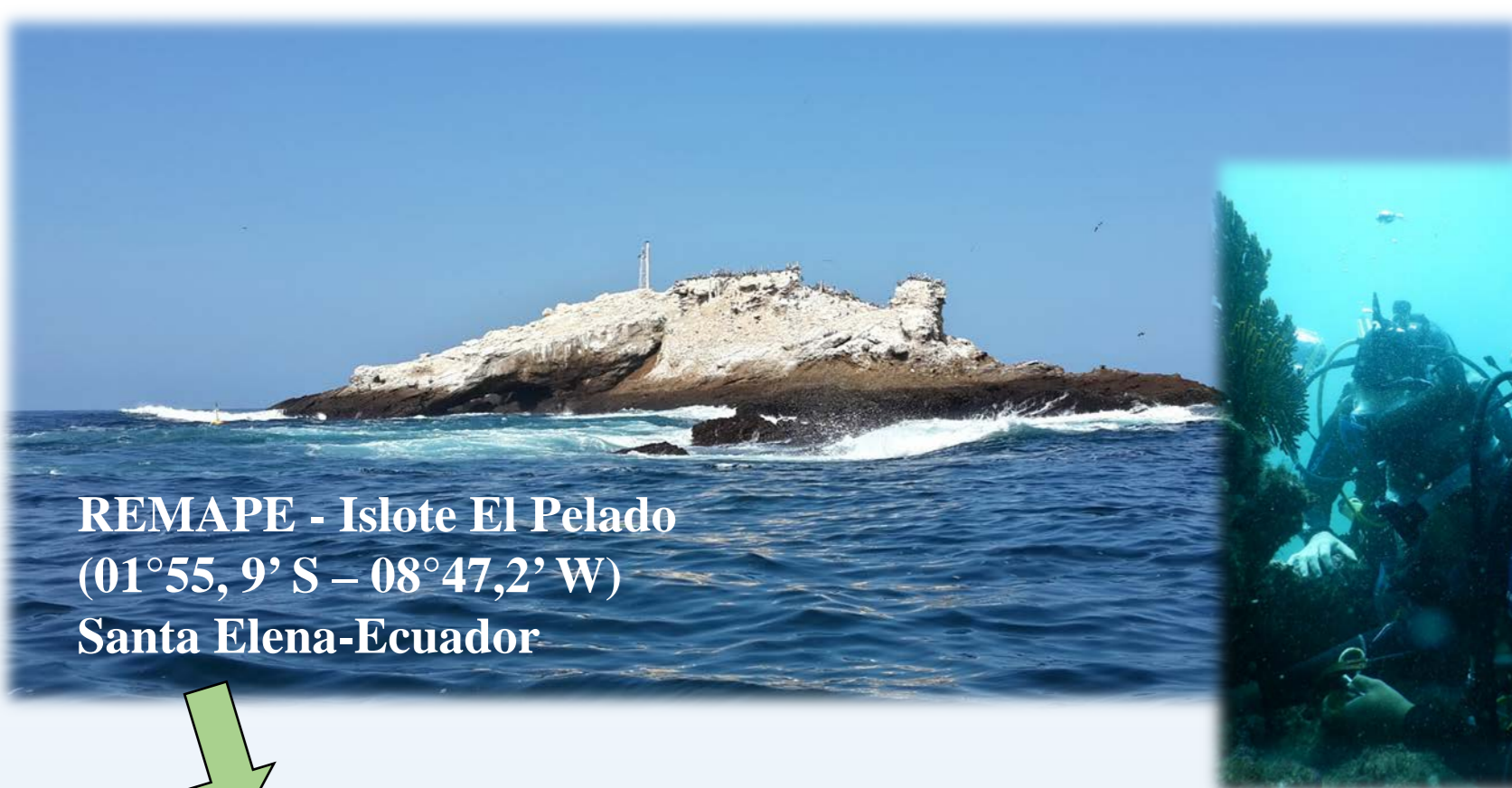


1. INTRODUCCIÓN

Las esponjas marinas constituyen una fuente rica de metabolitos bioactivos con propiedades antibacterianas, antitumorales, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias. Sin embargo, no todas estas moléculas son producidas por las esponjas, estudios recientes indican que muchos de estos metabolitos son productos de los microorganismos asociados, entre los cuales destacan cianobacterias, bacterias y microalgas. El género *Aplysina* (porifera, demospongiae) es abundante en la Reserva Marina El Pelado. Estudios exploratorios muestran la presencia de *Pseudovibrios* spp en estas esponjas. Esto indica un gran potencial para el biodescubrimiento de moléculas bioactivas contra vibrios patógenos y para el desarrollo de probióticos que mejoren la producción del camarón en Ecuador.

2. METODOLOGÍA

2.1 Colecta de Esponjas



2.2. Microbiología



Bacteria	Característica
<i>Vibrio campbellii</i>	Aislado local, asociado a mortalidades masiva de larvas de camarón.
<i>Vibrio harveyi</i>	Cepa L29, aislado local. Cepa de colección ATCC 27969, patógena al humano por consumo de especies marinas contaminadas.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa 1.	Aislado local, asociado a mortalidades masivas de larvas y juveniles de camarón.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa 2.	Aislado local, asociado a mortalidades masivas de larvas que presentaron el Síndrome de "Bolitas".
<i>Vibrio vulnificus</i>	Cepa 53, aislado local de larvas que presentaron el Síndrome de "Bolitas".

2.3. Bioactividad

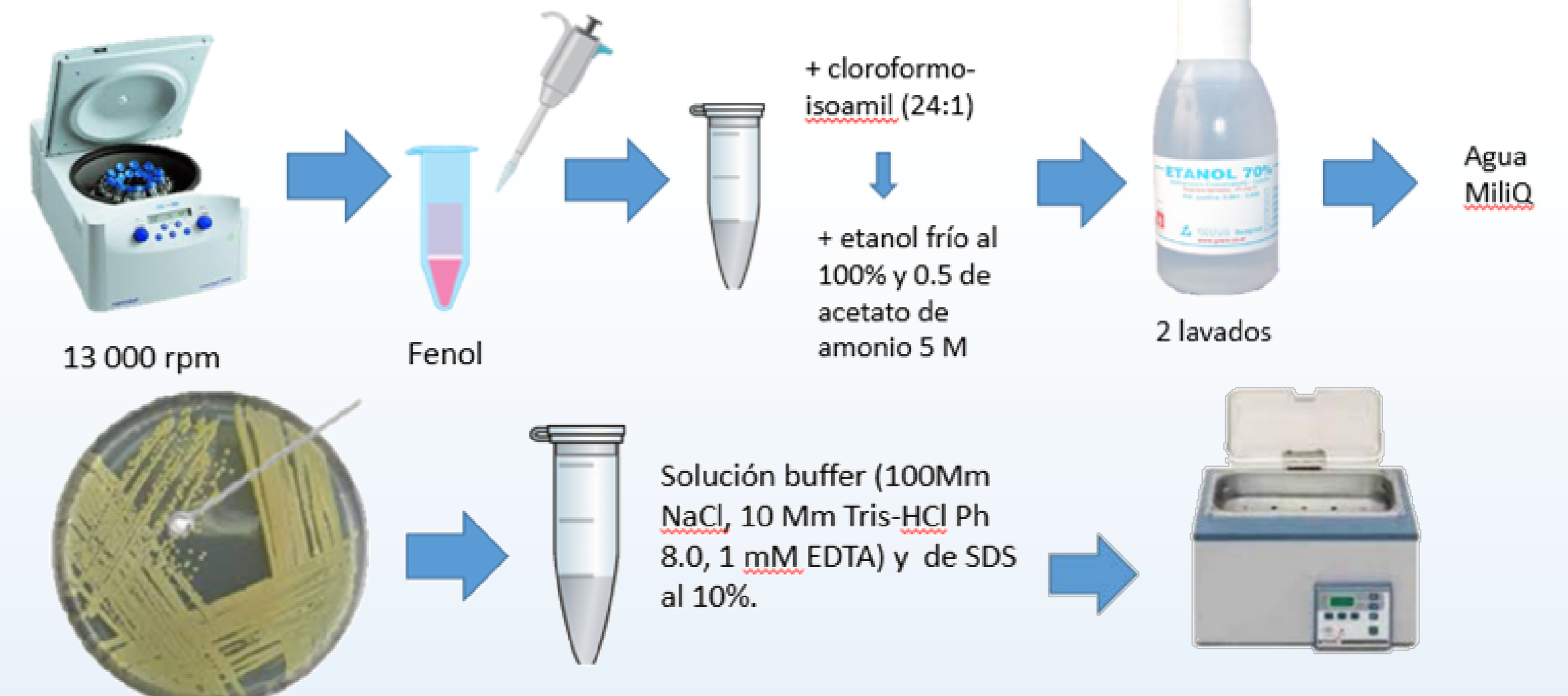
Se validó por exclusión competitiva contra cinco cepas de vibrios patógenos.

❖ Iniciadores para la identificación del dominio A de NRPS (Sintetasa de Péptidos No Ribosomales)

A3 (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3')
A7 (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')

❖ Iniciadores para la identificación molecular de bacterias, gen ADNr 16s:
27F(5'-CCGAATTCGTCGACAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
1492R(5'-CCCAGGATCAAGCTTACGGCTACTTGTGTACGACTT-3')

2.5. Extracción de ADN bacteriano: Sistemática molecular



Características evaluadas	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> Z143	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DN34T	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> type strain F423Tw
Reacción Gram	-	-	-
Forma de células	Varilla, recta o curva	Varilla, recta o curva	Varilla, recta o curva
Motilidad	+	+	+
Temperatura óptima para crecimiento	30 °C	30 °C	10-30 °C
Requisito óptimo de NaCl para crecimiento	3%	3%	3-5%
Fermentación de la glucosa	-	+	+
Producción de gas N ₂	-	+	+
Caracterización de Colonia	Circular, no luminiscente, con un margen completo, Translúcido cuando es joven y Se vuelve rojo opaco en agar marino A medida que el cultivo envejece	Circular, no luminescente, con un margen completo, translúcido	Circular, lisa y de color verde pardusco
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+	+	+
DNAasa	ND	+	+
Gelatinasa	+	+	+
Lipasa	ND	+	+
Agarosa	-	-	ND
Amylosa	ND	-	ND
Argenina dihidrolasa	-	-	+
Lisina descarboxilasa	-	-	ND
Ornitina descarboxilasa	-	-	ND
Utilización de citrato	-	-	ND
Producción de H ₂ S	-	-	ND
Ureasa	+	ND	+
Esculina hidrólisis	+	ND	+
B-Galactosidasa	+	ND	ND
B-Glucosidasa	ND	ND	+
Producción de indol	+	ND	+
Producción de acetato	-	ND	ND

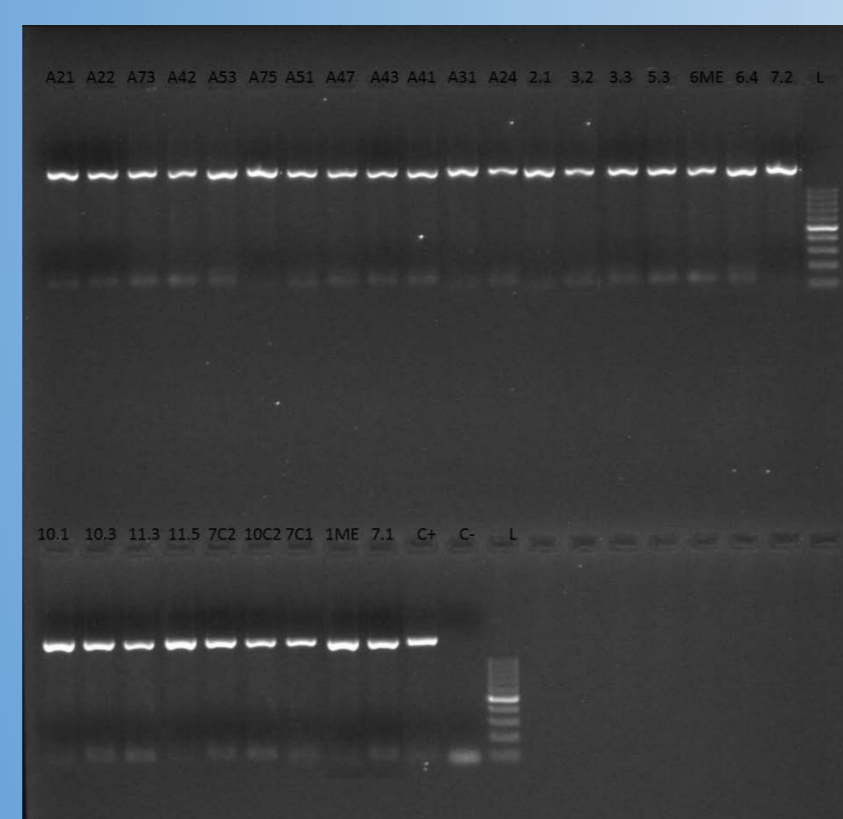
Datos de Fukunaga et al. 2006; Datas de Serán et al. 2004.

2.4. Identificación por Bioquímica Tradicional

3. RESULTADOS

Se procesaron 17 muestras de esponjas del género *Aplysina*. Se aislaron 96 cepas bacterianas, de los cuales 50 fueron *Pseudovibrios*.

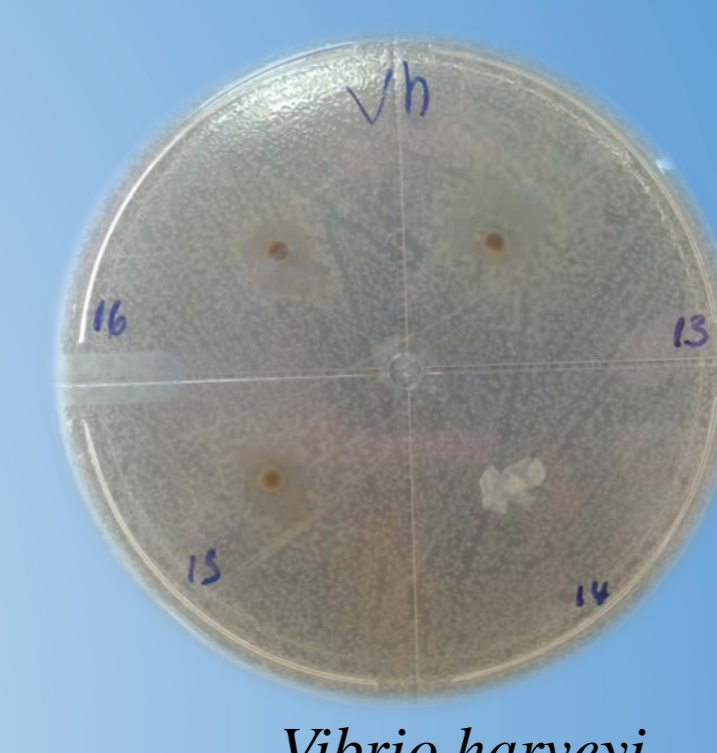
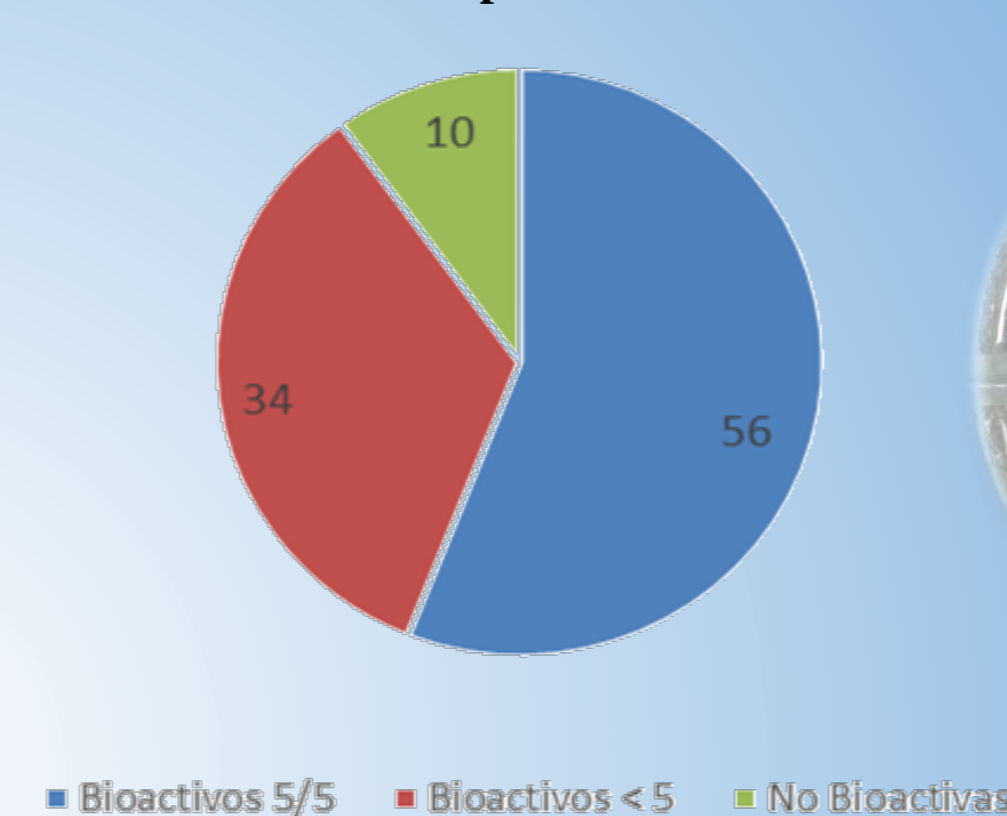
✓ Identificación Bioquímica clásica ✓ Identificación Molecular



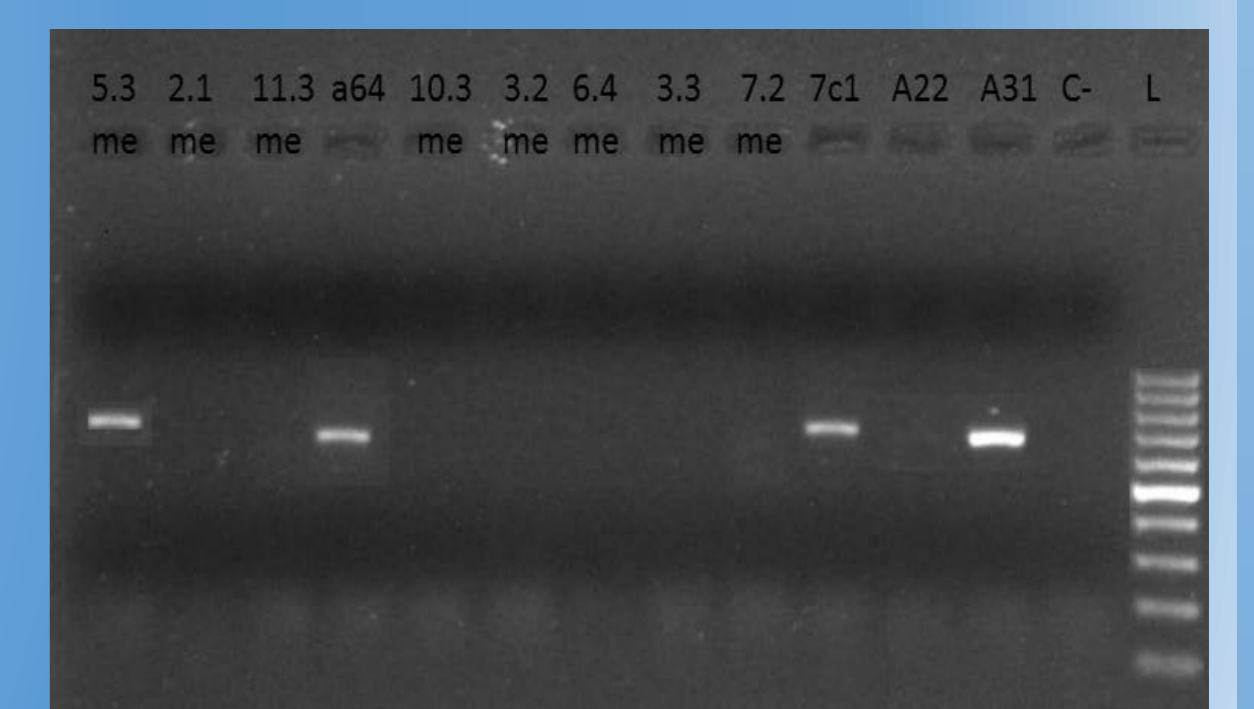
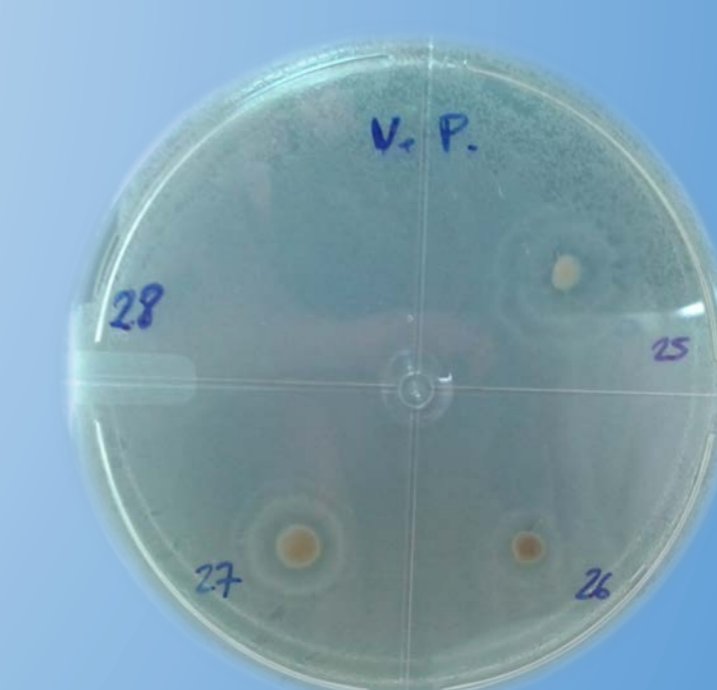
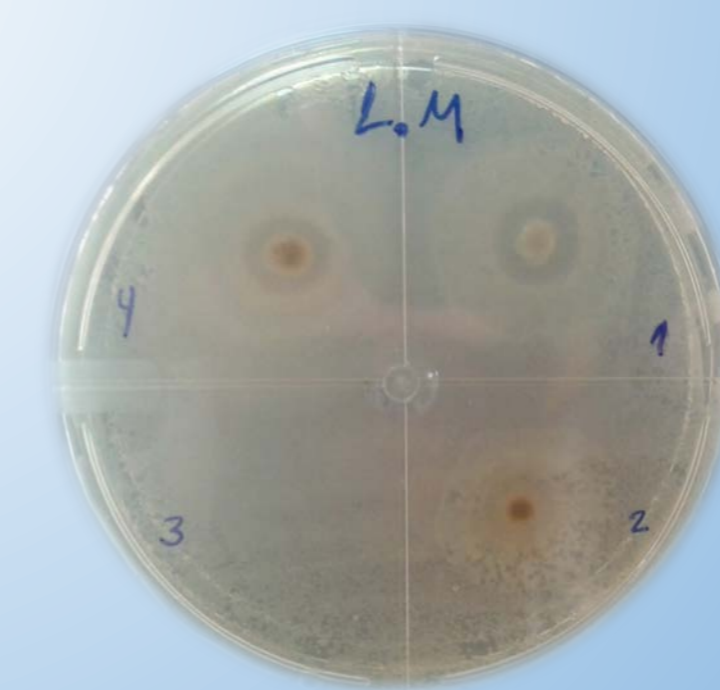
Código de acceso KX990273,1 GenBank de NCBI (*Pseudovibrio denitrificans*)

✓ De los 50 *Pseudovibrios* evaluados, 28 cepas mostraron bioactividad contra cinco bacterias patógenas de camarón. Además 17 mostraron antagonismo por lo menos contra una cepa patógena y 5 no mostraron bioactividad.

% *Pseudovibrio* Bioactivos
Contra 5 especies vibrios



✓ Cuatro aislados presentaron amplicones para el dominio A péptidos no ribosomales.



CONCLUSIONES

- Los *Pseudovibrios* mostraron bioactividad contra los vibrios patógenos.
- Por lo menos cuatro cepas de *Pseudovibrios* amplificaron para el dominio A de una sintetasa de Peptidos no ribosomales.
- Se estudiará si el antagonismo de las bacterias patógenas esta ligada a los NPRs.

REFERENCIAS

- Sertan-de Guzman, A. A., Predicala, R. Z., Bernardo, E. B., Neilan, B. A., Elardo, S. P., Mangalindan, G. C., & Concepcion, G. P. (2007). *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS microbiology letters*, 277(2), 188-196.
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., & Harayama, S. (2006). *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 343-347.

AGRADECIMIENTOS

A la SENESCYT por el soporte a esta investigación mediante los proyectos ejecutados en CENAIM (PIC-14-CENAIM-001), a los directivos del centro de Investigación (CENAIM-ESPOL) Stanislaus Sonnenholzner Ph.D, Bonny Bayot Ph.D., y de manera especial a nuestra colega Gabriela Agurto.