*, 2020; Andrade, 2022), las moléculas antimicrobianas presentan estructuras químicas con varios grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno. Los antimicrobianos aislados de *Haliclona oculata*, por ejemplo, contienen grupos como fenoles, aminas y amidas, y en general, la mayoría de los metabolitos que han sido aislados de esponjas marinas *Haliclona* son alcaloides nitrogenados (Zhu *et al.*, 2019; Andrade, 2022).

Los compuestos con potencial antimicrobiano detectados en los extractos crudos de *Nocardiosis dassonvillei*, especialmente el extracto 01004-48-19, pertenecen a una amplia gama de clases químicas, sin embargo, la caracterización parcial descrita aquí, puede ser útil para fraccionar el extracto y posteriormente, identificar fracciones activas con ensayos de actividad, pero no es suficiente para caracterizar cada sustancia. Por lo que se recomienda, para futuras investigaciones, emplear diversas técnicas analíticas acopladas como HPLC-MS o HPLC-NMR o ambas, ya que han demostrado ser muy eficientes para dilucidar la estructura química de diversos metabolitos secundarios (Mahomoodally *et al.*, 2018; Montero *et al.*, 2018; Zengin *et al.*, 2018).

9. Conclusiones

Las esponjas marinas son un componente clave en las cuevas anquihalinas donde la fauna y el ambiente están afectados por la ausencia de luz, las condiciones fisicoquímicas, la cantidad de materia orgánica y la cantidad de oxígeno disuelto disponible. Como resultado de ello, la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak, presenta una serie de desafíos distintos al ser un ecosistema semiaislado, oscuro y con una comunidad única de esponjas encontradas en el interior. Este estudio marcó la primera caracterización del microbioma de una de dichas esponjas, el porífero *Haliclona (Soestella)*, un subgénero que no se había registrado antes en las cuevas anquihalinas de la Península de Yucatán y, además, mejoró el conocimiento sobre las posibles multifuncionalidades que presenta el microbioma dentro de la esponja en el ecosistema anquihalino.

Con base en las propiedades fisicoquímicas de la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak, y probables beneficios que el hospedero *Haliclona (Soestella)* sp. le brinda a su consorcio microbiano y viceversa, y la identificación de taxa microbianos por 16S ARNr, se sugiere que las bacterias que habitan la esponja son en su mayoría microorganismos mesófilos, ligeramente alcalófilos y halófilos, cuya respiración es aerobia facultativa y, los cuales además, tienen la capacidad de participar en los ciclos biogeoquímicos de la esponja hospedera. La presencia de los microorganismos detectados en *Haliclona (Soestella)* está relacionada con las características del ambiente en el que se encuentra la esponja. Los reportes bibliográficos proponen que los microorganismos presentes en la esponja *Haliclona* sp. estudiada son capaces de realizar distintos procesos biogeoquímicos, como la asimilación de nutrientes, desecho de sustancias tóxicas y producción de compuestos bioactivos que le ayudarían a la esponja a sobrevivir e impulsar su evolución dentro de este tipo de ambiente.

El análisis de los datos de secuenciación del amplicón de la región V4 del gen 16S ARNr de *Haliclona (Soestella)* utilizando QIIME2, permitió conocer por primera vez la compleja composición taxonómica de los microorganismos asociados con la

esponja del ecosistema anquihalino. La comparación de las comunidades microbianas entre las 3 bases de datos usadas, reveló que la base de datos SILVA 138 es la mejor opción para estudios de este tipo. Entre las comunidades de *Haliclona (Soestella)*, los filos de mayor abundancia relativa fueron Proteobacteria, Crenarchaeota, Campylobacterota y Bacteroidetes. El análisis de la taxa presente en el microbioma permitió emitir hipótesis nuevas acerca del papel de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos de las cuevas anquihalinas. Además, la alta abundancia de Archaea sugiere que la esponja *Haliclona (Soestella)* y, posiblemente, las otras tres esponjas que se encontraron dentro de la cueva son buenos candidatos de estudio para este grupo de microorganismos. Cabe destacar que la esponja de estudio es HMA de acuerdo a los parámetros que se establecen para designarlas.

El cultivo a mediana escala de una de las bacterias aisladas de *Haliclona (Soestella)* para obtener extractos crudos y la posterior aplicación de un ensayo de actividad antimicrobiana, reveló que los extractos de *Nocardiopsis dassonvillei* contienen sustancias con el potencial de inhibir el metabolismo de una cepa patógena. En particular, la actividad antimicrobiana del extracto 01004-48-19 a 200 µg/mL fue alta (81.32%) frente a la cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC 25913. Los extractos crudos obtenidos mostraron actividad biológica y se observó que están compuestos principalmente por moléculas de baja polaridad. Una primera caracterización del extracto crudo que presentó mayor actividad antimicrobiana sugiere que está compuesto por alcaloides. Esta observación coincide con reportes de metabolitos secundarios aislados de esponjas del género *Haliclona* que pertenecen a esta clase de compuestos y en los cuales se ha observado actividad antibacteriana contra bacterias patógenas. Este estudio demostró que las bacterias asociadas a la esponja marina *Haliclona* sp, incluida la bacteria *N. dassonvillei*, pueden ser una buena fuente de sustancias antimicrobianas con potencial farmacológico. Sin embargo, se requiere más investigación para evaluar el verdadero potencial biotecnológico del microbioma de esta esponja perteneciente al ecosistema anquihalino.

Por último, el conjunto de datos taxonómicos asignados al microbioma de *Haliclona* (*Soestella*) puede emplearse para evaluar el grado de especificidad microbiana que alberga la esponja estudiada o la existencia de patrones biogeográficos o ambientales, cuando se reúnan más resultados a futuro sobre esta u otras esponjas del mismo subgénero encontradas en otras cuevas anquihalinas de la Península de Yucatán. Además, todos los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, indicaron la importancia de combinar diferentes metodologías tanto independientes como dependientes de cultivo, para lograr la caracterización integral de las poblaciones microbianas complejas que se encuentran en las esponjas marinas de ambientes poco estudiados como las cuevas anquihalinas.

10. Perspectivas futuras

El análisis de los datos fisicoquímicos del agua del sitio de recolección fue importante para determinar la calidad del agua de mar y analizar cómo estos parámetros influyen en la esponja y en su microbioma. Por ello es esencial realizar estudios futuros de este ecosistema para monitorear la biodiversidad y la alteración de la estructura y función de su comunidad. Los estudios adicionales deberían centrarse en el perfilado del microbioma de la cueva anquihalina para determinar los cambios que experimenta la comunidad con respecto a la variación de los factores fisicoquímicos. Además, para una mejor caracterización del microbioma de la esponja *Haliclona (Soestella)* es necesario utilizar un mayor número de individuos de la esponja, o muestras tanto de la zona del espejo como del interior de la cueva y contar con un mayor número de esfuerzo de secuenciación del gen 16S ARNr.

Dentro del grupo de investigación en el que se efectuó este proyecto de licenciatura (LEMyPNM), actualmente están en desarrollo diversos proyectos independientes de cultivo enfocados a la evaluación metagenómica del ADN de las esponjas colectadas, incluida *Haliclona (Soestella)*, para predecir las posibles vías y el metabolismo de los microorganismos presentes, con lo cual se podrían comprobar las propuestas sugeridas en este estudio y explorar la comunidad microbiana de una manera más completa. Además, con estos resultados, el posible seguimiento de este estudio respecto al método dependiente de cultivo, debe incluir el desarrollo de nuevos métodos y medios de cultivo con los que sea posible estudiar la fracción sin cultivar de la esponja estudiada. También es posible que otras herramientas de las ciencias ómicas, como la metabolómica, para obtener información más precisa sobre la actividad funcional de las comunidades microbianas de esponjas de ambientes anquihalinos, sean implementadas en estudios futuros como parte de nuestras líneas de investigación. Por otro lado, sigue en desarrollo la identificación hasta nivel de especie de las esponjas encontradas dentro de la cueva anquihalina en “Bajo de Judas”, Xcalak.

Debido a que uno de los extractos de la esponja estudiada mostró una potente

actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25913, la cual a menudo se reporta como una bacteria patógena muy peligrosa, será muy relevante estudiar el modo de acción de este extracto aislando los compuestos puros en lugar de solo probar la actividad de la mezcla compleja. Se recomienda también que los extractos se evalúen contra otras bacterias patógenas ESKAPE o en otros ensayos distintos a la prueba del MTT, y con ello, poder explorar las distintas bioactividades que las moléculas contenidas puedan presentar. Sí se llegan a obtener los compuestos puros de los extractos que mostraron mayor actividad, sería fundamental evaluar su eficacia obteniendo la MIC y la actividad sinérgica de la terapia combinada entre dos o más compuestos frente a cepas patógenas.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, B., Boury-Esnault, N., Carballo, J. L., Cárdenas, P., de Voogd, N., Díaz, M.-C., Dohrmann, M., Downey, R., Hajdu, E., Hooper, J., Kelly, M., Klautau, M., Manconi, R., Morrow, C., Pisera, A., Ríos, P., Rützler, K., Schönberg, C., Vacelet, J., & van Soest, R. (2022). *World porifera database*. IMIS.
<https://www.marinespecies.org/imis.php?dasid=546&doiid=359>
- Amelia, T. S. M., Amirul, A.-A. A., Saidin, J., & Bhupalan, K. (2018). Identification of cultivable bacteria from tropical marine sponges and their biotechnological potentials. *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 187–199. <https://doi.org/10.21315/tlsr2018.29.2.13>
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00191-16>
- Andrade, F. R. N. (2022). *Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas Haliclona (Reniera) implexiformis e Aplysina fistularis* [76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza].
<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/65043>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/idr.s173867>
- Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, 18(S2).
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Bartz, J.-O., Blom, J., Busse, H.-J., Mvie, J. B., Hardt, M., Schubert, P., Wilke, T., Goessmann, A., Wilharm, G., Bender, J., Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2018). *Parendoziomonas haliclona* gen. nov. sp. nov. isolated from a marine sponge of the genus *Haliclona* and description of the family Endozoicomonadaceae fam. nov. comprising the genera *Endozoicomonas*, *Parendoziomonas*, and *Kistimonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 73–84.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.004>
- Bayer, K., Jahn, M. T., Slaby, B. M., Moitinho-Silva, L., & Hentschel, U. (2018). Marine Sponges as Chloroflexi Hot Spots: Genomic Insights and High-Resolution Visualization of an Abundant and Diverse Symbiotic Clade. *MSystems*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00150-18>
- Bernardet, J.-F., & Nakagawa, Y. (2006). An introduction to the family flavobacteriaceae. In

The Prokaryotes (pp. 455–480). Springer New York.
http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30747-8_16

- Bibi, F., & Azhar, E. I. (2021). Analysis of bacterial communities in sponges and coral inhabiting Red Sea, using barcoded 454 pyrosequencing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.021>
- Bibi, F., Yasir, M., Al-Sofyani, A., Naseer, M. I., & Azhar, E. I. (2020). Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>
- Bispo, A., Correia, M. D., & Hajdu, E. (2014). Two new shallow-water species of *Haliclona* from north-eastern Brazil (Demospongiae: Haplosclerida: Chalinidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(2), 237–249. <https://doi.org/10.1017/s0025315414000344>
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., [...] Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bukin, Yu. S., Galachyants, Yu. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zenskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Cain, S. K. (2020). *Investigation of Sulfur Cycling in Marine Sponge *Cinachyrella* spp. from a South Florida Reef*. NSUWorks. https://nsuworks.nova.edu/hcas_etd_all/28
- Calcabrini, C., Catanzaro, E., Bishayee, A., Turrini, E., & Fimognari, C. (2017). Marine sponge natural products with anticancer potential: An updated review. *Marine Drugs*, 15(10), 310. <https://doi.org/10.3390/md15100310>
- Calderón-Gutiérrez, F., Sánchez-Ortiz, C. A., & Huato-Soberanis, L. (2018). Ecological patterns in anchialine caves. *PLOS ONE*, 13(11), e0202909.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202909>

- Calderón-Gutiérrez, F., Solís-Marín, F. A., Gómez, P., Sánchez, C., Hernández-Alcántara, P., Álvarez-Noguera, F., & Yáñez-Mendoza, G. (2017). Mexican anchialine fauna — With emphasis in the high biodiversity cave El Aerolito. *Regional Studies in Marine Science*, 9, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.11.001>
- Campana, S., Busch, K., Hentschel, U., Muyzer, G., & Goeij, J. M. (2021). DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) identifies marine sponge-associated bacteria actively utilizing dissolved organic matter (DOM). *Environmental Microbiology*, 23(8), 4489–4504. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15642>
- Caporaso, J. G., Ackermann, G., Apprill, A., Bauer, M., Berg-Lyons, D., Betley, J., Fierer, N., Fraser, L., A. Fuhrman, J., A. Gilbert, J., Gormley, N., Humphrey, G., Huntley, J., K. Jansson, J., Knight, R., L. Lauber, C., A. Lozupone, C., McNally, S., M. Needham, D., [...] Weber, L. (2018). EMP 16S Illumina Amplicon Protocol v1. *Protocols. Io*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.nuudeww>
- Carballo, J. L., Gómez, P., & Cruz-Barraza, J. A. (2014). Biodiversidad de Porifera en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 143–153. <https://doi.org/10.7550/rmb.32074>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chen, S., Xie, J., & Wen, Z. (2021). Microalgae-based wastewater treatment and utilization of microalgae biomass. In Y. Li & W. Zhou (Eds.), *Advances in Bioenergy* (pp. 165–198). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aibe.2021.05.002>
- Cheng, M.-M., Tang, X.-L., Sun, Y.-T., Song, D.-Y., Cheng, Y.-J., Liu, H., Li, P.-L., & Li, G.-Q. (2020). Biological and chemical diversity of marine sponge-derived microorganisms over the last two decades from 1998 to 2017. *Molecules*, 25(4), 853. <https://doi.org/10.3390/molecules25040853>
- Choi, A., Lee, K., Oh, H.-M., Feng, J., & Cho, J.-C. (2010). *Litoricola marina* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1303–1306. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016022-0>
- CONABIO. (2020). *Catálogo de Colecciones e Instituciones SNIB*. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/InstyColecc>
- Dashti, Y., Grkovic, T., Abdelmohsen, U., Hentschel, U., & Quinn, R. (2014). Production of Induced Secondary Metabolites by a Co-Culture of Sponge-Associated Actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiopsis* sp. RV163. *Marine Drugs*, 12(5), 3046–3059. <https://doi.org/10.3390/md12053046>
- Dat, T. T. H., Steinert, G., Cuc, N. T. K., Smidt, H., & Sipkema, D. (2021). Bacteria cultivated

- from sponges and bacteria not yet cultivated from sponges—a review. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737925>
- Database resources of the National Center for Biotechnology Information. (2015). *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D7–D19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
- Deshpande, A., & Thakur, N. (2020). Chemical ecology driven bioprospecting of marine sponges. In S.-K. Kim (Ed.), *Encyclopedia of Marine Biotechnology* (First Edition, Vol. 5, pp. 681–692). John Wiley & Sons Ltd.
- Developers, I. W. (2021). *Draw freely*. Inkscape. <https://inkscape.org/es/>
- Dirección General de Repositorios Universitarios, UNAM. (2015). *Portal de Datos Abiertos UNAM*. Colecciones Universitarias. <https://datosabiertos.unam.mx/>
- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., McDonald, D., González, A., Kosciolk, T., Martino, C., Zhu, Q., Birmingham, A., Vázquez-Baeza, Y., Dillon, M. R., Bolyen, E., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2020). QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.100>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8(3), 186–194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Feng, G., & Li, Z. (2019). Carbon and nitrogen metabolism of sponge microbiome. In Z. Li (Ed.), *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals* (pp. 145–169). Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_9
- Fiorini, L., Tribalat, M.-A., Sauvard, L., Cazareth, J., Lalli, E., Broutin, I., Thomas, O. P., & Mus-Veteau, I. (2015). Natural paniceins from mediterranean sponge inhibit the multidrug resistance activity of Patched and increase chemotherapy efficiency on melanoma cells. *Oncotarget*, 6(26), 22282–22297. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4162>
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01297>
- Fondriest Environmental, Inc. (2014). *Conductivity, salinity & total dissolved solids*. Environmental Measurement Systems.

<https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/conductivity-salinity-tds/#info>

- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology*, *13*(2), e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>
- Fuerst, J. A. (2014). Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(17), 7331–7347. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5861-x>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, *38*(3), 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- García, N. (s.f.). *¿Qué es la conductividad?* HACH Company. Retrieved May 25, 2022, from https://latam.hach.com/cms-portals/hach_mx/cms/documents/Que-s-la-conductividad-Final.pdf
- Gerovasileiou, V., & Voultsiadou, E. (2012). Marine caves of the Mediterranean Sea: A sponge biodiversity reservoir within a biodiversity hotspot. *PLoS ONE*, *7*(7), e39873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039873>
- Giles, E. C., Kamke, J., Moitinho-Silva, L., Taylor, M. W., Hentschel, U., Ravasi, T., & Schmitt, S. (2012). Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(1), 232–241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01467.x>
- Gómez, P., & Calderón-Gutiérrez, F. (2020). Anchialine cave-dwelling sponge fauna (Porifera) from La Quebrada, Mexico, with the description of the first Mexican stygobiont sponges. *Zootaxa*, *4803*(1), 125–151. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4803.1.7>
- Gómez, P., Calderón-Gutiérrez, F., González-Gándara, C., & Rojas-Terán, M. de L. Á. (2021). New species of *Microscleroderma* and *Amphibleptula* (Demospongiae, Tetractinellida, Scleritodermidae) from two contrasting marine environments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0025315421000114>
- Goris, T., & Diekert, G. (2016). The Genus *Sulfurospirillum*. In L. Adrian & F. Löffler (Eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria* (pp. 209–234). Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0_10
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, *120*(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Gunathilake, V., Bertolino, M., Bavestrello, G., & Udagama, P. (2020). Immunomodulatory Activity of the Marine Sponge, *Haliclona* (*Soestella*) sp. (Haplosclerida: Chalinidae),

- from Sri Lanka in Wistar Albino Rats: Immunosuppression and Th1-Skewed Cytokine Response. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2020/7281295>
- Hall, M., & Beiko, R. G. (2018). 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. In R. G. Beiko, W. Hsiao, & J. Parkinson (Eds.), *Microbiome Analysis: Methods in Molecular Biology* (pp. 113–129). Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_8
- Hamoda, A. M., Fayed, B., Ashmawy, N. S., El-Shorbagi, A.-N. A., Hamdy, R., & Soliman, S. S. M. (2021). Marine Sponge is a Promising Natural Source of Anti-SARS-CoV-2 Scaffold. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666664>
- Hardoim, C., & Costa, R. (2014). Microbial communities and bioactive compounds in marine sponges of the family irciniidae—a review. *Marine Drugs*, 12(10), 5089–5122. <https://doi.org/10.3390/md12105089>
- Helber, S. B., Steinert, G., Wu, Y.-C., Rohde, S., Hentschel, U., Muhandó, C. A., & Schupp, P. J. (2019). Sponges from Zanzibar host diverse prokaryotic communities with potential for natural product synthesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz026>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Ibrahim, A., Desoukey, S., Fouad, M., Kamel, M., Gulder, T., & Abdelmohsen, U. (2018). Natural product potential of the genus nocardopsis. *Marine Drugs*, 16(5), 147. <https://doi.org/10.3390/md16050147>
- Iliffe, T. M., & Kornicker, L. S. (2009). Worldwide Diving Discoveries of Living Fossil Animals from the Depths of Anchialine and Marine Caves. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*, 38, 269–280.
- Illumina. (2011). Quality scores for next-generation sequencing. *Illumina, Inc. All Rights Reserved*.
- Jasmin, C., Anas, A., & Nair, S. (2015). Bacterial Diversity Associated with *Cinachyra cavernosa* and *Haliclona pigmentifera*, Cohabiting Sponges in the Coral Reef Ecosystem of Gulf of Mannar, Southeast Coast of India. *PLOS ONE*, 10(5), e0123222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123222>
- Jayanetti, D. R., Braun, D. R., Barns, K. J., Rajski, S. R., & Bugni, T. S. (2019). Bulbiferates A and B: Antibacterial Acetamidohydroxybenzoates from a Marine Proteobacterium, *Microbulbifer* sp. *Journal of Natural Products*, 82(7), 1930–1934. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00312>
- Jensen, S., Fortunato, S. A. V., Hoffmann, F., Hoem, S., Rapp, H. T., Øvreås, L., & Torsvik, V. L. (2016). The relative abundance and transcriptional activity of marine

- sponge-associated microorganisms emphasizing groups involved in sulfur cycle. *Microbial Ecology*, 73(3), 668–676. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0836-3>
- Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J., & Li, X. (2007). Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(4), 405–416. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9169-z>
- Kelly, S., Jensen, P., Henkel, T., Fenical, W., & Pawlik, J. (2003). Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquatic Microbial Ecology*, 31, 175–182. <https://doi.org/10.3354/ame031175>
- Kim, H., Kim, S., & Jung, S. (2020). Instruction of microbiome taxonomic profiling based on 16S rRNA sequencing. *Journal of Microbiology*, 58(3), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9556-y>
- Klein, D. R. (2021). *Organic chemistry* (Fourth Edition). Wiley Global Education.
- Konstantinou, D., Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E., & Gkelis, S. (2018). Sponges-Cyanobacteria associations: Global diversity overview and new data from the Eastern Mediterranean. *PLOS ONE*, 13(3), e0195001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195001>
- Konstantinou, D., Mavrogonatou, E., Zervou, S.-K., Giannogonas, P., & Gkelis, S. (2020). Bioprospecting sponge-associated marine cyanobacteria to produce bioactive compounds. *Toxins*, 12(2), 73. <https://doi.org/10.3390/toxins12020073>
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 271–297). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kushkevych, I., Dordević, D., & Vítězová, M. (2019). Analysis of pH dose-dependent growth of sulfate-reducing bacteria. *Open Medicine*, 14(1), 66–74. <https://doi.org/10.1515/med-2019-0010>
- Lavy, A., Keren, R., Haber, M., Schwartz, I., & Ilan, M. (2013). Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2), 486–502. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12240>
- Libretexts. (2018). 28.1B: Morphology of sponges. *Libretexts*, 1179–1185. <https://bio.libretexts.org/@go/page/13709>
- Liévano, L., & Rodríguez, E. (2020). *Expedición a Xcalak y cenote Crustacea*.
- Lu, P., Wang, W., Zhang, G., Li, W., Jiang, A., Cao, M., Zhang, X., Xing, K., Peng, X., Yuan, B., & Feng, Z. (2021). Correction: Isolation and characterization marine bacteria capable of degrading lignin-derived compounds. *PLOS ONE*, 16(10), e0259490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259490>

- Lurgi, M., Thomas, T., Wemheuer, B., Webster, N. S., & Montoya, J. M. (2019). Modularity and predicted functions of the global sponge-microbiome network. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08925-4>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock: Biología de los microorganismos*. (Decimocuarta Edición). PEARSON Educación.
- Mahomoodally, M. F., Zengin, G., Aladag, M. O., Ozparlak, H., Diuzheva, A., Jekó, J., Cziáky, Z., & Aumeeruddy, M. Z. (2018). HPLC-MS/MS chemical characterization and biological properties of *Origanum onites* extracts: A recent insight. *International Journal of Environmental Health Research*, *29*(6), 607–621. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1558184>
- Makuwa, S. C., & Serepa-Dlamini, M. H. (2021). The Antibacterial Activity of Crude Extracts of Secondary Metabolites from Bacterial Endophytes Associated with *Dicoma anomala*. *International Journal of Microbiology*, *2021*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/8812043>
- Martínez, A. (2021). *Ensayos para determinar la actividad antimicrobiana de compuestos puros, extractos y fracciones*.
- Marziah, Z., Mahdzir, A., Musa, Md. N., Jaafar, A. B., Azhim, A., & Hara, H. (2016). Abundance of sulfur-degrading bacteria in a benthic bacterial community of shallow sea sediment in the off-Terengganu coast of the South China Sea. *MicrobiologyOpen*, *5*(6), 967–978. <https://doi.org/10.1002/mbo3.380>
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., & Hugenholtz, P. (2011). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, *6*(3), 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, *12*(8), 4539–4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>
- Mitova, M., Popov, S., & De Rosa, S. (2004). Cyclic Peptides from a *Ruegeria* Strain of Bacteria Associated with the Sponge *Suberites domuncula*. *Journal of Natural Products*, *67*(7), 1178–1181. <https://doi.org/10.1021/np049900+>
- Moitinho-Silva, L., Nielsen, S., Amir, A., Gonzalez, A., Ackermann, G. L., Cerrano, C., Astudillo-Garcia, C., Easson, C., Sipkema, D., Liu, F., Steinert, G., Kotoulas, G., McCormack, G. P., Feng, G., Bell, J. J., Vicente, J., Björk, J. R., Montoya, J. M., Olson, J. B., ... Thomas, T. (2017). The sponge microbiome project. *GigaScience*, *6*(10). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix077>
- Mokhtar, M. B., Aris, A. Z., Abdullah, M. H., Yusoff, M. K., Abdullah, Md. P., Idris, Abd. R., & Raja Uzir, R. I. (2009). A pristine environment and water quality in perspective: Maliau Basin, Borneo's mysterious world. *Water and Environment Journal*, *23*(3), 219–228.

<https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2008.00139.x>

- Montero, L., Sedghi, M., García, Y., Almeida, C., Safi, C., Engelen-Smit, N., Cifuentes, A., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). Pressurized Liquid Extraction of Pigments from *Chlamydomonas* sp. and Chemical Characterization by HPLC–MS/MS. *Journal of Analysis and Testing*, 2(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/s41664-018-0062-8>
- Moran, S. (2018). Clean water characterization and treatment objectives. In *An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design* (pp. 61–67). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811309-7.00006-0>
- Najafi, A., Moradinasab, M., & Nabipour, I. (2018). First record of microbiomes of sponges collected from the Persian Gulf, using tag pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01500>
- Neu, A. T., Allen, E. E., & Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
- Orlić, S. (2019). Microbial diversity of sponge/coral microbiome. In Z. Li (Ed.), *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals* (pp. 29–41). Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_3
- Pallela, R., & Ehrlich, H. (Eds.). (2016). *Marine sponges: Chemicobiological and biomedical applications*. Springer. DOI: 10.1007/978-81-322-2794-6_1
- Park, S.-C., & Won, S. (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using a Mock Community. *Genomics & Informatics*, 16(4), e24. <https://doi.org/10.5808/gi.2018.16.4.e24>
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pawlik, J. R. (2011). The chemical ecology of sponges on Caribbean Reefs: Natural products shape natural systems. *BioScience*, 61(11), 888–898. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.11.8>
- Pawlik, J. R., & McMurray, S. E. (2020). The emerging ecological and biogeochemical importance of sponges on coral reefs. *Annual Review of Marine Science*, 12(1), 315–337. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010807>
- Quévrain, E., Domart-Coulon, I., & Bourguet-Kondracki, M.-L. (2014). *Natural Products: Discourse, Diversity, and Design* (A. Osbourn, R. J. Goss, & G. T. Carter, Eds.; First Edition, pp. 39–66). John Wiley & Sons, Inc.
- Radjasa, O. K., Vaske, Y. M., Navarro, G., Vervoort, H. C., Tenney, K., Linington, R. G., &

- Crews, P. (2011). Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(22), 6658–6674. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.017>
- Rideout, J. R., Chase, J. H., Bolyen, E., Ackermann, G., González, A., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2016). Keemei: Cloud-based validation of tabular bioinformatics file formats in Google Sheets. *GigaScience*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0133-6>
- Riding, R., Liang, L., Lee, J.-H., & Virgone, A. (2019). Influence of dissolved oxygen on secular patterns of marine microbial carbonate abundance during the past 490 Myr. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 514, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2018.10.006>
- Rivera-Chávez, J., Ceapă, C.-D., & Figueroa, M. (2022). Biological Dark Matter Exploration using Data Mining for the Discovery of Antimicrobial Natural Products. *Planta Med*, 88, 1–19. <https://doi.org/DOI: 10.1055/a-1795-0562>
- Robeson, M. S., II, O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2020). *RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://dx.doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>
- Romano, S. (2018). Ecology and biotechnological potential of bacteria belonging to the genus pseudovibrio. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8). <https://doi.org/10.1128/aem.02516-17>
- RStudio. (2021). Open Source & Professional Software for Data Science Teams - RStudio. <http://www.rstudio.com/>
- Ruocco, N., Esposito, R., Bertolino, M., Zazo, G., Sonnessa, M., Andreani, F., Coppola, D., Giordano, D., Nuzzo, G., Lauritano, C., Fontana, A., Ianora, A., Verde, C., & Costantini, M. (2021). A metataxonomic approach reveals diversified bacterial communities in antarctic sponges. *Marine Drugs*, 19(3), 173. <https://doi.org/10.3390/md19030173>
- Santhanam, R., Ramesh, S., & Sunilson, A. J. (2018). *Biology and ecology of pharmaceutical marine sponges*. CRC Press.
- Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M. L., Santos, J. F. M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., & Laport, M. S. (2010). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, 161(7), 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.013>
- Santos-Gandelman, J. F., Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M., Andrade, C. L., Korenblum, E., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., & Laport, M. S. (2013). Characterization of cultivable bacteria from Brazilian sponges. *Marine Biotechnology*, 15(6), 668–676.

<https://doi.org/10.1007/s10126-013-9518-z>

- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2015). Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. In P. K. Mukherjee (Ed.), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (pp. 405–425). Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-800874-4.00019-2>
- Scanlon, B. R., Reedy, R. C., Xu, P., Engle, M., Nicot, J. P., Yoxtheimer, D., Yang, Q., & Ikonnikova, S. (2020). Can we beneficially reuse produced water from oil and gas extraction in the U.S.? *Science of The Total Environment*, 717, 137085.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137085>
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., Perez, T., Rodrigo, A., Schupp, P. J., Vacelet, J., Webster, N., Hentschel, U., & Taylor, M. W. (2011). Assessing the complex sponge microbiota: Core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6(3), 564–576.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.116>
- Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K., & Hema, T. A. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiosis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 435–445.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1878-y>
- Sipkema, D., Holmes, B., Nichols, S. A., & Blanch, H. W. (2009). Biological Characterization of *Haliclona* (?gellius) sp.: Sponge and Associated Microorganisms. *Microbial Ecology*, 58(4), 903–920. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9534-8>
- Sizikov, S., Burgsdorf, I., Handley, K. M., Lahyani, M., Haber, M., & Steindler, L. (2020). Characterization of sponge-associated Verrucomicrobia: Microcompartment-based sugar utilization and enhanced toxin–antitoxin modules as features of host-associated Opitutales. *Environmental Microbiology*, 22(11), 4669–4688.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15210>
- Sket, B. (2019). Anchihaline (Anchialine) caves and fauna. In W. B. White, D. C. Culver, & T. Pipan (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (pp. 56–64). Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814124-3.00008-x>
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., & Holler, F. J. (2008). *Principios de análisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning Editores.
- Spietz, R. L., Williams, C. M., Rocap, G., & Horner-Devine, M. C. (2015). A dissolved oxygen threshold for shifts in bacterial community structure in a seasonally hypoxic estuary. *PLOS ONE*, 10(8), e0135731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135731>
- Steinert, G., Busch, K., Bayer, K., Kodami, S., Arbizu, P. M., Kelly, M., Mills, S., Erpenbeck, D., Dohrmann, M., Wörheide, G., Hentschel, U., & Schupp, P. J. (2020).

- Compositional and quantitative insights into bacterial and archaeal communities of South Pacific deep-sea sponges (demospongiae and hexactinellida). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00716>
- Stolz, J. F., Ellis, D. J., Blum, J. S., Ahmann, D., Lovley, D. R., & Oremland, R. S. (1999). Note: Sulfurospirillum barnesii sp. nov. and Sulfurospirillum arsenophilum sp. nov., new members of the Sulfurospirillum clade of the ϵ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1177–1180. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1177>
- Suárez-Moo, P., Remes-Rodríguez, C. A., Márquez-Velázquez, N. A., Falcón, L. I., García-Maldonado, J. Q., & Prieto-Davó, A. (2022). Changes in the sediment microbial community structure of coastal and inland sinkholes of a karst ecosystem from the Yucatan peninsula. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05135-9>
- Sun, H., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Del Rio, T. G., Tice, H., Cheng, J.-F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Pagani, I., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., ... Klenk, H.-P. (2010). Complete genome sequence of Nocardioopsis dassonvillei type strain (IMRU 509T). *Standards in Genomic Sciences*, 3(3), 325–336. <https://doi.org/10.4056/sigs.1363462>
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., Olson, J. B., Erwin, P. M., López-Legentil, S., Luter, H., Chaves-Fonnegra, A., Costa, R., Schupp, P. J., Steindler, L., Erpenbeck, D., Gilbert, J., Knight, R., Ackermann, G., Victor Lopez, J., ... Webster, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11870>
- Turon, M., & Uriz, M. J. (2020). New insights into the archaeal consortium of tropical sponges. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00789>
- Usher, K. M., Fromont, J., Sutton, D. C., & Toze, S. (2004). The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from Australia and the Mediterranean. *Microbial Ecology*, 48(2), 167–177. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1062-3>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- VIMS. (2022). *Impacts*. Virginia Institute of Marine Science. https://www.vims.edu/research/topics/dead_zones/impacts/index.php
- Webster, N. S., Luter, H. M., Soo, R. M., Botté, E. S., Simister, R. L., Abdo, D., & Whalan, S. (2013). Same, same but different: Symbiotic bacterial associations in GBR sponges. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00444>

- Weerdt, W. H. D. (2012). Family Chalinidae Gray, 1867. In J. N. A. Hooper & R. W. M. Van Soest (Eds.), *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges* (pp. 852–873). Springer Science & Business Media.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*, *10*(2407). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wolny, D., Lodowska, J., Jaworska-Kik, M., Kurkiewicz, S., Węglarz, L., & Dzierżewicz, Z. (2010). Chemical composition of *Desulfovibrio desulfuricans* lipid A. *Archives of Microbiology*, *193*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0640-2>
- Wörheide, G., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., Larroux, C., Maldonado, M., Voigt, O., Borchiellini, C., & Lavrov, D. V. (2012). Deep phylogeny and evolution of sponges (phylum porifera). In M. A. Becerro, M. J. Uriz, M. Maldonado, & X. Turon (Eds.), *Advances in Sponge Science: Phylogeny, Systematics, Ecology* (pp. 1–78). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-387787-1.00007-6>
- Xie, C., Goi, C. L. W., Huson, D. H., Little, P. F. R., & Williams, R. B. H. (2016). RiboTagger: Fast and unbiased 16S/18S profiling using whole community shotgun metagenomic or metatranscriptome surveys. *BMC Bioinformatics*, *17*(S19). <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1378-x>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, Q., Franco, C. M. M., & Zhang, W. (2019). Uncovering the hidden marine sponge microbiome by applying a multi-primer approach. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42694-w>
- Ye, L., Santos-Gandelman, J. F., Hardoim, C. C. P., George, I., Cornelis, P., & Laport, M. S. (2015). Antibacterial activity and mutagenesis of sponge-associated *Pseudomonas fluorescens* H41. *Antonie van Leeuwenhoek*, *108*(1), 117–126. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0469-4>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zengin, G., Uysal, A., Diuzheva, A., Gunes, E., Jekő, J., Cziáky, Z., Picot-Allain, C. M. N., & Mahomoodally, M. F. (2018). Characterization of phytochemical components of *Ferula halophila* extracts using HPLC-MS/MS and their pharmacological potentials: A multi-functional insight. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *160*, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.020>
- Zhang, D., Sun, W., Feng, G., Zhang, F., Anbuezhian, R., Li, Z., & Jiang, Q. (2015).

- Phylogenetic diversity of sulphate-reducing *Desulfovibrio* associated with three South China Sea sponges. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 504–512.
<https://doi.org/10.1111/lam.12400>
- Zhang, F., Jonas, L., Lin, H., & Hill, R. T. (2019). Microbially mediated nutrient cycles in marine sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 95 (11).
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiz155>
- Zhang, F., Pita, L., Erwin, P. M., Abaid, S., López-Legentil, S., & Hill, R. T. (2014). Symbiotic archaea in marine sponges show stability and host specificity in community structure and ammonia oxidation functionality. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 699–707.
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12427>
- Zhang, H., Zhao, Z., & Wang, H. (2017). Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms. *Marine Drugs*, 15(3), 68.
<https://doi.org/10.3390/md15030068>
- Zhang, X., Chen, S., Zhang, L., Zhang, Q., Zhang, W., Chen, Y., Zhang, W., Zhang, H., & Zhang, C. (2021). Dasonmycins A and B, Polycyclic Thioalkaloids from a Marine Sponge-Derived *Nocardioopsis dassonvillei* SCSIO 40065. *Organic Letters*, 23(8), 2858–2862. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00328>
- Zheng, Z., Fu, Y., Liu, K., Xiao, R., Wang, X., & Shi, H. (2018). Three-stage vertical distribution of seawater conductivity. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27931-y>
- Zhu, J., Liu, Y., Liu, Z., Wang, H., & Zhang, H. (2019). Bioactive nitrogenous secondary metabolites from the marine sponge genus *haliclona*. *Marine Drugs*, 17(12), 682.
<https://doi.org/10.3390/md17120682>

Anexos

Anexo I: Análisis bioinformático del microbioma con QIIME2

A continuación se presenta el protocolo básico de comandos utilizados en QIIME2, para el análisis de las secuencias del gen 16S ARNr y la asignación taxonómica del microbioma de esponja.

Recursos necesarios

Hardware

QIIME2 requiere un mínimo de 6 a 7 GB para la instalación, un mínimo de 4 GB de memoria para conjuntos de datos pequeños y 8 GB de memoria para la mayoría de los demás conjuntos de datos reales.

Software

QIIME2 se puede instalar en casi cualquier sistema informático de 64 bits (Mac OS y Linux, o en Windows a través de una Virtual box). Se necesita un navegador web actualizado, como Firefox o Chrome, para las visualizaciones con QIIME2 View o si se prefiere, pueden usarse paquetes como RStudio para la construcción de gráficos de nivel publicación.

Instalación de QIIME2

La última versión de QIIME2, así como instrucciones detalladas sobre cómo instalarlo en varios sistemas operativos, se encuentran disponibles en: <https://docs.qiime2.org/2022.2/install/>

Activación de QIIME2

```
conda activate qiime2-2021.8
```

Obtención de datos

Las secuencias se descargaron en formato FASTQ

```
mkdir qiime2-16S-Project
cd qiime2-16S-Project
mkdir 16S-rRNA-PairedEndSequences
cd 16S-rRNA-PairedEndSequences
```

La tabla de metadatos se creó en Google Sheets para validarse con Keemei, se descargó en formato (sample-metadata.tsv) y se guardó en la carpeta qiime2-16S-Project

```
wget \
  -O "AMP043_S91_L001_R1_001.fastq.gz" \
  "https://drive.google.com/file/d/1SVPBcLL45wfpPdbvx7Q
  DH_STInuleuEc/view?usp=sharing"
wget \
  -O "AMP043_S91_L001_R2_001.fastq.gz" \
  "https://drive.google.com/file/d/1OX2IUx7gK73Yugp
  InQB2P9Lhc1dT/view?usp=sharing"
```

Importación de datos

Secuencias en formato de Casava 1.8 demultiplexado de extremo pareado FASTQ

```
qiime tools import \
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path 16S-rRNA-PairedEndSequences \
  --input-format
  CasavaOneEightSingleLanePerSampleDirFmt \
  --output-path demux-paired-end.qza
```

Ensamblaje de las secuencias

Unión de las secuencias *forward* (R1) y *reverse* (R2)

```
qiime tools peek demux-paired-end.qza
```

```
qiime vsearch join-pairs \  
  --i-demultiplexed-seqs demux-paired-end.qza \  
  --o-joined-sequences demux-joined.qza  
qiime demux summarize \  
  --i-data demux-joined.qza \  
  --o-visualization demux-joined.qzv
```

Control de calidad con *Phred Score*

Filtración de las secuencias para obtener solo aquellas con calidad mínima de 20

```
qiime quality-filter q-score \  
  --i-demux demux-joined.qza \  
  --o-filtered-sequences demux-joined-filtered.qza \  
  --o-filter-stats demux-joined-filter-stats.qza \  
  --p-min-quality 20
```

Visualización de las estadísticas

```
qiime metadata tabulate \  
  --m-input-file demux-joined-filter-stats.qza \  
  --o-visualization demux-joined-filter-stats.qzv
```

Control de calidad con *Deblur*

Eliminación de las secuencias ruido de las librerías, aquí indicamos que corte todas las secuencias a 250 bp

```
qiime deblur denoise-16S \  
  --i-demultiplexed-seqs demux-joined-filtered.qza \  
  --p-trim-length 250 \  
  --p-sample-stats \  
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \  
  --o-table table.qza \  
  --o-stats deblur-stats.qza
```

Visualización de los resultados (Resúmenes de *FeatureTable* y *FeatureData*)

```
qiime feature-table tabulate-seqs \  
  --i-data rep-seqs.qza \  
  --o-visualization rep-seqs.qzv  
qiime feature-table summarize \  
  --i-table table.qza \  
  --o-visualization table.qzv  
qiime deblur visualize-stats \  
  --i-deblur-stats deblur-stats.qza \  
  --o-visualization deblur-stats.qzv
```

Curva de rarefacción

La profundidad de muestreo se estableció en 15,000

```
qiime diversity alpha-rarefaction \  
  --i-table table.qza \  
  --i-sequences rep-seqs.qza \  
  --p-max-depth 15000 \  
  --m-metadata-file sample-metadata.tsv \  
  --o-visualization alpha-rarefaction.qzv
```

Asignación taxonómica con SILVA 138

Obtención de la base de datos

```
qiime rescript get-silva-data \  
  --p-version '138' \  
  --p-target 'SSURef_NR99' \  
  --p-include-species-labels \  
  --o-silva-sequences silva-138-ssu-nr99-seqs.qza \  
  --o-silva-taxonomy silva-138-ssu-nr99-tax.qza
```

Eliminación de secuencias con bases ambiguas

```
qiime rescript cull-seqs \  
  --i-sequences silva-138-ssu-nr99-seqs.qza \  
  --o-clean-sequences  
silva-138-ssu-nr99-seqs-cleaned.qza
```

Eliminación de secuencias pequeñas

```
qiime rescript filter-seqs-length-by-taxon \  
  --i-sequences silva-138-ssu-nr99-seqs-cleaned.qza \  
  --i-taxonomy silva-138-ssu-nr99-tax.qza \  
  --p-labels Archaea Bacteria Eukaryota \  
  --p-min-lens 900 1200 1400 \  
  --o-filtered-seqs silva-138-ssu-nr99-seqs-filt.qza \  
  --o-discarded-seqs  
silva-138-ssu-nr99-seqs-discard.qza
```

Desrepleción de las secuencias idénticas

```
qiime rescript dereplicate \  
  --i-sequences silva-138-ssu-nr99-seqs-filt.qza \  
  --i-taxa silva-138-ssu-nr99-tax.qza \  
  --p-rank-handles 'silva' \  
  --p-mode 'uniq' \  
  --o-dereplicated-sequences  
silva-138-ssu-nr99-seqs-derep-uniq.qza \  
  --o-dereplicated-taxa  
silva-138-ssu-nr99-tax-derep-uniq.qza
```

Construcción del clasificador

```
qiime feature-classifier extract-reads \  
  --i-sequences silva-138-ssu-nr99-seqs-derep-uniq.qza \  
  \  
  --p-f-primer GTGYCAGCMGCCGCGGTAA \  
  --p-r-primer GGACTACNVGGGTWTCTAAT \  
  --p-min-length 100 \  
  --p-max-length 250 \  
  --o-reads ref-seqs-silva.qza  
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \  
  --i-reference-reads ref-seqs-silva.qza \  
  --i-reference-taxonomy  
silva-138-ssu-nr99-tax-derep-uniq.qza \  
  --o-classifier classifier-silva.qza
```

Asignación taxonómica de las secuencias representativas

```
qiime feature-classifier classify-sklearn --i-reads  
rep-seqs.qza \  
  --i-classifier classifier-silva.qza \  
  --p-n-jobs 2 \  
  --output-dir taxa-silva
```

Exportación de la tabla de asignación taxonómica

```
qiime tools export  
  --input-path taxa-silva/classification.qza
```

Generación del gráfico de abundancias relativas

```
--output-path taxa-silva  
qiime taxa barplot  
  --i-table table.qza \  
  --i-taxonomy taxa-silva/classification.qza \  
  --m-metadata-file sample-metadata.tsv \  
  --o-visualization taxa-silva/taxa_barplot.qzv
```

Los gráficos presentados en este proyecto de investigación se diseñaron en *RStudio* a partir de los resultados obtenidos con QIIME2. Para ello, los datos de taxonomía (formato *.biom) se exportaron a una tabla (formato *.tsv), la cual contenía las asignaciones taxonómicas y su respectiva abundancia por ASV.

Anexo II: Cálculo del porcentaje de inhibición

A continuación se muestra un ejemplo del cálculo del porcentaje de inhibición empleando la ecuación (1). Siguiendo este ejemplo se calcularon todos los porcentajes obtenidos en la Tabla 7. Para el cálculo se emplearon los valores de absorbancia promedio de los controles en la curva de antibióticos y las absorbancias promedio de los pozos que contienen los extractos.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{A_{\text{POZO}} - A_{\text{BLANCO}}}{A_{\text{DMSO}} - A_{\text{BLANCO}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

(Ejemplo de datos de la Tabla 6)

Staphylococcus aureus ATCC 25913 Antibiótico: ampicilina sódica		
C (µg/mL) Antibiótico	Absorbancia promedio	
	490 nm	608 nm
Control de disolvente	1.998	2.838
Control de medio CMH	0.148	0.104

(Ejemplo de datos de la Tabla 7)

Clave extracto	C (µg/mL) extracto	490 nm		608 nm	
		Abs prom	Inhibición (%)	Abs prom	Inhibición (%)
Patógeno de prueba: Staphylococcus aureus ATCC 25913					
01004-48-19	200	0.668	71.91	0.615	81.32

A partir de los datos de ejemplo en la Tabla 6 y 7:

- El porcentaje de inhibición de la cepa *S. aureus* ATCC 25913 contra el extracto 01004-48-19 a 200 µg/mL y una longitud de onda de **490 nm** es:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{0.668 - 0.148}{1.998 - 0.148} \right) \times 100 = 71.91\%$$

- El porcentaje de inhibición de la cepa *S. aureus* ATCC 25913 contra el extracto 01004-48-19 a 200 µg/mL y una longitud de onda de **608 nm** es:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{0.615 - 0.104}{2.838 - 0.104} \right) \times 100 = 81.32\%$$