

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

---

**Aislamiento, identificación molecular usando el gen *ADNr 16s*  
y actividad biológica de bacterias asociadas a esponjas marinas  
de la clase *Demospongiae* de la playa Tortugas**

---

**Tesis para obtener el Título Profesional de  
Licenciado en Biotecnología**

**Autores:**

**Bach. Chauca Astete, Brenda Ketsire  
Bach. Vasquez Cunya, Francisco Alvaro**

**Asesor:**

**Blga. Zelada Mazmela, Eliana Victoria Dr.**

**Co - Asesor:**

**Blgo. Flores Reyes, Eduardo Lorenzo M.Sc. (e)**

**Nuvo Chimbote - Perú  
2022**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**REVISADO Y Vº Bº DE:**

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Eliana', is written over a horizontal line.

**BLGA. ELIANA VICTORIA ZELADA MAZMELA Dr.  
ASESOR**

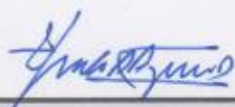
**DNI: 17842746**

**ID ORCID: 000-0002-5813-0954**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**REVISADO Y Vº Bº DE:**



**Blgo. Mblgo. Carlos Alberto Azañero Díaz Dr.**  
**PRESIDENTE**

**DNI: 18093785**  
**ID ORCID: 0000-0002-5612-4104**



**Blga. Eliana Victoria Zelada Mazmela Dr.**  
**INTEGRANTE - ASESOR**

**DNI: 17842746**  
**ID ORCID:0000-0002-5813-0954**



**Blgo. Mblgo. Eterio Alva Muñoz M. Sc.**  
**SECRETARIO**

**DNI: 32406295**  
**ID ORCID: 0000-0002-4113-7981**

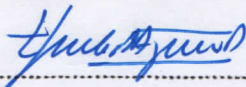
## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

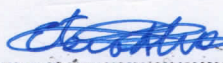
En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Aula 04 - Escuela Posgrado Universidad Nacional de Santa, siendo las 12:00 horas del día Viernes 08 de Julio del 2022, dando cumplimiento a la Resolución N° 267-2022-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Carlos Azanero Diaz, teniendo como miembros a Mg. Eteño Alva Muñoz (secretario) (a), y Dra. Eliana Zelada Maízmele (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licenciado en Biotecnología, realizado por el, (la), (los) tesista (as) Brenda Ketsire Chauca Artete (Cod. 0201223006) y Francisco Alvaro Vasquez Cunya (Cod. 0201123042) quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: "Aislamiento, identificación molecular usando el Gen ADNr 16 y actividad biológica de bacterias asociadas a la esponja marina de la clase Demospongiae de la playa Tortugas"

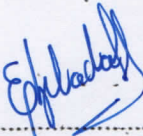
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como SOBRESALIENTE asignándole un calificativo de DIECINUEVE (19) puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU-R-UNS)

Siendo las 14:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

  
Nombre: Carlos Azanero Diaz  
Presidente

  
Nombre: Eteño Alva Muñoz  
Secretario

  
Nombre: Eliana Zelada Maízmele  
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesis (02) y archivo (02).



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR USANDO EL  
GEN *ADNR 16S* Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIAS  
ASOCIADAS A ESPONJAS MARINAS DE LA CLASE  
*DEMOSPONGIAE* DE LA PLAYA TORTUGAS**

*En memoria...*



*María Florelinda Cunya Yangua*



*Juan Humberto Astete Donaire*

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**Tesis para obtener el Título de Licenciado en Biotecnología**

**Aislamiento, identificación molecular usando el gen *ADNr 16s*  
y actividad biológica de bacterias asociadas a esponjas marinas  
de la clase *Demospongiae* de la playa Tortugas**

**AUTOR (es):**

**Br. CHAUCA ASTETE, BRENDA KETSIRE**

**Br. VASQUEZ CUNYA, FRANCISCO ALVARO**

**ASESOR:**

**Blga. ELIANA VICTORIA ZELADA MAZMELA Dr.**

**CO-ASESOR:**

**Blgo. EDUARDO LORENZO FLORES REYES M.Sc. (c)**

**Nuevo Chimbote, Perú**

**2022**

*“Somos como islas en el mar, separadas en la  
superficie, pero conectadas en lo profundo”*

*W. James*



## DEDICATORIA

♥ A quién esperó con ansias mi graduación,  
Pero que el destino no nos permitió celebrar juntos  
En memoria de mi abuelito, mi ángel Juan Astete.

♥ Si he podido afrontar cada prueba que la vida me ha dado,  
Ha sido por y gracias a ustedes, mi sonrisa diaria  
Papá, mamá y hermanito.  
Cada estrella en el firmamento, es para ustedes.

*Br. Brenda Ketsiré Chauca Astete*

- A ti amada mamita, que siempre luchaste para que alcancemos el sueño de tener una carrera profesional y aunque ya no te encuentres con nosotros, sé que desde el cielo estarás orgullosa de este logro.

- A mi padre y hermano, con quienes continuo en esta lucha diaria para salir adelante y quienes son el motor que me impulsa a seguir creciendo como persona y profesional.

*Br. Francisco Alvaro Vásquez Cunya*

## AGRADECIMIENTOS

De cada experiencia, hay un aprendizaje, ya sea para bien o para mal. Y ¿Qué es aquéello que nunca vamos a olvidar? Los momentos compartidos con nuestra maestra Eliana Zelada Mazmela, quién desde que nos abrió las puertas del Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción, nunca nos dejó caer, siempre mantuvo en nosotros la esperanza de que algo mejor estaba por llegar, a nunca rendirnos y que todo es posible con esfuerzo y dedicación. Gracias maestra por cada día que nos dedicó, gracias por su infinita paciencia y múltiples enseñanzas, llevamos en nosotros el sello de haber tenido el gran placer de haber formado parte de su equipo, ha sido, es y siempre será un gran ejemplo a seguir en nuestro futuro tanto personal como profesional.

Agradecer también al Blgo. Eduardo Reyes (Lalo), quién fue un gran maestro desde mi inicio como practicante en el LGFyR, gracias por toda la preparación que me brindó desde el primer día, por la paciencia y el sentido de humor que mantiene en el laboratorio haciendo que, trabajar con ustedes sea didáctico y motivador.

Al Dr. Esteban Horna, quien nos apoyó con la idea base del proyecto presente, aunque las visitas fueron cortas, el tiempo compartido fue suficiente para nosotros. Así también, a muchos docentes que de alguna forma contribuyeron al desarrollo y ejecución del proyecto presente ya sea de manera académica o por su constante incentivo para continuar con el proyecto propuesto, entre ellos quisiera destacar al Dr. Walter Reyes, eternamente agradecida.

Y cómo no estar agradecida con mis amistades que hicieron que el tiempo universitario sea divertido y lleno de bonitos recuerdos, por haber mantenido siempre la emoción de aprender un poco más cada día, por haber hecho que cada día sea un poco más simple. Tany, Yurico, Elida, Noemi, Mariños, Mafer y muchos más.

A los chicos del LGFyR, especialmente a Julissa Sánchez quien tuvo plena confianza en mí, gracias por los momentos compartidos y las enseñanzas brindadas, ella es esa persona a quién siempre recordaré con mucho cariño por su espíritu acogedor, gracias por tanto Juli. A Erick Cruz, por la chispa y buen humor que siempre contagia, porque no hay día triste si estamos con él y Pancho.

A Francisco, Pancho, mi compañero de tesis, sabía que llegaría este día y no tendría palabras para describir lo agradecida que estoy por todo este tiempo trabajando juntos, además de la tesis, en entorno laboral y amical. Año tras año, nos mantuvimos como un

equipo, compartiendo casa, comida, penas, alegrías y aventuras. Llegaste a ser parte de mi familia y sé que mis padres también están agradecidos por haber cuidado de mí, mil gracias amigo.

A mi familia entera, tíos, primos y abuelos, por estar siempre pendientes de mí, por sus buenos deseos y acompañarme en cada paso que he dado. Especialmente a mi abuelito Juan Astete, a quién me hubiera encantado tener en estos días conmigo porque al igual que yo, él también soñaba con verme graduada. El tiempo nos dio una mala jugada y aunque ya no esté más con nosotros, continúo agradecida y dedicándole cada uno de mis logros donde sea que esté, él guía mi camino.

He dejado más importante para el final porque sabía que, al escribir para ellos, se me empañaría la vista: Mis padres y hermano. Mis padres siempre fueron mi mayor motivación para direccionar mi camino por la ciencia, ver a mi papá usando un guardapolvo y trabajando con la pasión con que lo hace, hizo que mi yo de seis años quiera ser como él algún día. Y aquí estoy, cumpliendo el sueño de mi infancia, gracias papá, mamá, hermanito por acompañarme a cada muestreo, por hacerme reír en momentos difíciles, por confiar en cada paso que di y apoyar cada decisión que tomé, gracias porque hasta hoy en día, si vamos a alguna playa, buscan esponjas conmigo. Porque saben de mis caídas y nunca me dejaron sola, siempre he creído que tenemos una conexión especial que, pese a la distancia, hemos sabido mantenernos unidos, es por ellos que este logro no es sólo mío, es por y para ustedes, para no olvidar nunca que primero está la familia, que soy lo que soy gracias a ustedes, los amo infinitamente.

*Br. Brenda Kelsiré Chauca Astete*

Para escribir cada línea del siguiente texto, considero que he tomado el tiempo necesario para recordar todas aquellas personas quienes han contribuido a que este proyecto se haga realidad, y es que en este largo camino he aprendido de personas que realmente me han enseñado cosas de mucho valor. Empiezo por quien considero mi maestra del mundo científico y de vida, profesora Eliana Zelada, quien desde un inicio me abrió las puertas del laboratorio que lidera y del cual aprendí todo aquello que ahora conozco en lo referente a la biología molecular. Como olvidar, los sabios consejos que nos brindaba, ya sea para motivarnos a continuar con este lindo camino de la investigación o también para corregir algunas cualidades erradas que en ese momento podíamos cometer.

A Eduardo Reyes, a quien también conocemos como Lalo, un gran profesional y amigo que tuvo la paciencia de enseñarnos la mejor manera de trabajar dentro del laboratorio y con quien no faltaba las risas por alguna ocurrencia por parte de alguno de los integrantes de laboratorio.

A cada uno de los integrantes de LGFyR: Profesora Carmen, Juli, Joel, Sissy, Claudia, Irina, Rosmery, Luis Enrique, Erick y Brenda con quienes formamos un gran grupo de trabajo lleno de mucha responsabilidad y a la vez de diversión. En este punto quiero resaltar lo grandioso que fue compartir tantos momentos con ustedes y con quienes espero algún día volver a compartir un ambiente científico.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos y colegas, Tany, Cesar, Tirado, Mariños, Luchito, Giancarlos, Inchaustegui, Mayte y Fernanda quienes me brindaron su amistad sincera y me brindaban los ánimos para no rendirme en este camino de vida, les agradezco su amistad sincera y espero seguir contando con ustedes para lo que se venga.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a toda mi familia, empezando por mi hermano Jhean, mi papá Fidencio y mi mamita hermosa Flora que siempre confiaron en mí y a quienes les debo todo. A mis tías y tíos que siempre tenían una palabra de aliento para mí y que en esta oportunidad puedo agradecerles. A Rina, Mary, Ilich, Jorge a quienes considero como mi familia adoptiva porque siempre se muestran pendientes de nosotros. Y no me he olvidado de ti Ale, gracias por estar conmigo en los momentos más difíciles de estos últimos meses, siempre te voy recordar por el gran soporte que vienes siendo para mí. Gracias a todos, por tanto.

*Dr. Francisco Alvaro Vásquez Cunya*

## RESUMEN

En el presente trabajo se lograron aislar, purificar e identificar molecularmente mediante *ADNr 16S* un total de 21 cultivos bacterianos aislados a partir de la esponja de la clase *Demospongiae* colectada en balneario Tortugas divididas en dos filos bacterianos dominantes: Proteobacterias y Firmicutes. Dentro de los Firmicutes, se identificaron bacterias del género *Bacillus*, conocidas por su capacidad para la producción de Surfactina, un compuesto potencial biotecnológicamente como antimicrobiano. Asimismo, se identificó la presencia del gen *SrfA* necesario para la producción de surfactina en *Bacillus* y *Vibrio*. Para conocer la actividad biológica de los cultivos que resultaron positivos a la presencia del gen antes mencionado, se confrontaron a dos patógenos para el hombre: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, frente a las cuales sólo dos cultivos mostraron actividad biológica.

Consideramos que el trabajo realizado contribuirá al conocimiento básico de esponjas y sus simbioses en nuestra región ya que no se ha tomado interés necesario para la exploración de esta área, generando así, un antecedente que permita la continuación de nuevos proyectos en la búsqueda de compuestos de interés farmacéutico.

**Palabras claves:** Esponjas marinas, compuestos bioactivos, surfactina, simbiosis, Biotecnología.

## ABSTRACT

In the present work, it was possible to isolate, purify and molecularly identify a total of 21 bacterial cultures isolated from the Demospongiae-type sponge collected in Balneario Tortugas, divided into two dominant bacterial phyla: Proteobacteria and Firmicutes, by means of 16S rDNA. Within the Firmicutes, bacteria of the *Bacillus* genus were identified, known for their ability to produce Surfactin, a potential biotechnologically antimicrobial compound. Likewise, the presence of the *SrfA* gene necessary for the production of surfactin in *Bacillus* and *Vibrio* was identified. In order to know the biological activity of the cultures that were positive for the presence of the aforementioned gene, two pathogens for man were confronted: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, against which only two cultures showed biological activity.

We consider that the work carried out will contribute to the basic knowledge of sponges and their symbionts in our region since the necessary interest has not been taken for the exploration of this area, thus generating a precedent by way of continuing related studies that would enrich the advance and development of the area, promoting new projects in the search for compounds of pharmaceutical interest.

**Keywords:** Marine sponges, bioactive compounds, symbiotic bacteria, Biotechnology.

## INDICE

DEDICATORIA .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INDICE.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN .....	21
1.1 ANTECEDENTES.....	22
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	24
1.3 OBJETIVOS .....	25
1.3.1 Objetivo general.....	25
1.3.2 Objetivos específicos .....	25
1.4 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS .....	26
1.5 JUSTIFICACIÓN .....	26
1.6 LIMITACIONES DEL TRABAJO.....	27
II. MARCO TEÓRICO .....	27
2.1 Esponjas marinas.....	27
2.1 Microorganismos simbióticos .....	30
2.2 Producción de compuestos activos.....	32
2.2.1 Biosurfactantes .....	34
2.3 Clasificación bacteriana .....	36
2.3.1 Género <i>Bacillus</i> .....	39
2.4 Coloración diferencial – tinción Gram.....	40
2.5 Análisis molecular.....	41
2.5.1 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR).....	41
2.5.2 <i>ADNr 16S</i> .....	42

2.5.3	Secuenciamiento.....	43
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1	Área de estudio y colecta de material biológico.....	45
3.2	Identificación morfológica de la esponja marina colectada en Balneario tortugas – Casma.....	47
3.3	Obtención de cultivos puros de microorganismos asociadas a la esponja marina de la clase <i>Demospongiae</i> colectada en Balneario tortugas - Casma.....	47
3.4	Identificación molecular mediante secuenciamiento 16S de bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase <i>Demospongiae</i> del Balneario Tortugas - Casma .....	48
3.4.1	Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del gen <i>16S ADNr</i> de cultivos bacterianos puros aislados a partir de esponjas marinas de clase <i>Demospongiae</i> colectada en Balneario tortugas – Casma.....	48
3.4.2	Análisis de datos y comparación de secuencias .....	49
3.4.3	Elaboración de árboles filogenéticos.....	50
3.5	Determinación por PCR convencional la presencia del gen <i>SrfA</i> necesario para la producción de <i>Surfactina</i> en bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase <i>Demospongiae</i> del Balneario Tortugas – Casma .....	50
3.5.1	Identificación del gen <i>SrfA</i> en bacterias asociadas a esponjas marinas de clase <i>Demospongiae</i> .....	50
3.6	Ensayo de antagonismo de cepas aisladas a partir de esponjas marinas de clase <i>Demospongiae</i> del Balneario Tortugas - Casma, frente a cepas patógenas para el humano.....	51
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1	Resultados.....	52
4.1.1	Características de la muestra biológica .....	52
4.2	Identificación morfológica de la esponja colectada .....	52
4.3	Obtención de cultivos puros de microorganismos asociadas a la esponja marina de la clase <i>Demospongiae</i> colectada en Balneario tortugas - Casma.....	53
4.4	Identificación molecular de bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase <i>Demospongiae</i> mediante secuenciamiento <i>16S ADNr</i> .....	56



4.4.1	Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del gen <i>16S ADNr</i> de cultivos bacterianos puros aislados a partir de esponjas marinas de clase <i>Demospongiae</i> .....	56
4.4.2	Análisis de datos y comparación de secuencias .....	59
4.4.3	Elaboración de árboles filogenéticos .....	61
4.5	Determinación por PCR convencional la presencia del gen <i>SrfA</i> necesarios para la producción de surfactina en bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase <i>Demospongiae</i> del Balneario Tortugas – Casma .....	62
4.6	Ensayo de antagonismo de cultivos aisladas a partir de esponjas marinas de clase <i>Demospongiae</i> del Balneario Tortugas - Casma, frente a cepas patógenas para el humano.....	63
4.7	Discusión.....	64
V.	CONCLUSIONES.....	70
VI.	RECOMENDACIONES .....	70
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
VIII.	ANEXOS .....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos asociados a esponjas y compuestos activos reportados. Tomado y complementado de Águila <i>et al.</i> (2012). .....	33
<b>Tabla 2.</b> Tabla de secuencias de primers para la identificación de bacterias.....	49
<b>Tabla 3.</b> Tabla de secuencias de primers para determinar la presencia del gen <i>SrfA</i> .....	50
<b>Tabla 4.</b> Descripción e identificación morfológica de cultivos bacterianas aisladas a partir de la esponja marina de la clase Demospongiae.....	54
<b>Tabla 5.</b> Clasificación taxonómica de bacterias identificadas mediante gen 16S, asociadas a esponjas marinas colectadas en el Balneario Tortugas – Casma. ....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la morfología general de una esponja marina. Fuente: Online Art. Encyclopedia Britannica Online. ....	30
<b>Figura 2.</b> La línea de ensamblaje biosintético de surfactina.....	35
<b>Figura 3.</b> Morfología bacteriana. Imagen tomada de Dewey University: curso de microbiología.....	36
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético y relaciones metabólicas de algunos géneros destacados de Proteobacteria. Imagen tomada de Madigan <i>et al.</i> , 2015. ....	37
<b>Figura 5.</b> Principales órdenes de bacterias grampositivas y bacterias relacionadas de los filos Actinobacteria, Tenericutes y Firmicutes. Imagen tomada de Madigan <i>et al.</i> , 2015. ....	38
<b>Figura 6.</b> Principales órdenes de Bacteroidetes. Imagen tomada de Madigan <i>et al.</i> , 2015. ....	40
<b>Figura 7.</b> Estructura de la envoltura de un microorganismo grampositivo y gramnegativo. ....	41
<b>Figura 8.</b> Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. Imagen tomada de Rodicio & Mendoza, 2004. ....	43
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la primera versión del método de Sanger.....	44
<b>Figura 10.</b> Mapa geográfico del Perú, en rojo se señala la zona de colecta de esponjas marinas. Balneario Tortugas – Casma, provincia de Casma, Departamento de Áncash Lat. 9°21'34'S Y Long. 78°25'32'W, la imagen pequeña indica el punto de colecta situado cerca a la playa San Germán – Tortugas. ....	46
<b>Figura 11.</b> Esponja de la clase Demospongiae colectada en el Balneario Tortugas – Casma. A la izquierda se observa la esponja colectada en Balneario Tortugas. Fotografía tomada minutos posteriores a la colecta. A la derecha se evidencia la decoloración de la esponja luego de su conservación en alcohol al 96% .....	52
<b>Figura 12.</b> Lámina de esqueleto de la esponja colectada observada al microscopio, se observan actinas monoaxónicas características de las Clase Demospongiae.....	53
<b>Figura 13.</b> Coloración Gram de las 21 cultivos bacterianas aisladas y purificadas a partir de la esponja marina de clase Demospongiae: a. C1a1, b. B1, c. F2, d. A3, e. Lb2, f. C2a2, g. D1, h. C4a, i. C2, j. O2, k. D3, l. E2, m. E3, n. C2c1, o. C2d1, p. Lb1, q. A4, r. T1, s. O3, t. T2, u. O4.....	55

**Figura 14.** Gel de agarosa al 1% para visualización de la integridad de ADN de bacterias asociadas a esponjas marinas del Balneario Tortugas – Casma, se empleó un marcador molecular (L) de 1000pb. Se visualizan bandas definidas, ADN íntegro y de alto peso molecular ..... 56

**Figura 15.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16s ADNr para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en Balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. C2a1(*Vibrio alginolyticus*), 2. C2c1 (*Paenibacillus azoreducens*), 3. C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), 4. C4a (*Vibrio crassostreae*), 5. Lb1 (*Bacillus rugosus*), 6. C2a5 (No identificada), 7. A4 (*Bacillus zhangzhouensis*), 8. B1. (*Vibrio sp.*), 9. Blanco negativo..... 57

**Figura 16.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16s ADNr para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en Balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. C2 (*Vibrio fluvialis*), 2. D1 (No identificada), 3. F2 (*Vibrio alginolyticus*), 4. D1 (*Vibrio sp.*), 5. D2 (-), 6. D3 (*Vibrio fluvialis*), 7. E3 (*Vibrio harveyi*), 8. T1 (*Bacillus zhangzhouensis*), 9. O2 (*Oceanobacillus picturae*), 10. Blanco negativo. ....58

**Figura 17.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16s ADNr para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en Balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. A3 (*Vibrio alginolyticus*), 2. Lb2 (*Vibrio harveyi*), 3. C2a2 (*Vibrio sp.*), 4. E2 (*Vibrio sp.*), 5. E3 (*Vibrio harveyi*), 6. O3 (*Bacillus zhangzhouensis*), 7. T2 (*Bacillus zhangzhouensis*), 8. O4 (*Bacillus altitudinis*), 9. Blanco negativo. .... 58

**Figura 18.** Distribución porcentual de la diversidad microbiana según especie presente en la esponja colectada en Balneario Tortugas – Casma..... 61

**Figura 19.** Árbol filogenético de las 21 bacterias aisladas de la esponja colectada en Balneario Tortugas – Casma. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining con un bootstrap inferido a partir de 1000 réplicas. Los microorganismos que se encuentran en cuadros rojos son secuencias descargadas de NCBI como un outgroup y mejorar la visualización del árbol filogenético..... 61

**Figura 20.** Gel de agararosa al 1% para visualización de productos de PCR de 200 pb del gen *stfA* en bacterias asociadas a esponjas marinas de Balneario Tortugas. Se señala

carril L para marcador molecular de 1000pb, seguido de los carriles (1 – 9) correspondientes a las muestras de ADN genómico codificadas de la siguiente manera: 1. Lb2 (*Vibrio harveyi*.) 2. C2c1 (*Paenibacillus azoreducens*), 3. C2a5 (Cepa no identificada), 4. C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), 5. C4a (*Vibrio crassostreae*). .....62

## I. INTRODUCCIÓN

Los océanos abarcan alrededor del 70% de la totalidad de la superficie terrestre, son responsables de que la vida en la tierra sea posible, reguladores de su clima y fuente indispensable de proteínas para la nutrición humana. Alberga una inmensa fauna, dentro de la cual se encuentran los invertebrados que representan el 65% del total de organismos registrados, y en donde destacan las esponjas como la fuente más productiva de nuevos compuestos activos, hecho que se atribuye a que casi el 90% de la biomasa de estos poríferos corresponde a su microflora bacteriana simbiote responsable de su producción, lo que las convierte en el grupo marino más importante para el desarrollo de la biotecnología (Hardoim *et al.*, 2009; Van Soest & Braekman, 1999; Hu *et al.*, 2015).

Las asociaciones simbióticas entre las esponjas y su flora bacteriana, permite que se desarrollen mecanismos de defensa química, pues al estar la flora bacteriana constituida por bacterias heterótrofas, cianobacterias, anaerobios facultativos, algas unicelulares y *Archaea*, sintetizan y liberan diversos metabolitos (Wilderman, 2012; Wilkesman, 2007).

Gracias al uso de herramientas moleculares como el gen *16S ADNr* se ha podido establecer e identificar la relación filogenética de comunidades microbianas que colonizan las esponjas (Fieseler *et al.*, 2004). En base a estos análisis, han sido reportados más de 25 filos bacterianos en asociación con esponjas marinas (Webster & Taylor, 2012) entre ellos: Cianobacterias, Chloroflexi, Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, y "Poribacteria" (Hardoim *et al.*, 2009).

El descubrimiento del gran potencial que guardan los océanos y sus organismos, ha permitido el desarrollo de la Biotecnología marina que se ha convertido en un campo prometedor de sustancias bioactivas y principal pilar de la bioeconomía enfocándose principalmente en las siguientes áreas:

- *Productos activos*, mediante la identificación y estudio de sustancias naturales marinas como base de nuevos productos útiles a la sociedad en diferentes sectores como farmacéutico y alimentario
- *Biorremediación*, desarrollando técnicas sustentadas en microorganismos y vegetales para la conservación y limpieza de áreas sujetas a contaminación siendo técnicas eficientes y compatibles con los ecosistemas acuáticos

- *Procesos microbiológicos marinos*, basado en la comprensión de la fisiología, genética y ecología de los microorganismos marinos no solo para entender los complejos ecosistemas marinos, sino también para establecer sistemas para el desarrollo de procesos de fermentación que permitan la elaboración de productos microbianos útiles a la sociedad (Sunshine, 2012; Rotter *et al.*, 2021).

La biotecnología marina brinda una amplia gama de oportunidades de interés comercial para la industria farmacéutica; muchos de los medicamentos de origen marino que pasan a ensayos clínicos conllevan a un aumento de patentes publicadas, manteniendo el interés de continuar el desarrollo de este campo de investigación (Shinde *et al.*, 2019).

En este sentido, el estudio de bacterias simbiotes de esponjas marinas del balneario Tortugas y su potencial biotecnológico, permite contribuir con la escasa información que se tiene en el tema en nuestro país, enfocando el estudio a la identificación de la presencia del gen *SrfA-A*, en bacterias simbiotes, necesario para producción de la Surfactina, un compuesto biotecnológicamente interesante empleado en diversas industrias.

## 1.1 ANTECEDENTES

La Biotecnología marina y la exploración de ambientes acuáticos en búsqueda de compuestos activos comenzó alrededor de los años 50, con el primer proyecto netamente del área, basado en la extracción de una toxina denominada Holoturina encontrada en los túbulos cuvierianos del pepino de mar de las Bahamas, con actividad antitumoral en ratones y pese a que nunca se comercializó, impulsó la búsqueda de otros fármacos en organismos marinos (Nigrelli *et al.*, 1967).

Es así que el descubrimiento de metabolitos secundarios a partir de esponjas marinas en el siglo XX, dio inicio a un nuevo campo en la industria farmacéutica (Schippers *et al.*, 2012), surgiendo mayor interés tras el descubrimiento de los nucleósidos espongotimidina y esponguridina presentes en la esponja marina *Cryptotethia crypta* (Bergmann & Feeney, 1950-1951), y que fueron la base para la síntesis del fármaco antiviral Citarabina, el primer agente anticancerígeno de origen marino empleado actualmente en el tratamiento de leucemia y linfoma (Schwartsmann, 2000) y del fármaco antiviral Vidarabina (Proksch *et al.*, 2002).

Con la continuidad de las investigaciones, Brusca & Brusca (2003) encontraron que la especie *Luffariella variabilis*, es productora de un compuesto terpenoide llamado Manoalida con potente actividad antibacteriana, además de ser analgésico y anti-

inflamatorio. En un estudio, Hirata y Uemura (1986) lograron aislar compuestos activos a partir de extractos de la esponja marina *Halichondriaokadai* destacando entre ellos la Halicondria B., compuesto que es conocido también como Halaven y es un potente antitumoral muy efectivo para el tratamiento de cáncer de mama (Cortes, 2011).

En los últimos años, muchos compuestos bioactivos han sido separados a partir de miembros del filo porífera; y que contrariamente a lo que se consideraba, diversos estudios afirman que estos compuestos no derivan netamente de las esponjas, sino de la biota asociada a ellas (Karuppiah & Li, 2015). El interés de la biota asociada a las esponjas marinas se inició con el trabajo de Althoff *et al.* (1998) que sugirieron una relación de simbiosis específica de las esponjas *Halichondria panicea* con el dominante filo proteobacteria y su género *Rhodobacter*, resaltando que, a pesar de que se tomaron muestras de diferentes localizaciones, este género fue concurrente en los análisis por *ARNr 16S*. Parera -Valadez (2012) refuerza lo anterior, analizando muestras de la esponja *Halichondria panicea* y evidenciando la presencia dominante de bacterias pertenecientes al género *Rhodobacter*.

La búsqueda de compuesto con actividad antibiótica, ha conducido al aislamiento de bacterias que producen compuestos bioactivos como en el trabajo de Kim *et al.* (2006) en el que, mediante el análisis de la actinobacteria *Salinispora* derivada de una esponja marina, demostraron la capacidad de éstas para producir rifamicina B y rifamicinaSV, constituyendo una fuente potencial de antibióticos y otros compuestos biofarmacéuticamente activos en la clase de la rifamicina y representando la primera fuente de registrada de rifamicinas de bacterias marinas.

Sin embargo, no sólo las bacterias aisladas de esponjas han tomado importancia en esta línea de investigación. Höller *et al.* (2000) reportaron 681 cepas de hongos aislados a partir de 16 especies de esponjas a nivel mundial, los que en su mayoría fueron géneros de hábitats terrestres como *Aspergillus* y *Penicillium* y que curiosamente mostraron potencial biotecnológico. Por otro lado, Maldonado (2005) mediante estudios microscópicos de tejido esponjoso adulto y de estructuras reproductivas de la esponja, sustenta la simbiosis con una levadura del género *Chondrilla*. Vacelet & Gallisian (1980) observaron partículas similares a virus en núcleos celulares de la esponja *Aplysina cavernicola*.

Para proporcionar una comprensión de la riqueza de las comunidades microbianas asociadas a las esponjas, los métodos tradicionales se basan en el crecimiento de cultivo



puro del microorganismo y la combinación de métodos de tinción, reacciones bioquímicas y otras pruebas. Sin embargo, estos métodos no revelan una imagen precisa de su verdadera relación taxonómica o evolutiva, para lo que, los enfoques moleculares han jugado un papel importante en la resolución de estos problemas (Dale & Park, 2004), permitiendo que se conozca más de algunas bacterias que de cualquier otro organismo en la tierra (Snyder & Champness, 2003).

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

El incremento en los últimos años de la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser utilizados con fines farmacológicos ha significado que el inmenso y diverso ambiente marino surja como una fuente importante para suplir las necesidades en este ámbito. Las esponjas marinas se presentan entonces como potenciales organismos, puesto que su constante exposición a depredadores promueve que sus microorganismos simbiotes brinden protección secretando diversos compuestos bioactivos, los que pueden contrarrestar la creciente resistencia adquirida a fármacos tradicionales por los diferentes agentes patógenos (Parera-Valadez, 2012).

En Perú, pese a que posee gran variedad de esponjas marinas, no se le ha prestado la atención debida para aprovechar sus beneficios, minorizando el potencial que poseen y las posibles contribuciones que facilitaría conocer la diversidad de microorganismos y su fuente de compuestos naturales bioactivos. Por las razones expuestas, el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas, debe ser un campo que no cese en investigación, ya que son la base del descubrimiento de diversos compuestos activos importantes en el desarrollo de diversas industrias.

Así es como, motivados por explorar, conocer, demostrar e incrementar el interés en el área, nos planteamos la siguiente interrogante ¿Qué bacterias se pueden aislar e identificar en la esponja marina de la clase *Demospongiae* colectada en el balneario Tortugas, Casma?

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo general

- Identificar por secuenciamiento del gen *16S ADNr*, a bacterias asociadas a esponjas marinas del balneario Tortugas – Casma.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente la clase de esponja marina colectada en el balneario Tortugas – Casma.
- Determinar mediante cultivo puro bacterias simbiotes de la esponja marina colectada en el balneario Tortugas – Casma.
- Identificar molecularmente bacterias simbiotes de la esponja marina mediante secuenciamiento *16S ADNr*.
- Determinar por PCR convencional la presencia del gen *SrfA* necesario para la producción de surfactina en bacterias aisladas a partir de la esponja marina de la clase *Demospongiae* del balneario Tortugas – Casma.
- Evaluar la actividad biológica de las cepas microbianas aisladas de la esponja marina de la clase *Demospongiae* del balneario Tortugas – Casma, frente a patógenos para el humano.

#### **1.4 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS**

Hipótesis implícita.

#### **1.5 JUSTIFICACIÓN**

En el presente trabajo, enfocamos el estudio a la comunidad microbiana presente en las esponjas marinas que destacan por su gran aporte en el campo biomédico contribuyendo al descubrimiento y obtención de compuestos activos dentro de los que podemos hacer mención: antiinflamatorios, antitumorales, inmunosupresores o neurosupresores, antivirales, antibióticos y antiincrustantes; así como también, nucleósidos, terpenos bioactivos, péptidos, alcaloides y derivados de aminoácidos de gran importancia en la industria farmacéutica.

Las interacciones existentes entre las comunidades bacterianas y esponjas continúan siendo un misterio por descubrir. Por lo que, el estudio del papel ecológico, la función biológica de las sustancias que se producen y la caracterización de los mismos, representa un rol importante en el campo de la Biotecnología marina.

En diversos países del mundo se ha llegado a estudiar la diversidad microbiana asociada a esponjas marinas y el uso potencial que tienen en diversos campos, mientras que en nuestro país la información que se tiene acerca del tema es muy escasa. Con el presente trabajo se pretende direccionar una línea de investigación, enfocada en el estudio de nuevos compuestos que podrían ser usados en posteriores aplicaciones y a su vez sumar conocimientos básicos de las esponjas, su comunidad simbiótica y el potencial biotecnológico que presentan.

## 1.6 LIMITACIONES DEL TRABAJO

### - Disponibilidad de medios de cultivo

Dentro de las limitaciones que se tuvo en la ejecución del presente proyecto se puede mencionar la no disponibilidad de variedad de medios de cultivo por parte del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, por ejemplo, se podría haber empleado un medio de cultivo como Agar Marino con el cual se hubiera realizado un ensayo comparativo para determinar el medio de cultivo más óptimo en el desarrollo de proyectos en esta área.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Esponjas marinas

El filo Porifera constituye la base del reino Metazoa, representando la evolución más temprana del filo aún existente, por lo que, como fósiles vivientes, son el taxón más cercano relacionado con el hipotético antepasado metazoo, la Urmetazoan y representan la clave para entender la evolución de los metazoarios (Müller *et al.*, 2003). La continuidad de su supervivencia se encuentra estrechamente vinculada a la aparente capacidad de adaptación frente a cambios dramáticos del medio ambiente (Van Soest *et al.*, 2012), convenciendo por su naturaleza sésil de que eran plantas, hasta que en 1765 fueron reconocidas como animales por la naturaleza de sus corrientes internas de agua (Brusca, 2003). Pueden presentar aspecto sacciforme, y en ocasiones una misma especie, adopta aspectos y colores variados dependiendo del sustrato que colonicen, como rocas, conchas, maderos sumergidos o corales (Barnes, 1987; Gasión & Fernández, 2013).

Estos organismos han superado dificultades impuestas por su nivel primitivo de organización, contando con dos atributos específicos que los caracterizan: sus células totipotentes (pueden diferenciarse en un tipo u otro según sea necesario) y su sistema acuífero. Las esponjas están constituidas por capas de células, que no son consideradas netamente como tejidos (Barnes, 1987):

- Pinacodermo, formado por células de la superficie exterior, denominadas pinacocitos
- Coanodermo, formado por células de la parte interior, denominadas coanocitos. Estas son células flageladas, encargadas de su alimentación a través del bombeo de agua hacia

el interior de la esponja, pudiendo alcanzar hasta 24 000 litros de agua por kilogramo de esponja en un día.

- Mesohilo, que se encuentra entre el pinacodermo y el coanodermo, está formado por una matriz gelatinosa de proteína que contiene material esquelético, fibras de colágeno y espículas, así como también células independientes totipotentes (Brusca, 2003; Barnes, 1987). A esta zona llega el alimento retenido en el coanodermo siendo digerido por fagocitosis gracias a la acción de otro tipo de células, los arqueocitos (Fu *et al.*, 2006; Vacelet & Donandey., 1977; Wilkinson, 1983 - 1978b).

La morfología de las esponjas también expone un importante factor para su función biológica, debido a que son animales sésiles y están en riesgo constante de ser colonizadas por otros organismos presentes en el medio. La inhibición de la epibiosis mediante sus simbiontes, genera beneficios por cuanto se previene la obstrucción de canales para alimentarse, disminuye la degradación de tejido e incrementa la longevidadde la esponja (Wahl, 1989; Correa & Sánchez, 1996). Incluso, las comunidades bacterianas asociadas proveen de una capa reflectora que impide que los rayos UV ingresen a las capas del animal, generando mutaciones y lesiones (Webster & Taylor, 2012). Asimismo, en algunas especies con alta carga de cianobacterias, les permite mejor recepción de luz para sus simbiontes fotosintéticos (Vogel, 1977; Sará, 1998; Wilkinson, 1983).

Otro carácter distintivo para este grupo, es el hecho de que sus células tengan siempre altos niveles de telomerasa, considerado por Müller *et al.* (2003) y Custódio (2004) como un carácter plesiomórfico no encontrado en metazoos superiores, y que les otorga crecimiento indefinido.

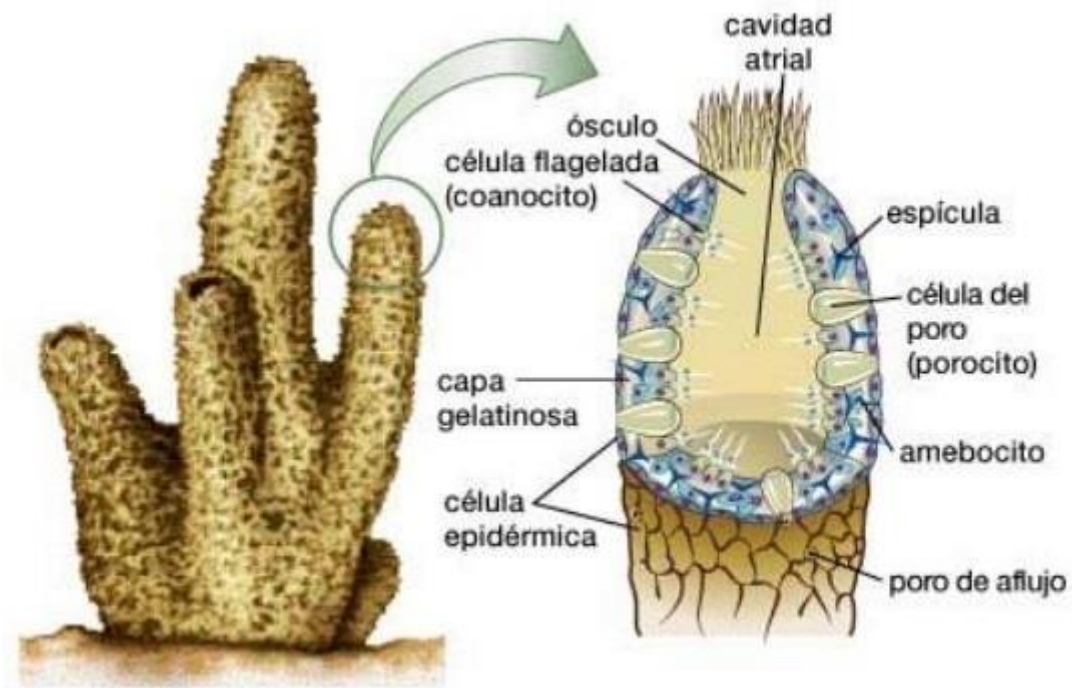
Las esponjas se dividen en cuatro clases:

- *Calcarea*, compuestas por un esqueleto mineral de carbonato de calcio y sin fibras de esponjina. Se encuentran en todos los océanos del mundo y no son muy grandes en tamaño, llegando a medir en su mayoría menos de 10 cm de altura.
- *Scelerospongiae*, cuyo esqueleto se compone de espículas silíceas pequeñas sin localización particular dentro del esqueleto.
- *Hexactinellida*, llamadas también esponjas de cristal, poseen espículas silíceas, son exclusivamente marinas y se adhieren a sustratos duros y blandos en aguas profundas.
- *Demospongiae*, que comprende aproximadamente el 95% de especies extantes, presentan espículas silíceas con esqueleto de fibras orgánicas o colágeno fibrilar (Van Soest *et al.*, 2012). Estas esponjas forman sus espículas de sílice por la alta concentración de

polifosfato producido por bacterias adheridas a ellas, lo que explicaría la razón de ser las esponjas con mayor carga bacteriana (Müller *et al.*, 2003).

Las esponjas de las clases *Demospongiae* y *Calcárea*, presentan organismos fotosintéticos simbiotes como los dinoflagelados inmóviles (zooxantelas), aunque los simbiotes más comunes son las cianobacterias (algas verdeazuladas), que viven en el interior del mesohilo o en amebocitos especializados. Los simbiotes cianobacterianos de algunas esponjas *Demospongiae*, como *Verongia aerophoba*, pueden constituir el 33% de la estructura de la esponja, mientras que las esponjas del arrecife de la Gran Barrera australiana obtienen de sus cianobacterias entre el 48 y 80% de sus necesidades energéticas (Barnes, 1987). El mesohilo conforma microambientes que proporcionan una gran variedad de nichos ecológicos que albergan grandes cantidades de microorganismos potenciales para el descubrimiento de compuestos activos con aplicaciones farmacéuticas (Hentschel *et al.*, 2002; Imhoff & Stöhr 2003; Thiel *et al.*, 2007).

Este filo ancestral generalmente habita en ambientes marinos tropicales y subtropicales bentónicos no contaminados, pudiendo habitar también en latitudes más altas e incluso en lagos de agua dulce, estimándose que 15.000 especies han sido descritas; aunque se considera probable que la diversidad real sea mucho más alta (Fieseler *et al.*, 2004). Debido a su estructura poro-canal que poseen las esponjas y a su alimentación por filtración, es que una gran cantidad de organismos se adhieren a ellas, ocasionando que presenten infinidad de relaciones inter e intra específicas con invertebrados, plantas y con abundante microbiota asociada, (González & Hernández, 2012; Wilderman, 2012). Esta amplia gama de comunidades microbianas, tienen importancia ecológica significativa, y aunque la perspectiva de la diversidad microbiológica está mejorando rápidamente, el papel de estos microbios en su mayoría es poco conocido (Karupiah & Li, 2015).



**Figura 1.** Esquema de la morfología general de una esponja marina. Fuente: Online Art. Encyclopedia Britannica Online.

## 2.1 Microorganismos simbióticos

Dado que las esponjas son organismos sésiles y no cuentan con defensa física propia, presentan mayor susceptibilidad frente a depredadores como peces, tortugas y algunos invertebrados, organismos incrustantes y algunas plantas que se asientan en su superficie externa, establecen relaciones con diversos microorganismos como bacterias, arqueas, algas, hongos y virus que les sirven como defensa por su amplia gama de toxinas y químicos que secretan (Mol *et al.*, 2009; Hertianiet *et al.*, 2010). Estos microorganismos, además contribuyen al desarrollo fisiológico y ecológico de las esponjas, siendo fuente de nutrientes como nitrógeno y carbono, defensa química o mutualismo (Taylor *et al.*, 2007; Webster & Taylor, 2012; Vacelet, 1975; Slaby *et al.*, 2019).

En muchos casos, se ha centrado mayor atención al microbioma de esponjas en comparación a los estudios de la propia esponja, en la mayoría de casos a esponjas colectadas de zonas poco profundas, climas templados, tropicales, sub tropicales y preferentemente de la clase *Demospongiae* (Schmitt *et al.*, 2012; Moitinho-Silva *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2016; Rodríguez-Marconi *et al.*, 2015; Cárdenas *et al.*, 2018, 2019).

Las comunidades microbianas se han estudiado ampliamente reportando que pueden llegar a albergar a más de 60 filos bacterianos y al menos cuatro filos de Arqueas (Thomas *et al.*, 2016). Si bien el flujo de agua de mar es constante, las comunidades microbianas de la esponja se diferencian notablemente de las comunidades existentes en el agua de mar (Hill & Sacristán-Soriano, 2017).

Un estudio metagenómico reveló que ciertos genes de las Arqueas están relacionados en procesos biológicos como la oxidación y permeasa del amoníaco y genes de la ureasa, importantes en el ciclo del nitrógeno de la esponja (Radax *et al.*, 2012). El filo *Thaumarchaeota* de la familia *Cenarchaeum symbiosum* presenta dominio estrechamente relacionado con las esponjas marinas, llegando a componer hasta un 98% del total de microorganismos derivados de estos invertebrados (Pape *et al.*, 2006; Preston *et al.*, 1996).

Dentro de las cianobacterias, el género *Synechococcus*, se ha ubicado como el más influyente en el ciclo de carbono de las *Demospongiae*, por su abundancia en el organismo y por su rol en el anabolismo de carbohidratos, jugando además un papel importante en la fijación del nitrógeno y en la protección del tejido de la esponja (Botté *et al.*, 2019; Konstantinou *et al.*, 2018; Simister *et al.*, 2012). Asimismo, la detección y cuantificación de genes involucrados en enzimas usadas en la fijación del nitrógeno, Li (2019) y Mohamed *et al.* (2010) demostraron que los filos *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* presentan mayor participación en esponjas de tipo *Demospongiae*.

Diversos estudios como los de Hentschel *et al.* (2002); Lee *et al.* (2011); Pita *et al.* (2013); Reveillaud *et al.* (2014); Easson & Thacker (2014); Thomas *et al.* (2016); Steinert *et al.* (2019) y Cárdenas *et al.* (2019); afirman que las comunidades procariotas están determinadas por los taxones del hospedador, basados en que las esponjas albergan comunidades microbianas específicas de cada especie de esponja. Steinert *et al.* (2019) refuerza esta hipótesis con el estudio de un grupo seis de taxones de *Demospongiae* antárticas que presentan taxones bacterianos dominantes y de alta especificidad con el hospedador.

Fieseler *et al.* (2004), Siegl *et al.* (2011) y Webster & Taylor, (2012) propusieron un nuevo filo bacteriano llamado “*Poribacteria*” que se reporta únicamente en tejidos de esponjas marinas, y que agrupa bacterias que presentan menos del 75% de similitud con filos como *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chlamydia*, por lo que se le considera como un nuevo grupo bacteriano específico de esponjas marinas.



Pese a todos los estudios reportados, la ecología de los microorganismos continúa siendo escasa, y en la actualidad se considera que la identidad del hospedador, su geografía y el medio ambiental son puntos primordiales para determinar la estructura de las comunidades microbianas de esponjas (Webster *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2012; Easson *et al.*, 2020; Sacristán- Soriano *et al.*, 2020b).

## **2.2 Producción de compuestos activos**

El efecto antagónico entre bacterias es una característica muy conocida en el medio marino, donde participan grupos bacterianos (Brinkhoff *et al.*, 2004; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005) que compiten por espacio y nutrientes generando una fuerza selectiva que ha posibilitado la evolución de una variedad de adaptaciones efectivas en el asentamiento bacteriano (Grossart *et al.*, 2004) y que involucran factores como disponibilidad de sustrato, estado fisiológico del organismo, e interacción con otros organismos o sustancias que secretan (Burgess *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 1999).

Las esponjas marinas son las principales productoras de una gran diversidad de compuestos activos incluso mayor que los compuestos obtenidos de organismos terrestres, llegando a ser consideradas como un “tesoro de drogas” de gran potencial biotecnológico (Müller *et al.*, 2004; Perdicaris *et al.*, 2013). Los diversos parámetros físicos, químicos e hidrológicos a los que están expuestos estos organismos, los condiciona a una adaptación constante desarrollando un amplio espectro de producción de biomoléculas, metabolitos secundarios y biopolímeros importantes en el desarrollo de la biotecnología marina (Rotter *et al.*, 2021). Estos compuestos presentan actividad inmunosupresora, neurosupresora, relajantes musculares, sustancias con actividad inmunomoduladoras, algunas eficientes prometedoras en el tratamiento contra la arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares (Anjum *et al.*, 2016; Stead *et al.*, 2000; Barrese & Tagliatela, 2013) e incluso contra el nuevo corona virus 2019-nCoV (Vijayaraj *et al.*, 2020).

En una recopilación de fármacos de origen marino clínicamente aprobados y en ensayos clínicos, Martins *et al.* (2014) y Jiménez *et al.* (2019) mencionan una serie de fármacos: citarabina (Cytosar-U®), nelarabina (Arranon®), fosfato de fludarabina (Fludara®), trabectedina (Yondelis®), eribulina mesilato (Halaven®), brentuximab brentuximab (Adcetris®), plitidepsina (Aplidin®), polatuzumab vedotin (Polivy™), enfortumab vedotin-ejfv (PADCEV™) y, más recientemente, lurbinectedina (Zepzelca®) y belantamab mafodotin (BLENREP®) para el tratamiento del cáncer, ziconotida (Prialt®)

para el dolor crónico severo, ésteres etílicos de ácido  $\omega$ -3 (Lovaza®), Éster etílico del ácido eicosapentaenoico (Vascepa®), y  $\omega$ -3-carboxílicos ésteres (Epanova®) para el tratamiento de hiper-trigliceridemia, y  $\iota$ -carragenina (carragelose) y vidarabina (Vira-A®) para el tratamiento antiviral. En la Tabla 1 se resumen los compuestos más conocidos que han sido extraídos a partir de esponjas marinas.

**Tabla 1.** Microorganismos asociados a esponjas y compuestos activos reportados. Tomado y complementado de Águila *et al.*, (2012)

Esponjas	Microorganismo	Producto natural	Referencia
<i>Aciculites</i>	<i>Bacteria filamentosa</i>	Theonegramida	Bewley <i>et al.</i> (1996)
<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Ésteres	Karpushova <i>et al.</i> (2005)
<i>Dysidea herbácea</i>	<i>Cianobacteria</i>	Metabolito clorado	Unson & Faulkner (1993)
<i>Dysidea herbácea</i>	<i>Oscillatoria spongelliae</i>	Difenil éter polibromado	Unson <i>et al.</i> (1994)
<i>Dysidea sp.</i>	<i>Vibrio sp</i>	Difenil éter bromado	Elyakow <i>et al.</i> (1992)
<i>Halicondria okadai</i>	<i>Alteromona sp</i>	Alteraminde A	Shigemori <i>et al.</i> (1992)
<i>Halicondria okadai</i>	<i>Prorocentrum lima</i>	Ácido okadaico	Kobayashi & Ishibashi, 1993
<i>Halicondria panicea</i>	<i>Antarcticum vesiculatum</i>	Compuesto neuroactivo	Perovic <i>et al.</i> , 1998
<i>Halicondria panicea</i>	<i>Psychroserpens burtonensis</i>	Compuesto neuroactivo	Perovic <i>et al.</i> , 1998
<i>Homophymia sp.</i>	<i>Pseudomona sp.</i>	Antimicrobianos	Bultel-Ponce <i>et al.</i> , 1998
<i>Suberea creba</i>	<i>Pseudomona sp.</i>	Quinolonas	Debitus <i>et al.</i> , 1998
<i>Tedania ignis</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	Dicetopiperazina	Stierle <i>et al.</i> , 1998
<i>Theonella swinhoei</i>	<i>Bacteria filamentosa</i>	Theopalauamida	Schmidt <i>et al.</i> , 2000
<i>Theonella swinhoei</i>	<i>Bacteria unicelular</i>	Swinholida A	Schmidt <i>et al.</i> , 2001
<i>Halicondria okadai</i>		Mesilado de Eriburina	Cortes, 2001

### 2.2.1 Biosurfactantes

Entre los metabolitos producidos por la microbiota asociada a esponjas, se ha logrado identificar diversos géneros microbianos con una gran capacidad para producir moléculas biosurfactantes (Jackson *et al.*, 2015; Fakruddin, 2012), que en comparación a los surfactantes derivados del petróleo, presentan ventajas al ser de menor toxicidad, mejor compatibilidad con el medio ambiente y mayor degradabilidad (Desai & Banat, 1997). También tienen aplicaciones farmacéuticas potentes como antifúngicos, antibacterianos, antimicoplasmales y actividades antivirales, se pueden emplear en inmunoterapia pulmonar e incorporarse en preparaciones probióticas (Singh & Cameotra, 2004).

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que se clasifican en glicolípidos, fosfolípidos, biosurfactantes poliméricos y lipopéptidos, son producidos principalmente por microorganismos permitiendo la reducción de la tensión superficial al acumularse en los líquidos. Dentro de los lipopéptidos, la surfactina destaca por su potencial antibiótico en el desarrollo de investigaciones destinadas a la recuperación avanzada de petróleo, la biorremediación, la inhibición de la formación de coágulos, la formación de canales iónicos de membrana y otras áreas (Rocha, 2017).

#### a. Surfactina

La surfactina es uno de los biosurfactantes más potentes que existen, atribuyéndosele diversas aplicaciones en la biotecnología sanitaria y medioambiental al presentar gran actividad antifúngica y antibacteriana (Vieira *et al.*, 2018). Sin embargo, también se ha presentado como un antiviral, ya que suprime la proliferación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) (Yuan *et al.*, 2018). Otras aplicaciones que se le atribuye a la surfactina son: capacidad de inhibir la formación de coágulos de fibrina, actividad antitumoral y acciones antiproliferativas contra muchas líneas de células cancerosas (Rodrigues *et al.*, 2006; Sen, 2010). Al respecto, Cao *et al.*, (2009) en un estudio demostró que la surfactina indujo la reducción de la viabilidad de células tumorales en diversas dosis.

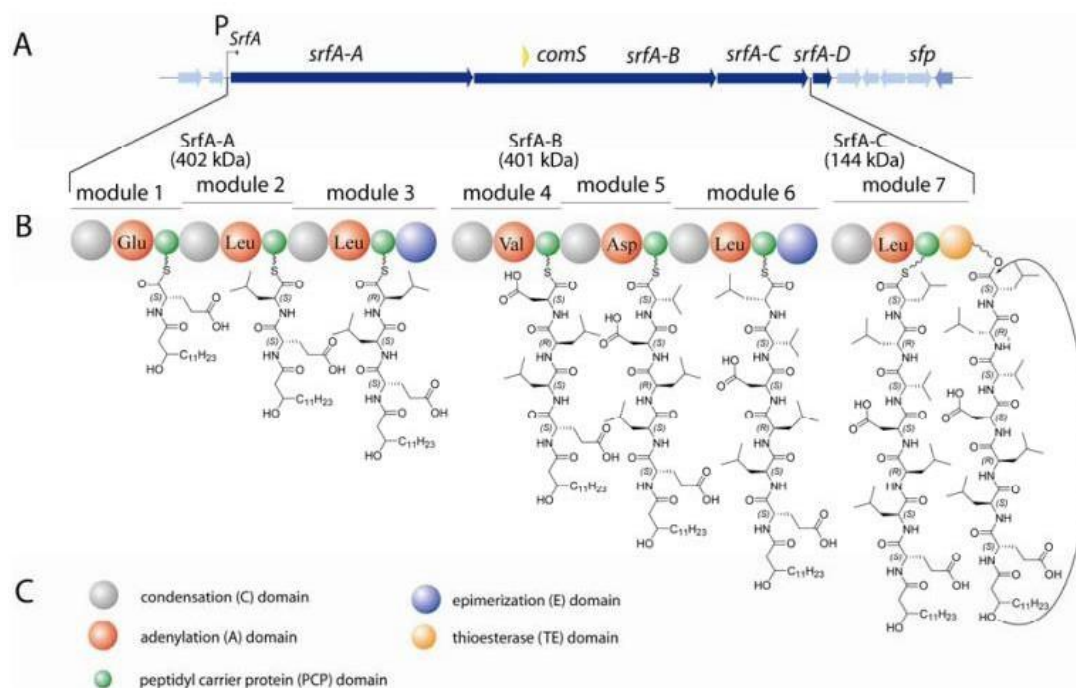
Se conocen tres tipos de surfactinas: A, B y C que se encuentran clasificadas de acuerdo con las diferencias en sus secuencias de aminoácidos (Vaz *et al.*, 2012; Singh & Cameotra 2004). Este lipopéptido fue identificado por primera vez como un potente inhibidor de coagulación de la fibrina (Nakano *et al.*, 1988; Arima *et al.* 1968) y hasta la fecha sigue siendo uno de los biosurfactantes más eficaces capaz también de reducir la tensión

superficial del agua (Gudiña *et al.*, 2015).

La surfactina es producida como resultado de síntesis no ribosomal catalizada por un gran complejo multienzimático llamado surfactina sintetasa que es codificado por el operón *srfA* (Nakano *et al.*, 1988; Plaza *et al.*, 2015), y contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs) *srfA-A*, *srfA-B*, *srfA-C* y *srfA-D* (Figura 2). Este operón también contiene el gen *sfp* que juega un papel importante en la producción de surfactina, ya que codifica la enzima fosfopanteteinil transferasa en especies de *Bacillus*, que actúa como activadora del complejo multienzimático *srfA*.

En la Figura 2 se describe la línea de ensamblaje de surfactina de la siguiente manera:

- (A) El grupo de genes biosintéticos de surfactina de *Bacillus subtilis* codifica la plantilla de proteína no ribosómica para la síntesis de la surfactina lipoheptapéptida.
- (B) Este complejobiosintético consta de tres surfactina sintetetas: *SrfA-A*, *-B*, *-C*, que consta de siete módulos distintos, cada uno responsable del reconocimiento, activación y carga de un solo sustrato de aminoácido. Se encuentran dos dominios de epimerización en los módulos 3 y 6, que convierten L-Leu en el estereoisómero D-Leu, respectivamente. La ciclación y liberación del heptapéptido final como macrolactona es catalizada por el dominio TE. (C) En diferentes colores se representan los dominios individuales (Tomadode Chiochini, 2006).

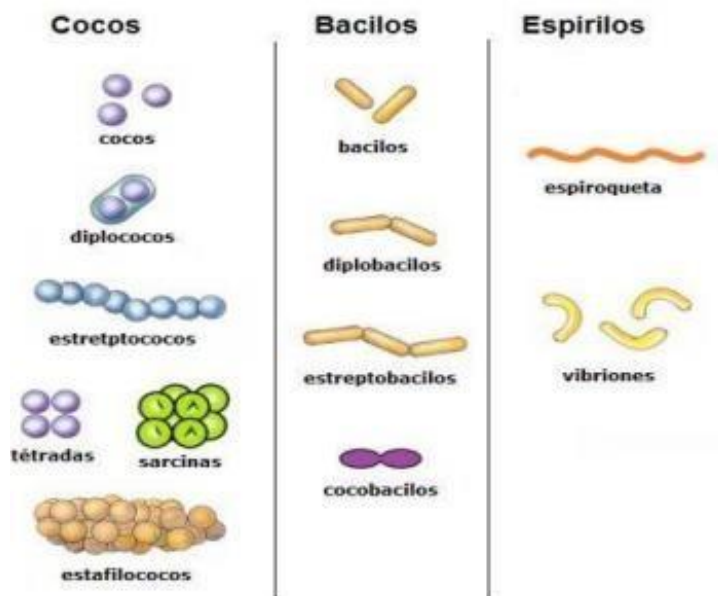


**Figura 2.** La línea de ensamblaje biosintético de surfactina

### 2.3 Clasificación bacteriana

Las bacterias están recubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo de hidrato de carbono y proteína denominado peptidoglucano, al contrario de lo que sucede con las paredes celulares de las plantas y las algas, cuya sustancia principal es la celulosa. Las bacterias suelen reproducirse mediante división en dos células iguales, en un proceso conocido como fisión binaria. Para la nutrición la mayoría de las bacterias utilizan sustancias químicas orgánicas que en la naturaleza pueden provenir de organismos muertos o vivos. Algunas bacterias pueden producir sus propios alimentos mediante fotosíntesis y otras pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas (Tortora, Funke & Case, 2007)

Las células bacterianas de acuerdo a su forma, pueden ser comúnmente *bacilos* en forma de bastón, *cocos* en forma esférica u oval y *espirilos* con forma de tirabuzón o curva. Luego de la división celular las bacterias pueden mantenerse unidas unas a otras, pero conservando su independencia celular que suelen ser características de un género o especie en particular; por ejemplo, se pueden encontrar diplococos o cocos en cadenas, en tétradas o racimos. Así también los bacilos pueden ser muy cortos, llamados cocobacilos o muy largos, sus extremos pueden ser redondeados o rectos, pueden encontrarse en cadenas, filamentos y algunos pueden tener forma de coma, como es el caso de los *Vibrios* (Pérez & Mota, 2006).

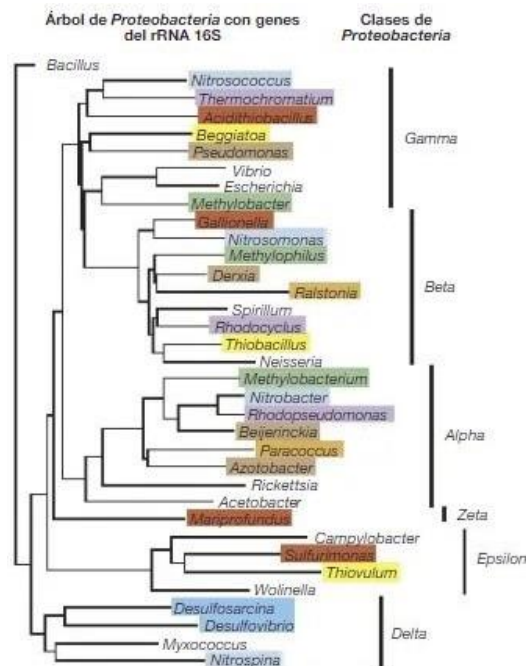


**Figura 3.** Morfología bacteriana. Imagen tomada de Dewey University: curso de microbiología

Para la clasificación bacteriana se tomó como referencia a Madigan *et al.* (2015), quienes mencionan que las bacterias se distinguen en al menos 80 filos, incluyendo aquéllos de los cuales solo se conoce las secuencias de genes del *16S ADNr* a partir de ambientes naturales. Se reporta que más del 90% de los géneros y especies de bacterias caracterizados, pertenecen a cuatro de los filos más conocidos: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroides*, que se detallan a continuación:

**- Proteobacterias**

Son el filo más extenso de relevancia médica, industrial o agrícola y metabólicamente más diverso, bacterias gramnegativas, morfológicamente muy variables incluyendo bacilos rectos y curvados, cocos y espirilos, formas filamentosas, otras formadoras de yemas o con apéndices. Este filo se divide en seis clases basándose en la secuencia de sus genes del *16S ADNr*: *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*, *Epsilon*, y *Zetaproteobacteria* (Figura 4), que incluye una sola especie, la bacteria marina oxidadora de hierro *Mariprofundus ferroxydans*. En la Figura 4 se muestra la clasificación de los géneros más destacados en el filo Proteobacterias.



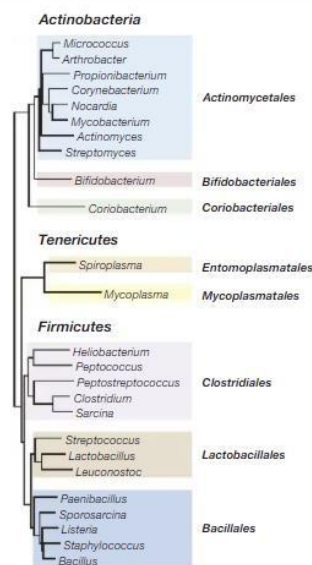
**Figura 4.** Árbol filogenético y relaciones metabólicas de algunos géneros destacados de Proteobacteria. Imagen tomada de Madigan *et al.* (2015)

- **Actinobacteria**

Este grupo de bacterias grampositivas, las Actinobacterias, contienen genomas con alto contenido en GC, forman su propio filo y constituyen bacterias anaerobias bacilares o filamentosas, normalmente se encuentran en materiales vegetales y suelos como son los *Actinomycetos*. Algunas tienen gran valor económico por producir antibióticos o productos lácteos fermentados.

- **Firmicutes**

Dentro de los *Firmicutes*, podemos mencionar a los *Firmicutes-Lactobacillales*, organismos fermentadores productores de ácido láctico, como producto final de su metabolismo. Normalmente son bacilos o coco oxidasa y catalasa negativos que no esporulan y fermentadores por naturaleza. Los *Firmicutes-Bacillales Clostridiales* no formadores de endosporas, agrupa pocos patógenos humanos, dentro de ellos, el género *Listeria*, son cocobacilos grampositivos, catalasa positivos y aerobios estrictos que suelen formar cadenas de tres a cinco células. Y los *Bacillales, Clostridiales* formadores de endosporas que son grampositivos, que se pueden distinguir entre ellas por su morfología, tamaño y la posición intracelular de la endospora, siendo los géneros más conocidos *Bacillus* que son aerobias o facultativas y *Clostridium* que comprende especies fermentadoras anaerobias estrictas. A diferencia de las *Actinobacterias*, las *Firmicutes* tienen menor cantidad de GC. Estos tres últimos filos bacterianos grampositivos constituyen casi la mitad de todas las especies de bacterias descritas. En la Figura 5 se muestran los principales géneros de los filos descritos.



**Figura 5.** Principales órdenes de bacterias grampositivas y bacterias relacionadas de los filos Actinobacteria, Tenericutes y Firmicutes. Imagen tomada de Madigan *et al.* (2015)

### 2.3.1 Género *Bacillus*

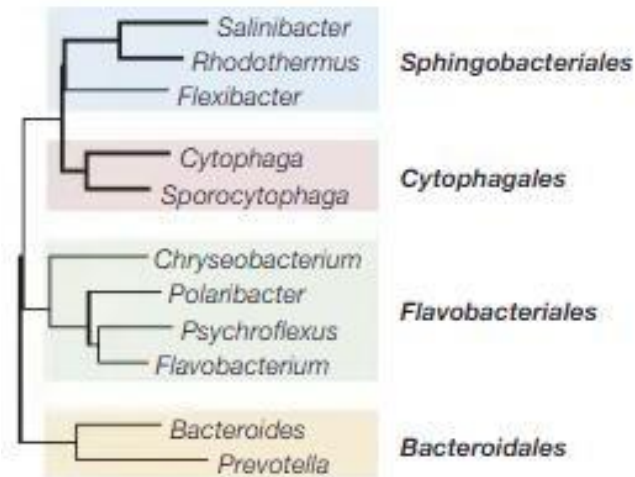
Las especies *Bacillus* son pertenecientes al reino Bacteria; filo *Firmicutes*; clase *Bacilli*; orden *Bacillales* y familia *Bacillaceae* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018) y fueron reportadas por primera vez por Cohn (1872). Estos microorganismos presentan un tamaño aproximado de entre 0.5 y 2.5  $\mu\text{m}$ , y pueden encontrarse en condiciones anaeróbicas como aeróbicas facultativas. Se encuentran distribuidos a nivel mundial debido a que presentan la habilidad para formar endosporas las cuales les proporciona resistencia en hábitats tanto terrestres, acuáticos y extremos. En el suelo cumplen un papel muy importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno, mientras que en el agua se encuentran en aguas frescas y estancadas, con la particularidad de que se encuentran activas en los sedimentos existentes (Cuervo, 2010).

El potencial de *Bacillus subtilis* para producir antibióticos se ha reconocido hace unas décadas, encontrándose que algunos antibióticos (subtilosina, surfactina, bacilisina) son producidos por una gran variedad de cepas de *B. subtilis*, y otros (lantibióticos subtilina, ericina y mersacidina) son producidos por cepas específicas. La producción de surfactina está ampliamente distribuida entre *B. subtilis*, misma propiedad que comparte con *Bacillus amyloliquefaciens* (Koumoutsis *et al.*, 2004), *circulans* (Hsieh *et al.*, 2004) y *Bacillus pumilus* (Kalinovskaya *et al.*, 2002). En conjunto, parece ser que *B. subtilis* es la especie más investigada respecto a su potencial para producir gran variedad de antibióticos, lo que se refleja en la gran cantidad de aislamiento y estudios naturales (Koumoutsis *et al.*, 2004).

#### - **Bacteroides**

Este filo contiene más de 700 especies descritas que se distribuyen en cuatro órdenes: *Bacteroidales*, *Cytophagales*, *Flavobacteriales* y *Sphingobacteriales* (Figura 6). Son bacilos gramnegativos no esporulados, normalmente sacarolíticas, es decir que hidrolizan los disacáridos o polisacáridos a carbohidratos más sencillos, así como también aerobias o fermentadoras; comprenden aerobios estrictos, aerobios facultativos y anaerobios estrictos.





**Figura 6.** Principales órdenes de Bacteroidetes. Imagen tomada de Madigan *et al.* (2015)

## 2.4 Coloración diferencial – tinción Gram

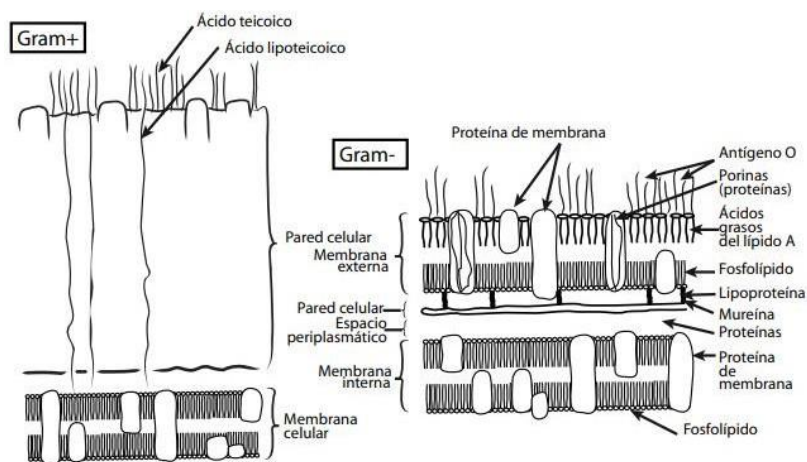
Para la clasificación bacteriana se tiene como referencia a Pérez & Mota (2006), que por medio de coloración Gram clasifican a las bacterias en dos grandes grupos fundamentales, dado que esta técnica permite observar la morfología, agrupación y diferenciación, debido a que utilizan diferentes colorantes que se comportan distinto según el microorganismo de estudio. Según su respuesta, las bacterias pueden clasificarse en Gram positivas que se tiñen de color violeta o en Gram negativas que se tiñen de color rosado.

El principio básico para la diferenciación entre las Gram positivas y Gram negativas se atribuye a la naturaleza de sus paredes celulares (Figura 7). La pared celular de una célula Gram positiva está formada por una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglicano o mureína que se sitúa por fuera de la membrana celular. Las micrografías muestran un espacio entre la membrana plasmática y la pared celular de las Gram positivas, denominado espacio periplasmático y consta de un gel llamado periplasma.

Por el contrario, la pared celular de las bacterias Gram negativas, es más compleja ya que posee una capa de 2 a 7 nm de grosor de peptidoglicano rodeada de una capa externa. Su espacio periplasmático contiene proteínas que participan en la captación de nutrientes (proteasas, lipasas, fosfatasa,  $\beta$ -lactamasas) y las convierten en productos más pequeños.

En la coloración Gram, el peptidoglicano no se tiñe por sí mismo, sino que parece actuar como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida del colorante cristal violeta. Durante

el proceso, las bacterias se tiñen primero con cristal violeta, y luego se tratan con yoduro para favorecer la retención del colorante. En la decoloración con etanol, se cree que el alcohol contrae los poros de la capa gruesa de peptidoglicano, y se retiene el complejo colorante yoduro, así las bacterias adquieren color violeta. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram negativas es muy fina, con menos enlaces y con poros de mayor tamaño. Además, es posible que el tratamiento con alcohol, extraiga suficientes lípidos de la membrana externa como para aumentar su porosidad. Por estos motivos el alcohol elimina más fácilmente el complejo cristal violeta yoduro en las bacterias Gram negativas (Pírez & Mota, 2006).



**Figura 7.** Estructura de la envoltura de un microorganismo grampositivo y gramnegativo.

## 2.5 Análisis molecular

La disponibilidad de herramientas moleculares aplicada al análisis comunitario en ecología microbiana ha generado gran impulso en el área de microbiología de esponjas, permitiendo acceder a información filogenética sobre consorcios microbianos complejos que no han podido ser cultivados de manera convencional (Head, Saunders & Pickup, 1998). Los genes ribosomales son utilizados para una identificación rápida y confiable, siendo el gen ADNr *16S* el más usado en PCR de bacterias (González, 2006).

### 2.5.1 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, abreviada como PCR, es una técnica desarrollada por Mullis y Faloona a principios de 1980, basada en amplificar cadenas de ADN en presencia de la enzima polimerasa y cebadores (fragmentos pequeños de ADN) obteniéndose productos de PCR que son visualizados en geles a base de agarosa para

conocer el tamaño esperado de ADN en estudio (Boguslaw *et al.*, 2017).

El uso de la técnica de PCR a partir de un cultivo puro, es una herramienta de suma importancia para clasificar e identificar microorganismos, sobre todo cuando las técnicas tradicionales no resultan eficaces para identificar la especie, permitiendo obtener resultados a menos costo y tiempo en comparación con los métodos convencionales (Woo *et al.*, 2008).

### **2.5.2 ADNr 16S**

El análisis del gen codificante para ADN ribosomal de la subunidad 16S abreviado como *16S ADNr* (Figura 8), cuenta con 1500pb, presente en todas las bacterias, por lo que fue el primer marcador en utilizarse para identificación bacteriana. Su análisis se basa en la identificación de secuencias cortas que aparecen en la gran mayoría de miembros de determinado grupo y que muy rara vez aparecen en otros grupos, debido a ello es que se pueden ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo taxonómico (Woese *et al.*, 1985), lo que hasta en la actualidad, es la más empleada para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana contribuyendo un amplio acceso a bases de datos (Rodicio & Mendoza, 2004).

Pese a la variabilidad genética en la mayoría de casos, todas las copias de ADNr 16S de ciertos organismos son idénticas o casi idénticas. Sin embargo, para considerar una identificación válida se debe tener en cuenta la comparación de genomas completos, como también las secuencias deben cumplir por lo menos un 70% de similitud con la secuencia comparada, sólo así se puede asegurar una identificación precisa (Rodicio & Mendoza, 2004).

La implementación del enfoque de *ADNr 16S* ha revolucionado el campo de la ecología microbiana, gracias a ello ha sido posible determinar la posición filogenética precisa de las poblaciones de bacterias ambientales en el árbol evolutivo de la vida independientemente de su capacidad de cultivo y rastrearlas en ecosistemas complejos. (Friedrich *et al.*, 1997).



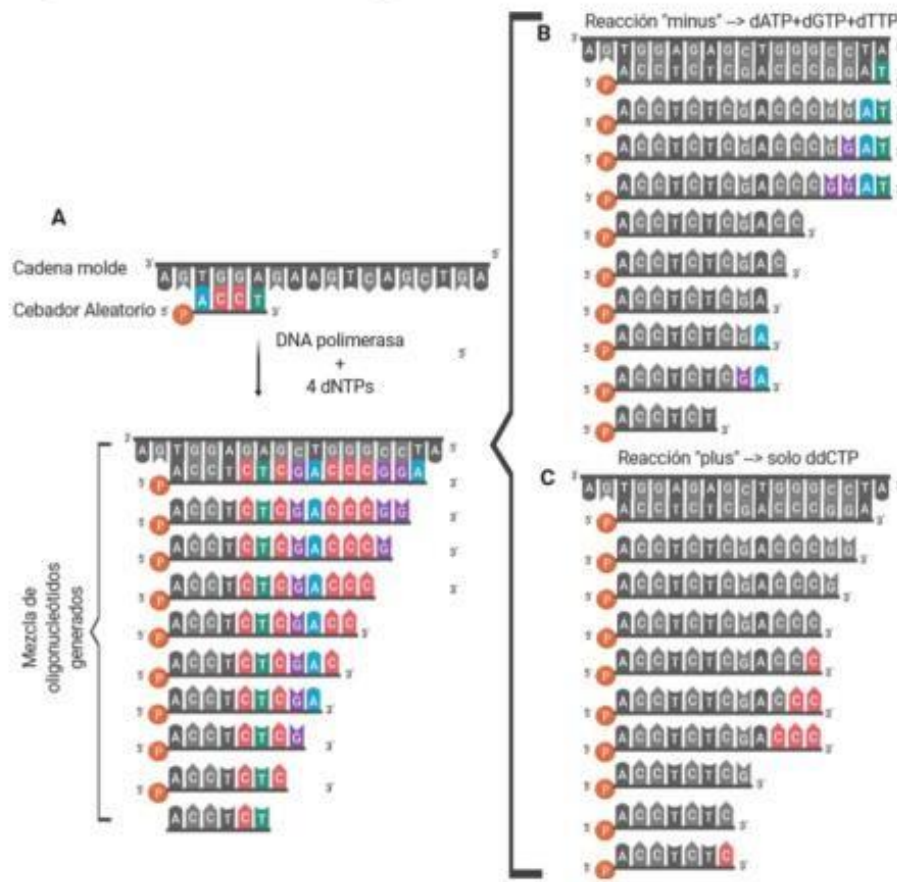
**Figura 8.** Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. Imagen tomada de Rodicio & Mendoza, 2004.

### 2.5.3 Secuenciamiento

Los primeros métodos de secuenciación aparecieron en los años 60 con el surgimiento de dos técnicas: secuenciación química de Maxam y Gilbert (1977) y el método que revolucionó la biología molecular: secuenciación enzimática de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

La técnica enzimática se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro*. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar, pero a diferencia de una PCR convencional, se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3' y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente

longitud, cada uno terminando en un dNTPs. Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan por electroforesis capilar (Valdelamar *et al.*; 2011).



**Figura 9.** Representación esquemática de la primera versión del método de Sanger.

Posterior a la amplificación y secuenciamiento de las muestras, las secuencias obtenidas se alinean y comparan utilizando programas informáticos para evaluar similitud con secuencias *on line*. En términos de identificación, esta técnica permite obtener resultados más precisos y en menor tiempo (Petit *et al.*, 2008). Esta tecnología de secuenciamiento, permite obtener actualmente millones de secuencias de ADN en menos tiempo y un costo cada vez más reducido (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Área de estudio y colecta de material biológico

Los ejemplares de esponjas de la clase *Demospongiae* fueron colectadas cada cuatro meses entre febrero del 2018 hasta enero del 2019 en el balneario Tortugas, ubicada en el distrito Comandante Noel, provincia de Casma, departamento de Áncash (Lat. 9°21'34'S Y Long. 78°25'32'W- Figura 10), que se caracteriza por presentar una temperatura entre 19°C y 22°C.

Las muestras fueron colectadas a una profundidad variable entre tres y cinco metros. Para la colecta de las muestras se contrató un buzo que realizó la extracción del material biológico mediante buceo tradicional.

Dada la dificultad que presentan las esponjas marinas para individualizarlas debido a su forma de crecimiento amorfa e irregular, las muestras estuvieron conformadas por sólo fragmentos del organismo, tomando dos fragmentos por cada colecta para los procesos que se detallan a continuación:

- *Identificación morfológica:* se tomó un trozo de la esponja, seleccionando específicamente ósculo, los cuales se conservaron en frascos de vidrio conteniendo alcohol 96° debidamente sellados y rotulados.
- *Análisis microbiológico y genómicos:* se tomaron pequeños fragmentos del mesohilo de la esponja de aproximadamente 5g, luego se depositaron en bolsas estériles herméticas para evitar adhesión de microorganismos de la corriente de agua y se transportaron en cubetas conteniendo gel pack para evitar contaminación durante el transporte. Para agilizar el proceso microbiológico, se armó un sistema cerca de la zona de colecta donde se logró realizar a la brevedad los cultivos microbianos.



**Figura 10.** Mapa geográfico del Perú, en rojo se señala la zona de colecta de esponjas marinas. Balneario Tortugas – Casma, provincia de Casma, departamento de Áncash Lat. 9°21'34'S Y Long. 78°25'32'W. La imagen pequeña señala el punto de colecta situado cerca a la playa San Germán – Tortugas

### **3.2 Identificación morfológica de la esponja marina colectada en el balneario**

#### **Tortugas – Casma**

En cada colecta se registraron los caracteres generales de la esponja, como color *in vivo*, tamaño, adhesión al sustrato, localización de ósculos, presencia de atrio, superficie corporal, forma del cuerpo, organismos asociados, entre otros.

Para la identificación a nivel de clase de la esponja colectada se procedió a realizar láminas de esqueleto siguiendo el protocolo según Hooper & Van Soest (2002a) que se detalla en Anexo 1, el cual permitió clasificar la esponja según el tipo de espículas que presentaron en su estructura.

### **3.3 Obtención de cultivos puros de microorganismos asociadas a la esponja marina de la clase *Demospongiae* colectada en Balneario tortugas - Casma**

Para el cultivo de bacterias asociadas a esponjas marinas, se tomó como referencia a Águila *et al.* (2012). El aislamiento de cultivos se realizó en agar Tripticasa de Soya (TSA) Sigma Aldrich, un medio de cultivo general empleado por su amplia aplicación en aislamiento de diversos microorganismos a partir de una variedad de materiales, y pese a que su uso es limitado, dado a que promueve el crecimiento de microorganismos no exigentes como moderadamente exigentes, se suplementó con cloruro de sodio para asemejar el medio a las condiciones ambientales de colecta.

Para el macerado de la esponja, se tomaron muestras del mesohilo y se desinfectaron con alcohol 70% enjuagando con agua de mar filtrada y esterilizada con el fin de remover las bacterias no pertenecientes a la esponja o provenientes de la columna de agua. Se tomó una alícuota aproximadamente de 100 µl del macerado de la esponja para la siembra en placas Petri conteniendo medio sólido TSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en observación constante por un tiempo de tres o cinco días, dependiendo del crecimiento microbiano; posteriormente las colonias aisladas se sembraron para mayor obtención de biomasa.

Transcurrido el tiempo de incubación con evidencia de crecimiento bacteriano, se realizó la identificación morfológica describiendo a detalle las colonias aisladas con ayuda de un microscopio Motic BA210 con el objetivo de seleccionar los morfotipos presentes. Luego de la diferenciación, las colonias se sembraron mediante técnica de estría cruzada y para confirmar la pureza de los cultivos seleccionados, se realizó tinción Gram.



Una vez obtenidos los cultivos puros, se resembró en tubos eppendorf conteniendo 1ml de medio caldo tripticasa soya (TSB) y se incubó a 27°C por un tiempo de uno a tres días, confirmando el crecimiento bacteriano por la turbidez en el medio y la formación de pellet en el fondo de los tubos eppendorf. Los cultivos seleccionados, se mantuvieron en el mismo medio, al cual se añadió glicerol al 15% para su conservación, manteniéndose a -20°C para su posterior análisis genético.

### **3.4 Identificación molecular mediante secuenciamiento 16S de bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase *Demospongiae* del balneario Tortugas - Casma**

#### **3.4.1 Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del gen *16S ADNr* de cultivos bacterianos puros aislados a partir de esponjas marinas de la clase *Demospongiae* colectada en balneario tortugas – Casma**

Se realizó la extracción de ADN de los 24 cultivos puros mediante el protocolo Fenol-cloroformo de Taggart (1992), modificado por el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa.

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría en un equipo cuantificador Epoch (Biotek) midiendo la concentración del extracto de ADN a un rango 260 a 280 nanómetros de longitud de onda (Ley de Beer-Lambert). Los ratios de absorbancia se evaluaron entre 1.8 y 2.0 indicando la pureza de los extractos ya que un rango por debajo de 1.8 revelaría posible contaminación por proteínas u otros componentes. Posteriormente se tomaron alícuotas a una concentración final del 20 ng/ul de ADN, las mismas que se conservaron a -20°C en una refrigeradora BIOBASE.

La calidad e integridad de ADN extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% (Bio-Rad, Molecular Biology Agarosa) en una cámara electroforética Bio Rad Mini sub cell GT de 25cm empleando solución amortiguadora TBE 0.5X (Tris-HCl, Ácido bórico, EDTA), como buffer, GelRed Nucleid Acid Gel Stain como agente intercalante y Massruler ADN Ladder Low range de 10000 pb como marcador molecular. Para cada reacción, se tomaron 3.0 µl de muestra de ADN y se mezclaron con 1.0 µl de intercalante. La electroforesis normalmente se trabajó a un voltaje de 90V por un tiempo de 45 minutos y finalmente los resultados se revelaron en un fotodocumentador Thermo Scientific por exposición a luz ultravioleta. Se consideraron muestras válidas, aquellas que no presentaban restos de ARN y cuyas bandas expuestas se mostraron íntegras y definidas, así también el ADN genómico se muestre íntegro y de

alto peso molecular en la parte superior de cada gel.

Se amplificó el gen 16S mediante la técnica de PCR convencional, empleando los siguientes oligonucleótidos universales correspondiente a bacterias, referidos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tabla de secuencias de primers para la identificación de bacterias.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' – 3')</b>	<b>Autor</b>
<b>27F</b>	GAG TTT GAT CCT GGC TCA	Frank <i>et al.</i> (2008)
<b>1492R</b>	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Frank <i>et al.</i> (2008)

La PCR tuvo un volumen final de 10ul conteniendo los siguientes componentes: 6.44ul de agua de PCR, 1ul de *Taq* buffer KCl-MgCl<sub>2</sub> (10X), 0.76ul MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.5ul de dNTP's (2.5mM), 0.1 de cada oligonucleótido (50μM), 0.1ul de *Taq* polimerasa Genon (5U/ul) y 1ul de muestra de ADN. Las muestras se llevaron a un termociclador Applied Biosystem-Veriti de 96 pocillos, iniciando con un proceso de desnaturalización a 94° por 6 minutos, seguido de 25 ciclos con los siguientes parámetros: 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridación por 45 segundos, tiempo de extensión a 72°C por 1 minutos y una extensión final a 71°C por 4 minutos.

Para validar el éxito de la amplificación, los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1% y empleando un marcador molecular de 1000pb. Luego de la validación fueron secuenciados empleando el kit de purificación BigDye XTerminator® en el equipo Genetic Analyzer 3500 de la empresa Applied Biosystem aplicando la metodología de electroforesis capilar. Se realizó el secuenciamiento de ambas hebras en el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción.

### **3.4.2 Análisis de datos y comparación de secuencias**

Luego de la etapa de secuenciamiento, los datos fueron revisados mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Los softwares seleccionados para ello fueron CodonCode aligner V9.0.2 y MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), que permite visualizar los cromatogramas del secuenciamiento y realizar correcciones si en caso fuese necesario. Al finalizar este proceso, los archivos se guardaron en formato FASTA.

El análisis de las secuencias se realizó en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la cual se determinó la similitud con los microorganismos almacenados en dicha plataforma. Para este análisis se trabajaron todas las secuencias descargadas en formato FASTA.

El alineamiento se realizó en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), con el cual se logró identificar las regiones con un alto nivel de similitud entre las secuencias analizadas. Al finalizar el proceso de alineamiento, se procedió a eliminar Gaps (regiones vacías entre secuencias alineadas) para evitar problemas al momento de elaborar árboles filogenéticos.

### 3.4.3 Elaboración de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos fueron elaborados empleando las secuencias almacenadas luego del proceso de alineamiento. El árbol empleado para el presente trabajo fue el test Neighbour joining al cual se le adicionó una secuencia de *Clostridium botulinum* como outgroup, permitiendo una mejor agrupación entre el resto de secuencias trabajadas.

### 3.5 Determinación por PCR convencional la presencia del gen *SrfA* necesario para la producción de *Surfactina* en bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase *Demospongiae* del balneario Tortugas – Casma

#### 3.5.1 Identificación del gen *SrfA* -A en bacterias asociadas a esponjas marinas de clase *Demospongiae*

Para la determinación de la presencia del gen *SrfA* se tomó como referencia a Mora *et al.* (2011) y Swaathy *et al.* (2014), respectivamente. Se emplearon cuatro oligonucleóticos específicos para dichos genes correspondientes a *Bacillus subtilis* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tabla de secuencias de primers para determinar la presencia del gen *SrfA*.

Primer	Secuencia (5' – 3')	Autor
<i>srfA-F</i>	TCGGGACAGGAAGACATCAT	Mora <i>et al.</i> (2011)
<i>srfA-R</i>	CCACTCAAACGGATAATCCTGA	Mora <i>et al.</i> (2011)

La PCR para identificar la presencia del gen *SrfA*, se ejecutó con la siguiente composición: 6,44ul de H<sub>2</sub>O de PCR, 1ul de *Taq* Buffer KCl-MgCl<sub>2</sub> (10x), 0,76 de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5 dNTP (2,5 mM), 0,1ul de cada primer (10uM), 0,1ul de *Taq* polimerasa Genon (5U/L) y 1ul de cada muestra de ADN, obteniendo un volumen final de 10ul para cada reacción. Las muestras se llevaron a un termociclador Applied Biosystem - Veriti de 96 pocillos se

programó de la siguiente manera:

Se sometió durante cinco minutos a 95°C para un ciclo de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, 45 segundos de *annealing* a 58°C, extensión 45 segundos a 72°C, y seguido por una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR para la identificación del gen *SRFA* se analizaron por electroforesis en agarosa al 1%.

Los productos de PCR validados fueron seleccionados para secuenciar empleando el kit de purificación BigDye XTerminator® y empleando el equipo Genetic Analyzer 3500 de la empresa Applied Biosystem que emplea la metodología de electroforesis capilar. Se realizó el secuenciamiento de ambas hebras en el Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción.

### **3.6 Ensayo de antagonismo de cepas aisladas a partir de esponjas marinas de clase *Demospongiae* del balneario Tortugas - Casma, frente a cepas patógenas para el humano**

Para la prueba de antagonismo se seleccionaron aquellos cultivos en las cuales se determinó la presencia del gen *SrfA*. Se tomó como referencia el protocolo de Águila *et al.* (2012); como cepas de enfrentamiento se empleó la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* y la bacteria Gram negativa *Pseudomona aeruginosa*, proporcionadas por el Laboratorio de Investigación en Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Universidad Nacional de Trujillo, y que son potencialmente patógenas para el hombre. Se inocularon los cultivos seleccionados en medio líquido LB por un tiempo de tres días y luego se embebieron los discos de papel filtro debidamente esterilizados en el cultivo obtenido.

Cada cepa patógena fue cultivada en toda la placa Petri y se incubaron por un tiempo de 24 horas hasta su crecimiento cubriendo la superficie del agar. Transcurrido el tiempo, se tomaron los discos de papel filtro embebidos con el cultivo líquido obtenido y se colocaron sobre el cultivo en placa de cada placa Petri. El tiempo de incubación fue de a 37°C por 24 horas para posteriormente observar crecimiento del halo de inhibición. Se empleó como blanco positivo ampicilina a una concentración de 1µg/ml.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Características de la muestra biológica

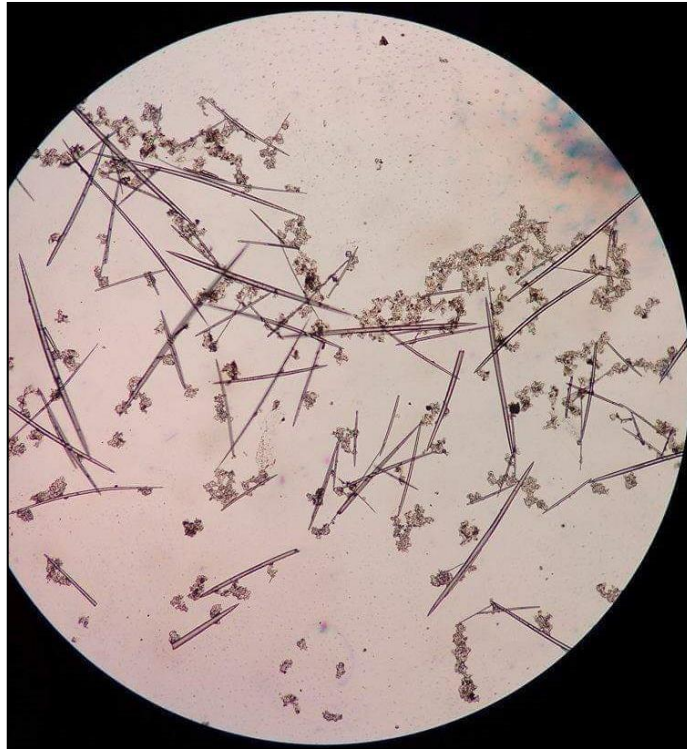
La esponja colectada es ramificada dactiliforme, consta de numerosos orificios, de superficie lisa, compresible y suave al tacto, de tamaño variable, llegando a medir a medir unos 20 cm aproximadamente. Se la encontró en sustrato rocoso, asociada a organismos como algas y pequeñas conchas: De color naranja brillante al estado fresco y decolorado a crema en el alcohol de preservación. En la Figura 11 se puede apreciar el tipo de esponja colectada en el balneario Tortugas - Casma a una profundidad entre tres y cinco metros.



**Figura 11.** Esponja de la clase *Demospongiae* colectada en el balneario Tortugas – Casma. A la izquierda se observa la esponja colectada en el balneario Tortugas. La fotografía tomada minutos posteriores a la colecta. A la derecha se evidencia la decoloración de la esponja luego de su conservación en alcohol al 96%

#### 4.2 Identificación morfológica de la esponja colectada

Las láminas de esqueleto de esponja permitieron identificar espículas monoaxónicas lo cual evidencia ser con certeza, una esponja perteneciente a la clase *Demospongiae*, en cuanto a la familia y especie de la esponja, es necesario realizar un estudio taxonómico y molecular a detalle para confirmar la identidad de la misma.



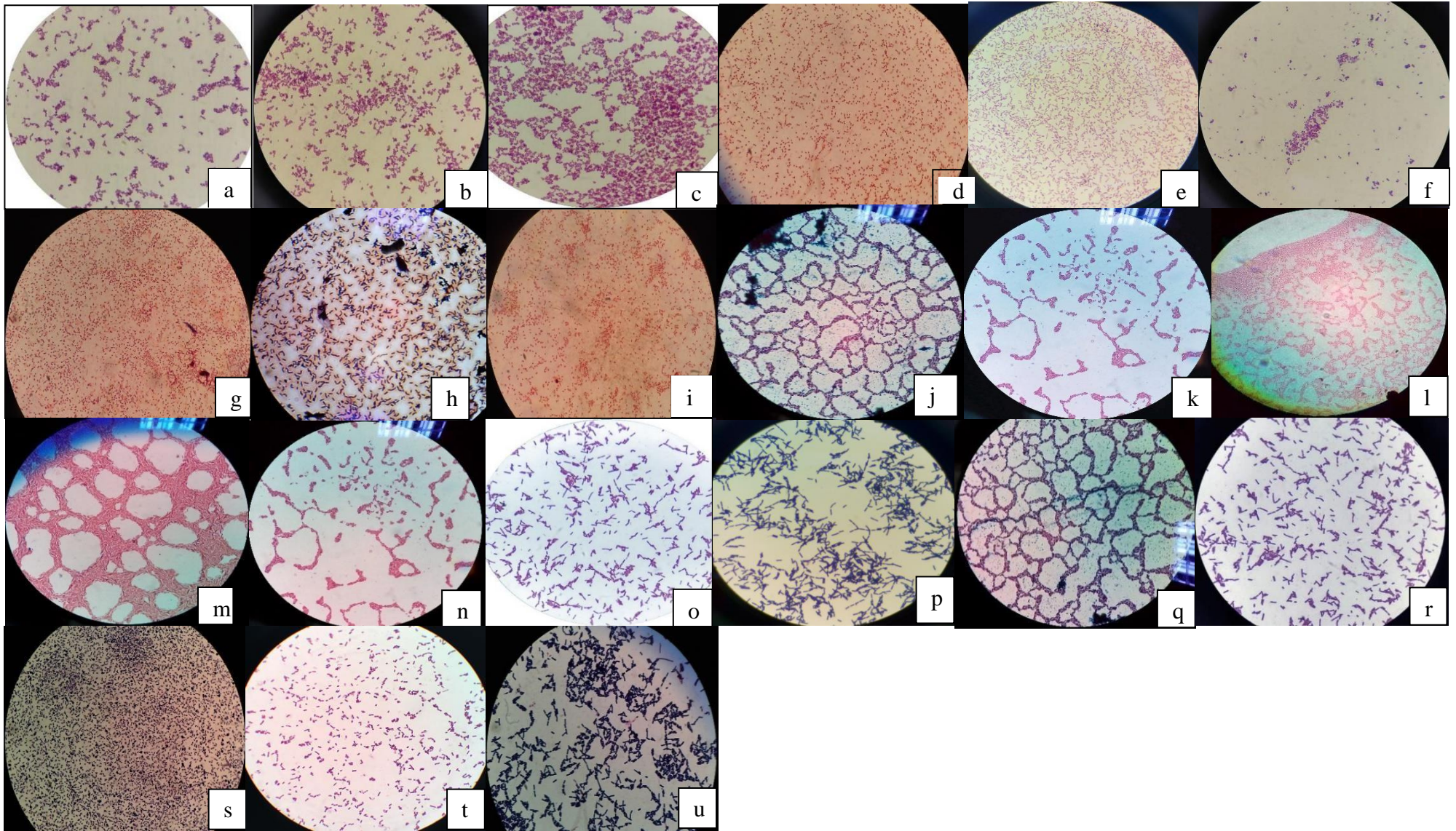
**Figura 12.** Lámina de esqueleto de la esponja colectada observada al microscopio, se observan actinas monoaxónicas características de las Clase *Demospongiae*.

#### **4.3 Obtención de cultivos puros de microorganismos asociadas a la esponja marina de la clase *Demospongiae* colectada en el balneario Tortugas - Casma**

A partir de las esponjas colectadas a lo largo del año, se lograron aislar y purificar un total de 21 cultivos bacterianos, los cuales fueron seleccionados en base a observaciones morfológicas a través de un microscopio binocular Motoc BA210. Para la identificación se tomaron en cuenta características como tamaño, forma, tiempo de crecimiento y tinción Gram. La mayoría presentaron coloración blanca o cremosa, de forma redondeada con bordes regulares e irregulares, algunas de ellas se pueden apreciar en la Figura 8. A los 21 cultivos seleccionados se le asignó y rotuló de acuerdo a la fecha de colecta, el tipo de colonia y la cepa seleccionada por los autores, los cuales quedaron como registro interno y posterior uso a lo largo de la realización del proyecto: a3, a4, b1, c2, d1, d3, e2, e3, f2, t1, t2, o2, o3, o4, lb1, lb2, c2a1, c2c1, c2d1, c2a2 y c4a, considerando que los cultivos aislados representan un porcentaje mínimo del total de simbioses que podrían estar presentes en una esponja (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). Morfológicamente las formas celulares que se observaron variaron entre bacilos, cocos y coco bacilos, en su mayoría Gram negativas. En la Tabla 4 se presentan las bacterias identificadas con la descripción detallada de cada morfotipo.

**Tabla 4.** Descripción e identificación morfológica de cultivos bacterianas aisladas a partir de la esponja marina de la clase *Demospongiae*.

<b>CEPA</b>	<b>DESCRIPCION MORFOLÓGICA DE LOS CULTIVOS BACTERIANAS</b>	<b>IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>
<b>C1a1</b>	Colonias muy pequeñas, borde y superficie lisa, forma redonda, transparente.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>B1</b>	Colonias muy pequeñas, borde irregular y superficie lisa, redondas, de color blanco.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>F2</b>	Colonias de tamaño mediano, borde regular y superficie rugosa, incoloras.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>A3</b>	Colonias de tamaño pequeño, redondas, de borde regular y superficie lisa, transparente.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>Lb2</b>	De tamaño mediano, borde irregular, color cremoso, presenta textura mucoide.	Bacilo borde redondeado	Gram negativa
<b>C2a2</b>	De tamaño grande, bordes irregulares y superficie lisa, color cremoso.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>D1</b>	Colonias de tamaño grande, bordes irregulares, invasivas, de color lechoso.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>C4a</b>	De tamaño mediano, borde irregular y superficie lisa, transparentes.	Bacilo curvado	Gram negativa
<b>C2</b>	De tamaño pequeño, borde liso e incoloras.	Cocobacilos	Gram negativa
<b>D3</b>	De tamaño mediano, borde y superficie lisa, color cremoso.	Bacilo borde recto	Gram negativa
<b>E2</b>	De tamaño grande, invasivas, borde irregular, de color lechoso.	Bacilo borde redondeados	Gram negativa
<b>E3</b>	Colonias muy pequeñas, de crecimiento rápido, borde liso, color lechoso.	Bacilo borde redondeados	Gram negativa
<b>C2c1</b>	Colonias pequeñas, de crecimiento lento, borde y superficie lisa, color cremoso.	Bacilo borde recto	Gram positiva
<b>C2d1</b>	Colonas medianas, borde y superficie rugosa, incoloras.	Bacilo borde redondeados	Gram positiva
<b>Lb1</b>	De tamaño grande, circulares de borde irregular, color crema.	Bacilo recto	Gram positiva
<b>A4</b>	De tamaño grande, invasivas, textura gomosa, color lechoso, de borde regular	Bacilo borde recto	Gram positiva
<b>T1</b>	Colonias grandes, borde irregular, de color lechoso.	Bacilo borde recto	Gram positiva
<b>O3</b>	De tamaño pequeño, circulares de borde liso, color crema.	Bacilo borde redondeado	Gram positiva
<b>T2</b>	De tamaño grande, borde regular, crecimiento rápido color lechoso.	Bacilo borde recto	Gram positiva
<b>O4</b>	De tamaño pequeño, circulares de borde liso, color lechoso.	Bacilo borde recto	Gram positiva
<b>O2</b>	De tamaño mediano, borde irregular, color cremoso.	Bacilo borde recto	Gram positiva



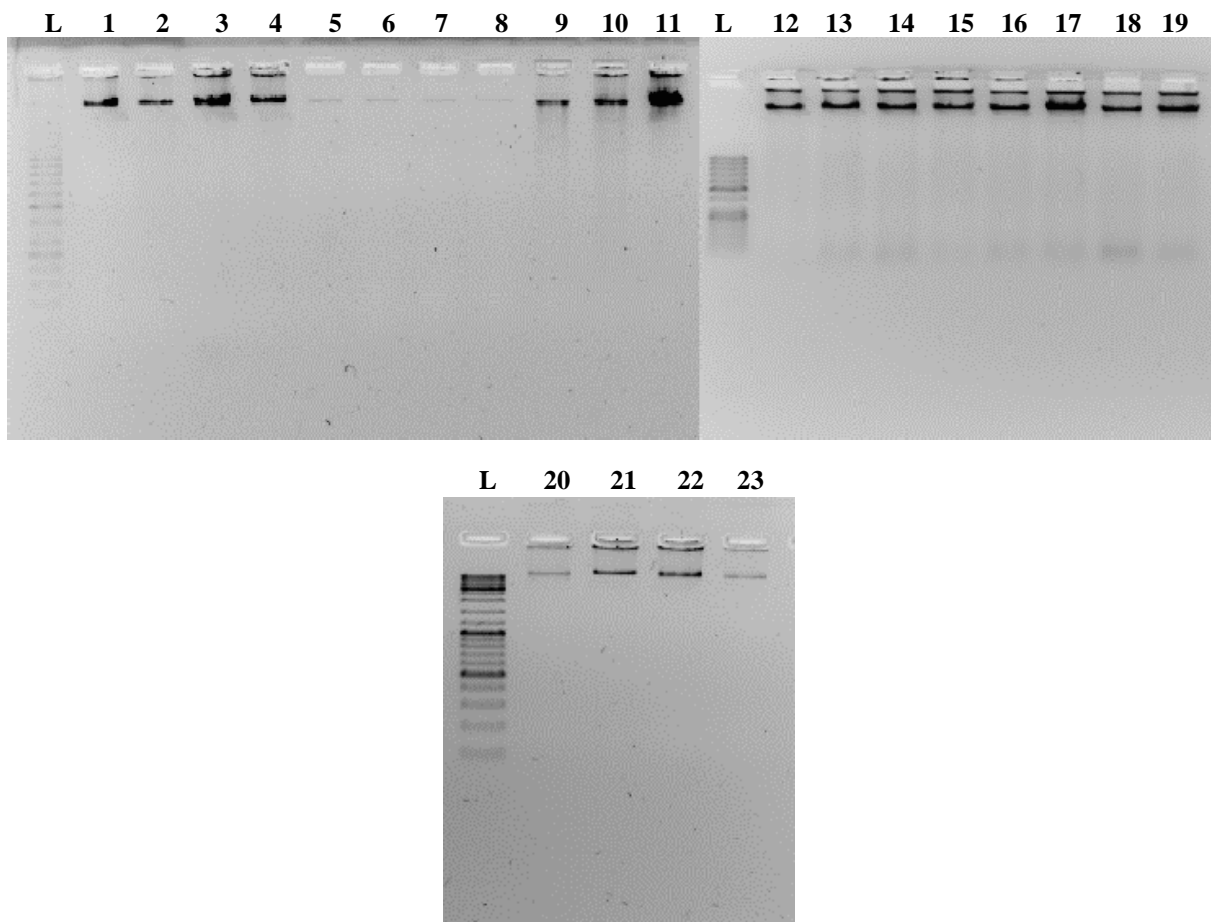
**Figura 13.** Coloración Gram de los 21 cultivos bacterianos de bacterias aisladas y purificadas a partir de la esponja marina de clase *Demospongiae*: a. C1a1, b. B1, c. F2, d. A3, e. Lb2, f. C2a2, g. D1, h. C4a, i. C2, j. O2, k. D3, l. E2, m. E3, n. C2c1, o. C2d1, p. Lb1, q. A4, r. T1, s. O3, t. T2, u. O4.



#### 4.4 Identificación molecular de bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase *Demospongiae* mediante secuenciamiento 16S ADN

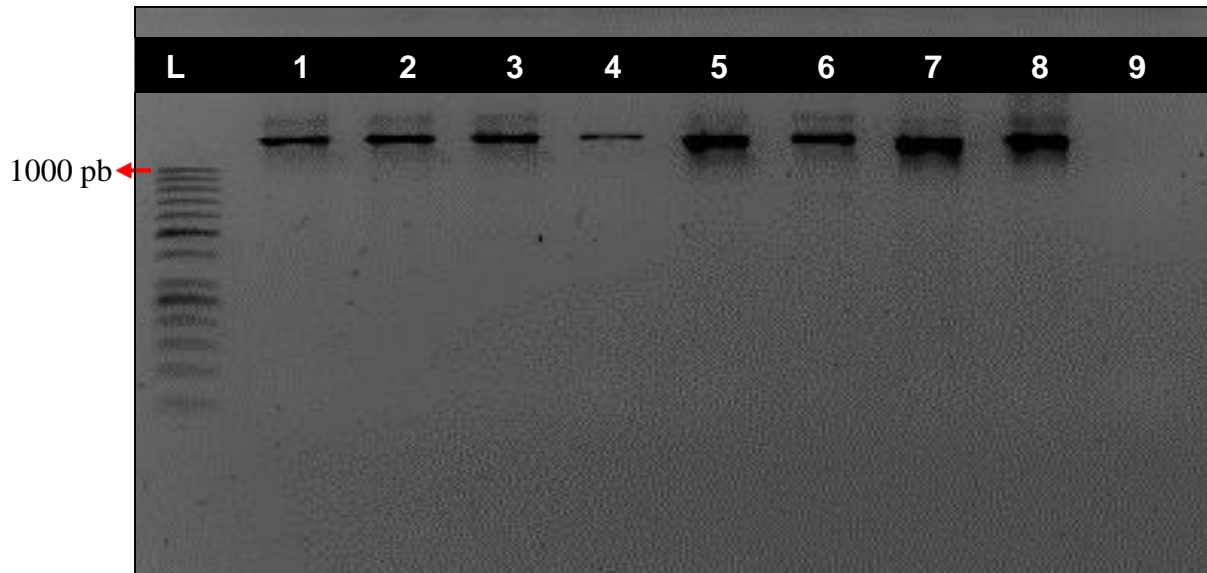
##### 4.4.1 Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del gen *16S ADNr* de cultivos bacterianos puros aislados a partir de esponjas marinas de la clase *Demospongiae*

Tras obtener los extractos de ADN de los 21 cultivos bacterianos correspondientes, se evaluó su integridad mediante geles de agarosa (Figura 10). Se consideraron muestras válidas aquellas que mostraron alta definición en sus bandas y un ratio entre 1.8 y 2.0.

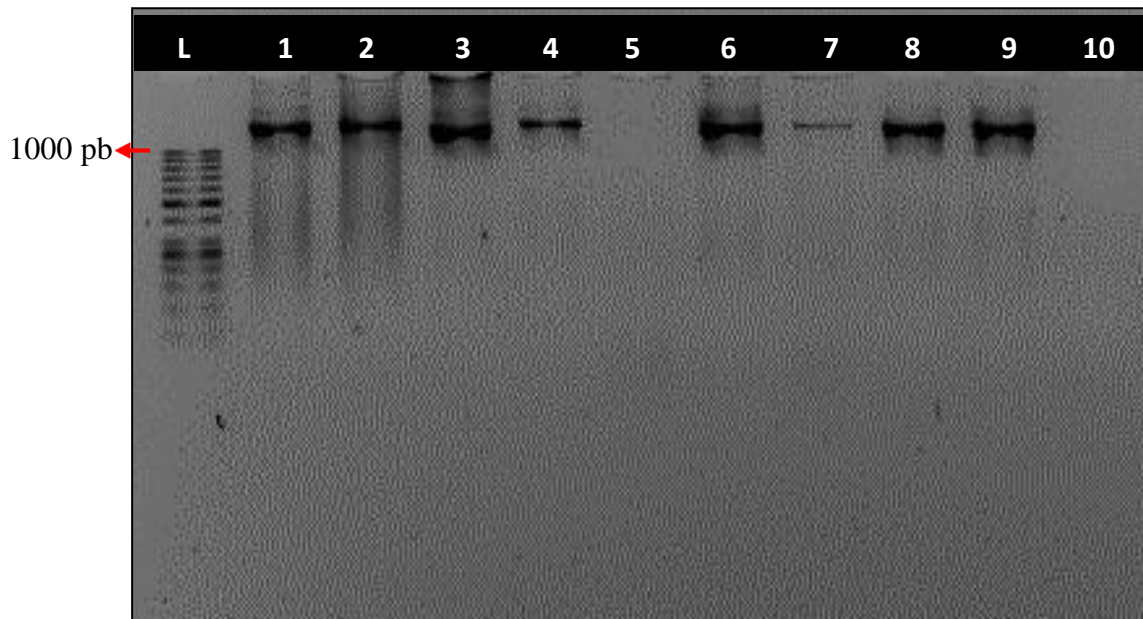


**Figura 14.** Gel de agarosa al 1% para visualización de la integridad de ADN de bacterias asociadas a esponjas marinas del Balneario Tortugas – Casma, se empleó un marcador molecular (L) de 1000pb. Se visualizan bandas definidas, ADN íntegro y de alto peso molecular.

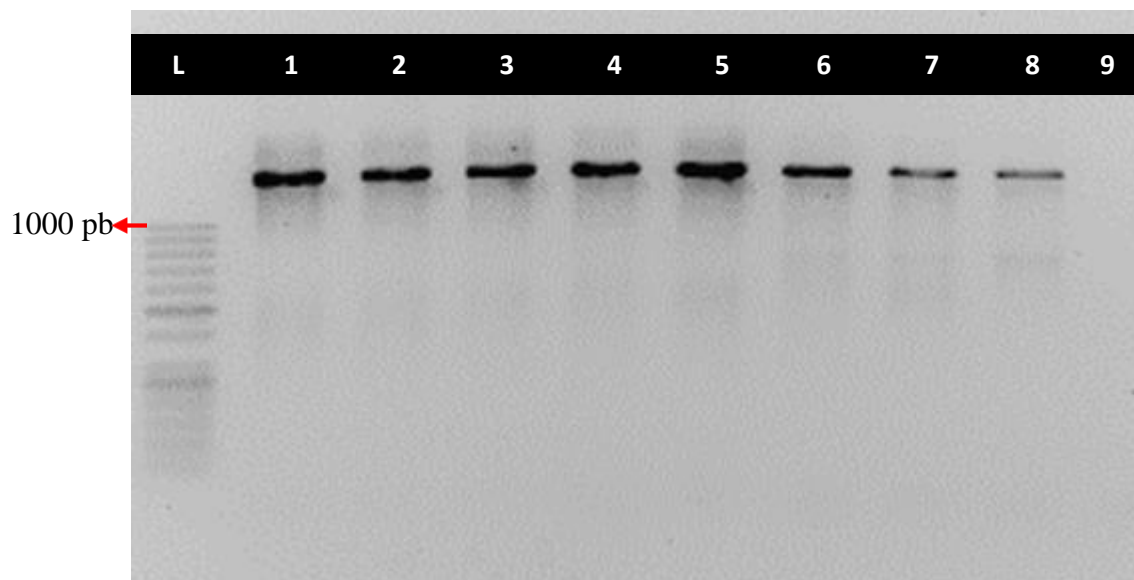
La identificación molecular de los cultivos se realizó mediante secuenciamiento *16S* *ADNr* luego de la extracción de ADN y amplificación por PCR. El estado de ADN obtenido se evaluó por electroforesis horizontal en gel de agarosa que se muestran a continuación:



**Figura 15.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16s *ADNr* para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en Balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. C2a1 (*Vibrio alginolyticus*), 2. C2c1 (*Paenibacillus azoreducens*), 3. C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), 4. C4a (*Vibrio crassostreae*), 5. Lb1 (*Bacillus rugosus*), 6. C2a5 (No identificada), 7. A4 (*Bacillus zhangzhouensis*), 8. B1. (*Vibrio sp.*), 9. Blanco negativo.



**Figura 16.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16sADNr para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en el balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. C2 (*Vibrio fluvialis*), 2. D1 (No identificada), 3. F2 (*Vibrio alginolyticus*), 4. D1 (*Vibrio sp.*), 5. D2(-), 6. D3 (*Vibrio fluvialis*), 7. E3 (*Vibrio harveyi*), 8. T1 (*Bacillus zhangzhouensis*), 9. O2 (*Oceanobacillus picturae*), 10. Blanco negativo.



**Figura 17.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 1400 pb del gen 16sADNr para la identificación de bacterias asociadas a esponjas marinas colectada en el balneario Tortugas - Casma. Se señala carril L para marcador molecular, carril del 1 al 9 corresponde a las muestras codificadas de la siguiente manera: 1. A3 (*Vibrio alginolyticus*), 2. Lb2 (*Vibrio harveyi*), 3. C2a2 (*Vibrio sp.*), 4. E2 (*Vibrio sp.*), 5. E3 (*Vibrio harveyi*), 6. O3 (*Bacillus zhangzhouensis*), 7. T2 (*Bacillus zhangzhouensis*), 8. O4 (*Bacillus altitudinis*), 9. Blanco negativo.

#### 4.4.2 Análisis de datos y comparación de secuencias

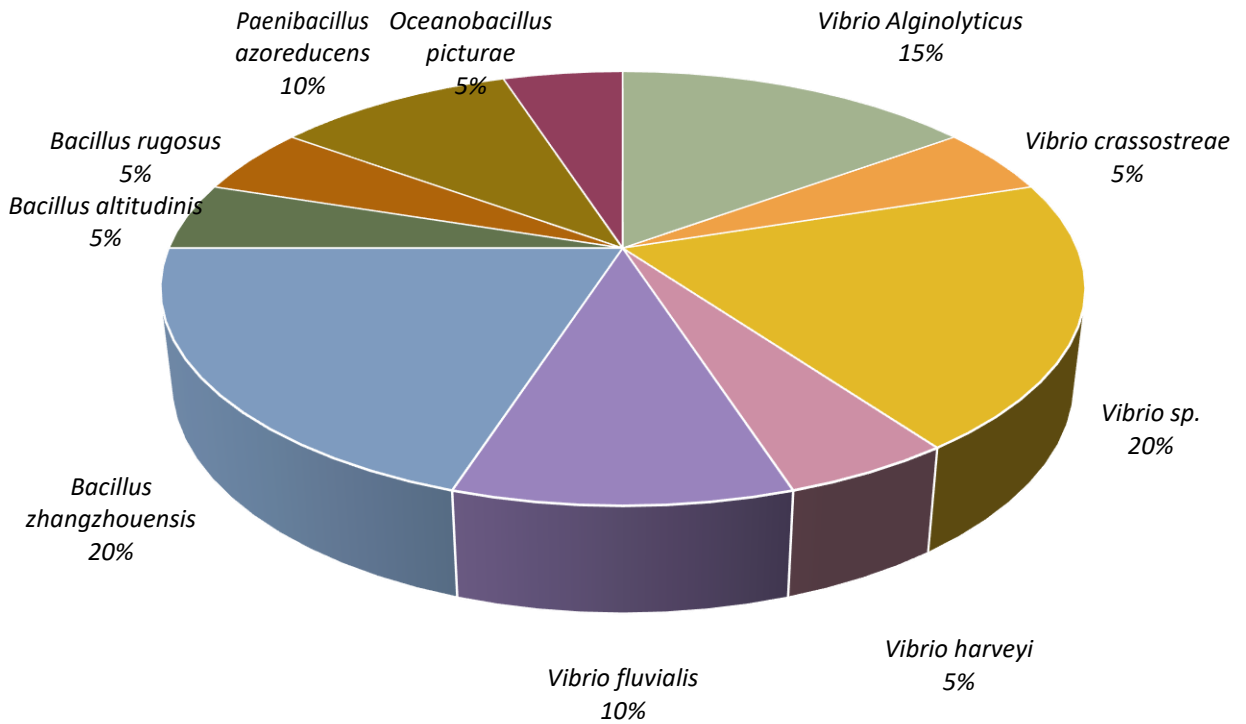
La edición de las secuencias se realizó con el programa CodonCode aligner V9.0.2 y el alineamiento de secuencias con Clustal W instalados para MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) y permitió agrupar las secuencias según su porcentaje de homología considerándose válido cuando el porcentaje era mayor a 99%. Entre las secuencias identificadas se notó que muchas de los cultivos que se habían descrito con diferencias morfológicas, con el secuenciamiento revelaron alto porcentaje de homología en sus secuencias, evidenciando pertenecer a una sola especie. Ello puede explicarse a que la forma de una colonia varía dependiendo de factores como temperatura de incubación a la que se somete el cultivo, el tiempo de cultivo y la composición del medio (Rodriguez *et al.*, 2006).

Es decir, se obtuvieron un total de 21 cultivos aislados con las bacterias identificadas y dos cultivos que no obtuvieron el porcentaje mínimo para considerar la identificación respectiva.

Tomando en cuenta una distribución porcentual del total de los cultivos aislados en el presente trabajo (Figura 18), entre las 21 cultivos aisladas reportamos un 43% que corresponde a bacterias Gram positivas y un 57% a Gram negativas, predominando los morfotipos: cocobacilos, bacilos con bordes recto y bacilos con bordes redondeados.

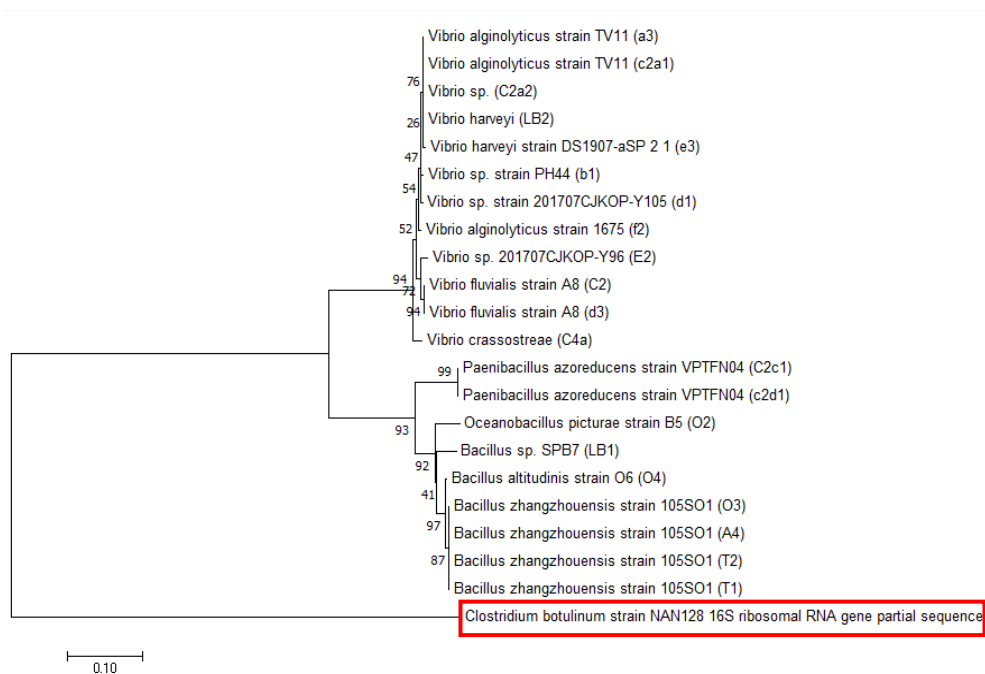
**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de bacterias identificadas mediante gen 16S, asociadas a esponjas marinas colectadas en el Balneario Tortugas – Casma.

CODIGO CULTIVO	ESPECIE MÁS CERCANA	IDENTIDAD	NUMERO DE ACCESO NCBI	FILO	GENERO
<b>Gram negativa</b>					
<b>c1a1</b>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99.82%	MT549165.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>f2</b>		99.62%	MK501337.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>a3</b>		99.82%	MT549165.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>d1</b>	<i>Vibrio sp.</i>	99.10%	MG593669.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>b1</b>		99.64%	MT073378.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>c2a2</b>		100.00%	MT634727.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>e2</b>		100.00%	MG593660.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>c2</b>		<i>Vibrio fluviales</i>	100.00%	CP053664.1	Proteobacteria
<b>d3</b>	99.28%		CP053664.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>lb2</b>	<i>Vibrio harveyi</i>	100.00%	MN578145.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>e3</b>		100.00%	MT269639.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>c4a</b>	<i>Vibrio crassostreae</i>	100.00%	MT510175.1	Proteobacteria	<i>Vibrio</i>
<b>Gram positiva</b>					
<b>t2</b>	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	100.00%	OL519543.1	Proteobacteria	<i>Bacillus</i>
<b>a4</b>		100.00%	OL519543.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>o3</b>		100.00%	OL519543.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>t1</b>		100.00%	OL519543.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>c2c1</b>	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	100.00%	MH553049.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>c2d1</b>		100.00%	MH553049.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>o4</b>	<i>Bacillus altitudinis</i>	100.00%	OL519525.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>lb1</b>	<i>Bacillus rugosus</i>	100.00%	MT554518.1	Firmicute	<i>Bacillus</i>
<b>o2</b>	<i>Oceanobacillus picturae</i>	99.81%	MT216516.1	Firmicute	<i>Paenibacillus</i>



**Figura 18.** Distribución porcentual de la diversidad microbiana según especie presente en la esponja colectada en el balneario Tortugas – Casma.

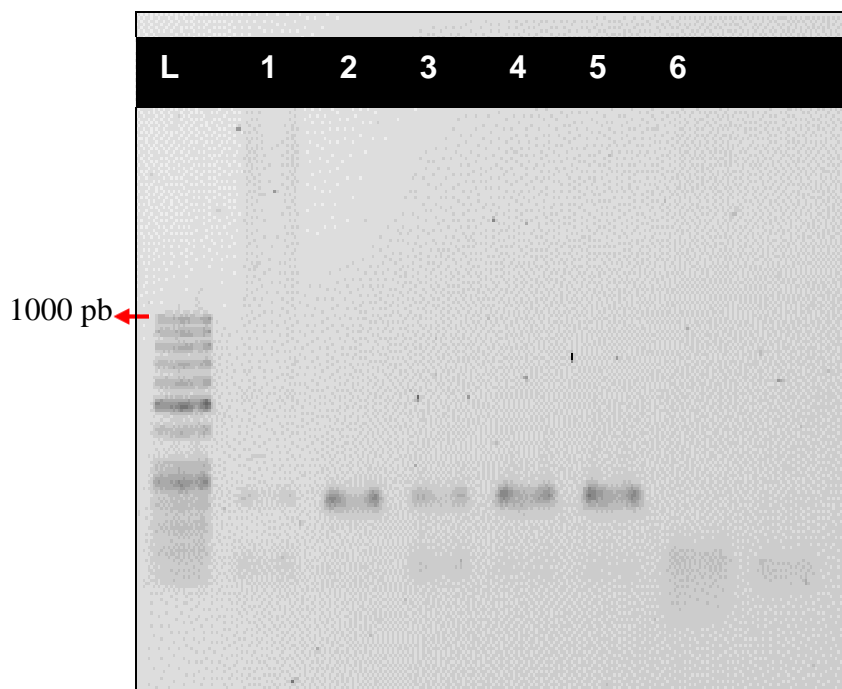
#### 4.4.3 Elaboración de árboles filogenéticos



**Figura 19.** Árbol filogenético de las 21 bacterias aisladas de la esponja colectada en Balneario Tortugas – Casma. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining con unbootstrap inferido a partir de 1000 réplicas. Los microorganismos que se encuentran en cuadros rojos son secuencias descargadas de NCBI como un outgroup y mejorar la visualización del árbol filogenético.

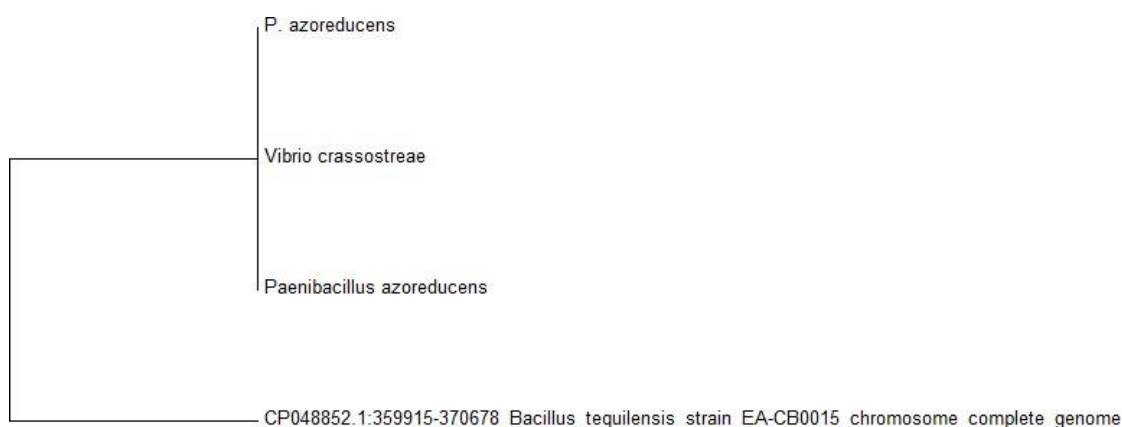
#### 4.5 Determinación por PCR convencional la presencia del gen *SrfA* necesario para la producción de surfactina en bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase *Demospongiae* del balneario Tortugas – Casma

Para la identificación del gen *SrfA*, se trabajó con una secuencia específica pudiéndose identificar el gen en sólo cuatro especies, del total de los 21 cultivos aislados; correspondiendo a los cultivos denominados Lb2, C2a5, C2c1 y C4a. De ellas, solo tres mostraron bandas claras consideradas válidas respecto al gen *SrfA*; destacando los cultivos c2d1 y c4a que mostraron mayor claridad en el gel de agarosa, estas corresponden a *Paenibacillus azoreducens* y *Vibrio gigantis* respectivamente.



**Figura 20.** Gel de agarosa al 1% para visualización de productos de PCR de 200 pb del gen *srfA* en bacterias asociadas a esponjas marinas de Balneario Tortugas. Se señala carril L para marcador molecular de 1000pb, seguido de los carriles (1 – 9) correspondientes a las muestras deADN genómico codificadas de la siguiente manera: 1. Lb2 (*Vibrio harveyi.*) 2. C2c1 (*Paenibacillus azoreducens*), 3. C2a5 (Cepa no identificada), 4. C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), 5. C4a (*Vibrio crassostreae*).

El procesamiento de muestras se realizó con el programa CodonCode aligner V9.0.2 y el alineamiento de secuencias con MEGA7. Con este último programa se realizó un alineamiento de las 3 secuencias obtenidas luego del secuenciamiento y adicional a ello se realizó la descarga del gen completo de *SrfA* para determinar si se alineaba correctamente con esta.



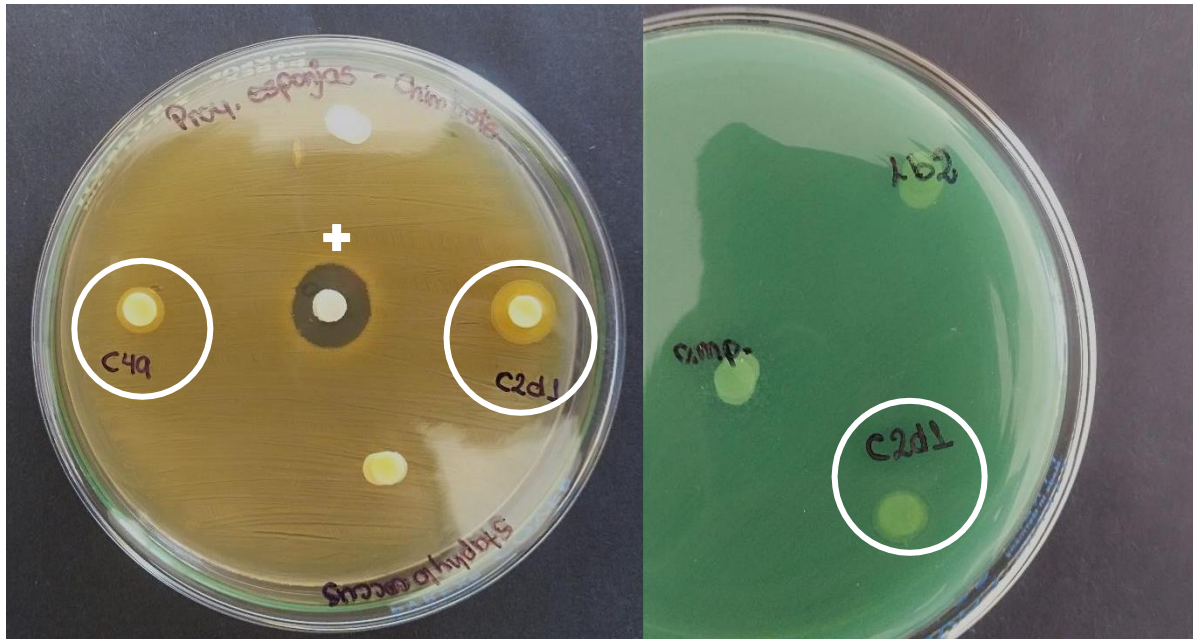
**Figura 25.** Comparación entre las secuencias obtenidas luego de realizar PCR con el gen *srfA* requerido para surfactina.

#### **4.6 Ensayo de antagonismo de cultivos aislados a partir de esponjas marinas de clase Demospongiae del balneario Tortugas – Casma, frente a cepas patógenas para el humano**

Se evaluó la actividad biológica de los cultivos aislados a partir de la esponja marina de clase *Demospongiae* frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Posterior a la incubación, se observa que el cultivo denominado C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* mostrando crecimiento alrededor del disco de una medida aproximada a 3mm alrededor del disco, el cultivo C4a (*Vibrio crassostreae*), mostró menor actividad considerando un diámetro de 1mm alrededor del disco.

En el caso de enfrentamiento con *Pseudomona aeruginosa*, el único cultivo que mostró un pequeño crecimiento fue C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*), con un halo de crecimiento menor a 1mm alrededor del disco. Sin embargo, el blanco positivo, ampicilina, tampoco mostró crecimiento frente a esta cepa patógena.





**Figura 26.** Placas conteniendo los cultivos C2d1 y C4a que dieron positivo a la actividad biológicas frente a patógenos humanos. A la izquierda se encuentra el enfrentamiento con el patógeno *Staphylococcus aureus* y a la derecha *Pseudomonas aeruginosa*

#### 4.7 Discusión

Para la identificación de las esponjas como especies es de suma importancia considerar la organización interna de la misma, basado en la observación de estructuras esqueléticas ya sean de fibras orgánicas o de espículas. Las espículas son un componente esquelético presente en la mayoría de las especies, habiendo algunas excepciones que carecen totalmente de ellas. Las esponjas de la clase *Demospongiae*, se componen principalmente por fibras orgánicas o fibrillas de colágeno, espículas silíceas mono o tetraxónicas (Hooper & Van Soest, 2002) tal como se mostraron en las láminas de esqueleto que se realizaron con muestras de la esponja colectada en el balneario Tortugas – Casma, evidenciando ser una esponja de clase *Demospongiae*.

El cultivo tradicional de microorganismos asociados a esponjas marinas se ha realizado generalmente en placas empleando diversos medios de cultivo selectivo, logrando recuperar apenas un 0,001 – 1% del total de microorganismos simbiotes (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). Este porcentaje se puede atribuir a las condiciones inestables, heterogéneas y oligotróficas características de los ambientes marinos en los que se encuentran estos simbiotes, por lo que, en múltiples trabajos se ha buscado optimizar los medios de cultivo con la finalidad de minimizar esta problemática, modificando su composición: fuente de carbono, aceptores de

electrones o concentración de nutrientes, como sus condiciones de cultivo como por ejemplo concentración del inóculo, temperatura, pH, tiempo de incubación, etc (Leal *et al.*, 2014). Estas optimizaciones han permitido ampliar el porcentaje de microorganismos cultivables, aunque para muchos de ellos, aún sigue siendo inviable el cultivo principalmente por la estrecha relación que establecen con su hospedador; sugiriéndose que realmente necesitan una interacción célula-célula, requerimientos nutricionales específicos y relaciones metabólicas no identificadas para obtener un cultivo óptimo favorable (Osinga *et al.*, 2001).

Hentschel *et al.* (2001), aislaron un total de 167 cepas bacterianas a partir de la esponja *A. gerardogreeni* del mar Mediterráneo empleando un solo medio de cultivo (TSA) mientras que en *A. aerophoba* se reportó 238 cepas aisladas, haciendo uso de diversos medios de cultivos enriquecidos y específicos para bacterias heterótrofas, oligotróficas, cianobacterias y además también una cámara para aislamiento de bacterias anaerobias. Nadyne (2006); Selvin *et al.* (2009), emplearon diversos medios de cultivo para aislamiento de bacterias simbiotes a las esponjas *Dendrilla nigra* y *Suberites zeteki* obteniendo un total respectivo de 145 y 178 cepas cultivadas.

En el esfuerzo de obtener mejores resultados en cultivos de microorganismos, se ha reportado también la aplicación de extractos de esponjas en el cultivo de sus simbiotes para ofrecer a los microorganismos un anfitrión superficial, lo que ha resultado muy beneficioso, como lo detalla el estudio de Keren *et al.* (2016), donde consiguieron promover el crecimiento bacteriano de simbiotes asociados a la esponja *Theonella swinhoei* gracias a que incluyeron el esqueleto de dicha esponja en los medios de cultivo. Ello puede atribuirse al hecho que el extracto de la esponja cuenta con nutrientes y factores de crecimiento que algunas bacterias necesitan para crecer, lo que incrementa la posibilidad de aislar nuevos cultivos bacterianos (Taylor *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2009). En el presente trabajo no se consideró emplear medios específicos, sino se empleó un medio general suplementado con NaCl.

Los cultivos aislados que se obtuvieron, difícilmente habrían sido caracterizados de manera certera por medio de técnicas tradicionales, razón por la cual la estandarización del protocolo de PCR para identificación bacteriana, fue un paso riguroso en el desarrollo del presente trabajo. Entre algunas de las consideraciones que se tuvo fueron: concentración de los componentes, temperaturas y ciclos de la PCR lográndose obtener el protocolo descrito en el acápite respectivo, que nos permitió obtener mejores resultados.

Entre las comunidades bacterianas aisladas e identificadas a partir de la esponja marina colectada, predomina el filo de proteobacterias con un 62% y en menor porcentaje el filo Firmicutes con un 38%, resultado similar al que reportó Thomas *et al.* (2010) en el estudio de comunidades microbianas asociadas a poríferos destacando también al filo Actinobacteria con un 46,6%, las Proteobacterias con un 23,3% y por último Firmicutes con apenas un 11,6%.

En contraste, Águila *et al.* (2012), en un reporte de las comunidades microbianas asociadas a la esponja de clase *Demospongiae*, *Aplysina Gerardogreeni*, logró identificar un total de 83 especies donde el filo Firmicutes presentó dominancia en un 90% de los microorganismos aislados y un 10% estuvo representada por Actinobacterias. De igual manera, un estudio de la esponja de clase *Demospongiae*, *Mycale sp.* Del golfo de California mostró que en la mayoría de las bacterias aisladas predominaron las Firmicutes sobre las Actinobacterias (Parera-Valadez, 2012).

Entre las proteobacterias identificadas, presentaron dominancia las Gammaproteobacteria, siendo en su mayoría del género *Vibrio*. Así como en el filo Firmicutes, destacó la presencia de *Bacillus*. Reafirmando estudios anteriores como Gunasekera *et al.* (2005), que identificaron gran variedad de *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* en estudios de simbiontes microbianos en esponjas. Y entre el filo Firmicutes se ha reportado que el género *Bacillus* constituyen uno de los grupos dominantes en la flora bacteriana de esponjas (Li *et al.*, 2007; Lee *et al.*; 2009), en esponjas como *Stelletta tenuis*, *Halichondria rugosa*, *Dysidea avara*, *Craniella australiensis*, *Callyspongia sp.* e *Hymeniacidon perleve*, etc (Li *et al.*, 2007). Entre ellas, las especies identificadas más abundantes fueron *B. subtilis* y *B. pumilus* (Hentschel *et al.*, 2001). Otros trabajos postulan que las comunidades bacterianas presentes en esponjas marinas son muy diversas en comparación a las comunidades presentes en la corriente de agua.

Tal afirmación se basa en el principio de que la composición morfológica de la esponja constituye microhábitats compuestos por un gran número de nutrientes, permitiendo que estas comunidades microbianas sean huéspedes verdaderos de la esponja y no solo parte del alimento que filtran, hecho clave para determinar la diversidad de bacterias presentes en las esponjas (Santavy & Colwell, 1990; Burja & Hill, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Weisz *et al.*, 2007; Hill 2017; Dobretsov *et al.*, 2004).

Esto demuestra que las esponjas marinas albergan una gran cantidad de microorganismos los cuales pueden ser aislados y purificados para posteriormente evaluar su capacidad productora de compuestos de interés que permitan ser empleadas en aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, en nuestro país este tipo de estudios no se han desarrollado con mucha frecuencia por lo que el siguiente trabajo es de los primeros en realizar la identificación de los microorganismos que contribuyen al conocimiento de comunidades microbianas asociadas a esponjas marinas ubicada en la zona costera de Ancash.

El gen *SrfA* necesario para producción de surfactina está asociado a bacterias del género *Bacillus*, sin embargo, en nuestro trabajo de investigación al realizar la amplificación de dicho gen mediante técnica de PCR y posterior secuenciamiento de los productos obtuvimos que se encontraba presente en una especie de *Vibrio* (*Vibrio crassostreae*) sin antecedentes de haber identificado dicho gen en este género.

Mora *et al.* (2011) en su investigación para la detección de microorganismos con capacidad de producir surfactina, usaron un par de primers que amplifican el gen *srfAA* y que amplifica 201 pb. Sin embargo, otros estudios como el de Plaza *et al.* (2015) identificaron la presencia de diversos genes para la producción de lipopéptidos combinando metodologías de PCR y LC-MS/MS. Entre todos los genes que estudió, se encuentra el gen *sfp*, presente en especies de bacterias del género *Bacillus* y como indica es gran importancia para la producción de surfactina.

Rasiya & Sebastian (2021) en una reciente investigación demostraron que una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* obtenida a partir de *Avicennia officinalis* tenía capacidad antagónica frente a *Staphylococcus aureus*. A través de análisis bioquímicos se demostró que esto se debía a la producción de lipopéptidos por parte de *B. amyloliquefaciens* lo cual fue comprobado mediante análisis moleculares determinando la presencia de los genes *ItuD*, *ItuD1*, *Sfp* y *Sur3* los cuales permiten la producción de iturina y surfactina. Ellos concluyen que debido a la eficacia

antibacteriana de estos lipopéptidos podrían desarrollarse medicamentos.

En otro estudio realizado por Nanjundan *et al.*, (2019) lograron extraer y purificar moléculas de surfactina, iturina y fengicina a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*, las cuales poseían actividad antimicrobiana contra los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* causantes de daños en el campo de la agricultura. Para confirmar que las moléculas producidas correspondían a estos lipopéptidos se realizaron separaciones mediante cromatografía líquida (HPLC), espectroscopía LC-MS y análisis moleculares para detección de los genes *Itud1*, *Sur3* y *sfp*.

En todas las investigaciones se realizan análisis moleculares para estudiar la presencia de diversos genes con capacidad productora de lipopéptidos, entre los cuales se encuentra *SrfA*, el mismo que fue empleado en el presente trabajo de investigación y que permitió conocer aquellas bacterias portadoras de estos genes y la producción de surfactina. Así mismo otras investigaciones sugieren que la identificación del gen *sfp* permite detectar microorganismos con capacidad productora de surfatina. Estos resultados pueden ser utilizados en investigaciones posteriores siguiendo la línea en búsqueda de nuevos compuestos bioactivos y sus diversas aplicaciones.

El cultivo C2d1 identificada como *Paenibacillus azoreducens*, una bacteria Gram positiva, fue la que presentó mayor actividad biológica frente a los dos patógenos de enfrentamiento, en mayor porcentaje frente a *Staphylococcus aureus*. La poca actividad que presentó el cultivo C2d1 frente a *Pseudomona aeruginosa*, probablemente se deba a que las bacterias Gram negativas como *Pseudomona*, son menos susceptibles a compuestos antimicrobianos por la estructura de su membrana externa y lipopolisacáridos que en conjunto actúan como una barrera eficaz contra las moléculas hidrofóbicas y lipofílicas en comparación de las Gram positivas (Aguilar-Ramirez, 2012). En cuanto al cultivo C4a identificada como *Vibrio crassostreae* presentó menor actividad frente a *Pseudomona aeruginosa* y actividad nula frente a *Staphylococcus aureus*.

Las constantes resiembras realizadas para la obtención del cultivo puro, pueden haber sido causantes de la poca actividad biológica que presentaron las cepas obtenidas en el presente trabajo frente a las cepas patógenas para el hombre (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008). Se destaca el grupo *Bacillus* por su gran capacidad de producción de metabolitos secundarios biológicamente activos; revelando a través de estudios

genómicos que más del 3% de este grupo bacteriano contienen genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos como policétido sintetasas y péptidos sintetasas no ribosomales requeridos para la biosíntesis de compuestos activos (Donadio *et al.*, 2007) de modo que el género *Bacillus* es considerado un grupo con alto potencial biomédico.

Aunque hay múltiples trabajos basados en el estudio de las comunidades microbianas, un alto porcentaje de ellos centra su atención en la búsqueda de compuestos antimicrobianos, muy pocos se enfocan en explorar y conocer las relaciones interespecíficas de estas comunidades en un contexto ecológico. En el presente trabajo reportamos que la actividad de los cultivos obtenidos que dieron respuesta positiva a la prueba de actividad biológica, no fue específicamente una reacción antagónica, sino más bien se podría tratar de una relación por competencia dado que los cultivos C2d1 y C4a exhibieron la capacidad de crecimiento en cultivos bacterianos de los patógenos a los que fueron enfrentadas. La supresión del crecimiento que no supone la muerte celular del cultivo diana, puede deberse a sustancias que afectan la comunicación bacteriana (Pesci *et al.*, 1999) o el metabolismo y la fisiología (Wilcox *et al.*, 1991).

## V. CONCLUSIONES

- Se logró identificar morfológicamente a nivel de clase de la esponja marina colectada tratándose de una esponja de clase *Demospongiae*.
- Se lograron aislar, purificar y seleccionar morfológicamente 21 cultivos bacterianos a partir de las esponjas de clase *Demospongiae* colectada.
- La identificación molecular de los 21 microorganismos aislados, nos permitió identificar los grupos Proteobacterias y Firmicutes divididos en diez especies entre *Bacillus* y *Vibrios* mayormente. Entre los filos identificados predominan bacterias Gram positivas de la familia *Vibrionaceae*, lo que podría significar una simbiosis específica o estrechamente relacionada de este microorganismo con la esponja, puesto que se reportaron en diferentes tiempos a lo largo de la colecta anual.
- Se logró identificar la presencia del gen *srfA* en 3 cultivos aislados: C2c1 (*Paenibacillus azoreducens*), C2d1 (*Paenibacillus azoreducens*) y C4a (*Vibrio crassostreae*).
- En el presente trabajo se buscó evaluar la actividad de los cultivos aislados frente a agentes patógenos para el hombre, consiguiéndose reportar actividad en dos cultivos identificadas como *Paenibacillus azoreducens* y *Vibrio crassostreae*, del total de los 21 cultivos aislados.

## VI. RECOMENDACIONES

- El cultivo en placas que se realizó en el presente trabajo nos limitó al aislamiento de bacterias poco exigentes en un medio como TSA, por lo que se recomienda ampliar la investigación haciendo uso de medios de cultivo específicos que permita aislar mayor cantidad de microorganismos simbiotes. Recientemente se está empleando la metagenómica como herramienta fundamental para identificar y caracterizar la composición de las comunidades microbianas asociadas a esponjas marinas. Un estudio metagenómico en esponjas peruanas significaría el primer trabajo de investigación en esta línea de búsqueda de compuestos bioactivos en Perú, con el cual se podría determinar taxones bacterianos específicos de la esponja marina reforzando los conocimientos y avances en el

estudio de biología de las esponjas, sus diversas asociaciones y futuras aplicaciones.

- En cuanto a la identificación bacteriana, recomienda el uso de diversos pares de oligonucleótidos para las bacterias Gram positivas, ya que, por ser un grupo tan variado y diverso entre sí, se dificulta la identificación con un solo par de oligonucleótidos. Así también, la búsqueda de otros compuestos de interés biotecnológico que puedan hallarse en los microorganismos asociados a esponjas marinas.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Águila, R.N., Hernández, C.J., González, B. (2012). Caracterización y bioactividad de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* de un arrecife rocoso del Golfo de California. Resúmenes del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Queretaro, Qro.
- Aguirre L.K, Hooker, Y., Willenz, P. y Hajdu, E. (2011). A new *Clathria* (*Demospongiae*, *Microcionidae*) from Peru occurring on rocky substrates as well as epibiotic on *Eucidaris thouarsii* sea urchins. *Zootaxa*. DOI: 10.11646/zootaxa.3085.1.3
- Allemand D., Osborn D. (2019). Ocean acidification impacts on coral reefs: From sciences to solutions. *Regional Studies in Marine Science*, 28, 100558. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100558>
- Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R., & Müller, W. E. G. (1998). Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria?. *Marine Biology*, 130(3), 529-536.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*. 59(1): 143-169.
- Anjum K., Abbas S.Q., Shah S.A.A., Akhter N., Batool S., Hassan S.S. (2016). Marine sponges as a drug treasure. *Biomolecules & Therapeutics* 24(4):347-362. DOI: 10.4062 / biomolther.2016.067
- Arima K., Kakinuma A., Tamura G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 31(3), 488-494.
- Avendaño-Herrera R., Lody M., Riquelme C.E. (2005). Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 40 (2): 117-125.
- Barnes D. R. (1987). *Zoología de los invertebrados*. 5ª ed. Universidad autónoma de México. Nueva editorial interamericana.

- Barrese V., Tagliatela M. (2013). New advances in beta-blocker therapy in heart failure. *Frontiers in Physiology*. 4:323. DOI: 10.3389/fphys.2013.00323
- Beleneva I. A. (2008). Distribution and characteristics of Bacillus bacteria associated with hydrobionts and the waters of the Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Microbiology*. 77(4), 497-503.
- Bergmann W., Burke D. C. (1956). Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. Spongosine. *The Journal of Organic Chemistry*. 21, 226–228. DOI: 10.1021/jo01108a020
- Bergmann W., Feeney R.J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *The Journal of Organic Chemistry*. 72, 2809–2810. DOI: 10.1021/ja01162a543
- Bergmann W., Feeney R.J. (1951). Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *The Journal of Organic Chemistry*. 16, 981–987. DOI: 10.1021/jo01146a023
- Blunt J. W., Carrol A. R., Copp B. R., Davis R. A., Keyzers R. A., and Prinsep M. R. (2018). Marine natural products. *Natural Products Reports*. 35, 8–53. DOI: 10.1039/C7NP00052A
- Blunt J., Munro M., Upjohn M. (2012) The Role of Databases in Marine Natural Products Research. In: Fattorusso E., Gerwick W., Tagliatela-Scafati O. (eds) *Handbook of Marine Natural Products*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3834-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3834-0_6)
- Botté E.S., Nielsen S., Abdul Wahab M.A., Webster J., Robbins S., Thomas T., Webster N. S. (2019). Changes in the metabolic potential of the sponge microbiome under ocean acidification. *Nature Communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12156-y>
- Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J.A., Valdezate S. (2011). Métodos de identificación bacteria en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. 29(8): 601 – 608.
- Brinkhoff T., Bach G., Heidon T., Liang L., Schlingloff A., Simon M. (2004). Antibiotic production by a Roseobacter clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4):

2560-2565.

- Brusca R.C, Brusca G.J. (2003) Phylum Porifera: The Sponges. Invertebrates. 2° ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 178-208.
- Bruto M., James A., Petton B., Labreuche Y., Chenivresse S., Alunno-Bruscia M., Polz M. & Le Roux, F. (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME journal*, 11(4), 1043-1052.
- Burgess J.G. Jordan E.M. Bregu M. Mearns-Spragg A. Boyd K.G. (1999) Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.*70, 27–32.
- Burgess J.G., Jordan E.M., Bregu M., Mearns-Spragg A., Boyd K.G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.* 70: 27-32
- Burja A.M., Hill R.T. (2001). Microbial symbionts of the Australian Great Barrier Reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia*. 461: 41-47.
- Cabral R.B., Rollan G. (2018). How important are coral reefs to food security in the Philippines? Diving deeper than national aggregates and averages. *Marine Policy*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.02.007>
- Cao X.H., Liao Z.Y., Wang C.L., Yang W.Y., Lu M.F. (2009). Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40, 373-379.
- Carballo J., Gómez P., Cruz J. (2014). Biodiversidad porífera en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 143 – 153 p.
- Cárdenas C. A., Font A., Steinert G., Rondon R., and González-Aravena M. (2019). Temporal stability of bacterial communities in antarctic sponges. *Frontiers in Microbiology*. 10:2699. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02699
- Cárdenas C.A., González-Aravena M., Font A., Hestetun J.T., Hajdu E., Trefault N., Malmberg M., Bongcam-Rudloff E. (2018). High similarity in the microbiota of cold-water sponges of the Genus *Mycale* from two different geographical areas. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.4935>

- Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A., Prinsep M.R. (2019). Marine natural products. *Natural Products Reports*. 36, 122–173.
- Carson M.A., Nelson J., Cancela, M.L., Laizé V., Gavaia, P.J., Rae, M., Svenja H., Eugene V., Brendan F.G., Susan A.C. (2018). Screening for osteogenic activity in extracts from Irish marine organisms: the potential of *Ceramium pallidum*. *PLOS One*. 14(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0207303
- Chavéz-Crooker Pamela, Contreras Vera Andrea, Cavour Cuevas Ángela. Microorganismos marinos y sus aplicaciones industriales: El potencial chileno en el mar. En Biodiversidad Marina: valoración, usos y perspectivas: ¿Hacia dónde va Chile? Primera edición. Santiago de Chile. Editorial Universitaria S.A. 2005. 355-366
- Chiocchini C. (2006). The surfactin biosynthetic complex of *Bacillus subtilis*: COM domain-mediated biocombinatorial synthesis, and single step purification of native multi-modular NRPSs and multi-enzyme complexes. Department of Biology. Philipps University of Marburg.
- Cleary D.F.R., Swierts T., Coelho F.J.R.C., Polónia A.R.M., Huang Y. M., Ferreira M.R.S., Sumaitt P., Carvalheiro L., Van der Ent V., Jinn-Pyng U., Newton C.M., de Voogd Nicole. (2019). The sponge microbiome within the greater coral reef microbial metacommunity. *Nature Commun*. 10:1644. DOI: 10.1038/s41467-019-09537-8
- Cohn F. (1872). Untersuchungen Über Bakterien. Beitrage zur Biologie Pflanz. 1:127-1224.
- Cóndor-Luján, B., Azevedo, F., Hajdu, E., Hooker, Y., Willenz, P., & Klautau, M. (2019). Tropical Eastern Pacific Amphoriscidae Dendy, 1892 (Porifera: *Calcarea: Calcaronea: Leucosolenida*) from the Peruvian coast. *Marine Biodiversity*. 49(3). DOI:10.1007/s12526-019-00946-y
- Correa J.A., Sánchez P.A. (1996). Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia*. 326-327: 89-96.
- Cortes, J., O’Shaughnessy, J., Loesch, D., L Blum J., T Vahdat L., Petrakova K., Chollet, F., Manikas, A., Diéras, V., Delozier, T., Vladimirov, V., Cardoso, F., Han, Koh, Bougnoux, P., E Dutcus, C., Seegobin, S., Mir, D., Meneses, N, Wanders, J,

- Twelves, C. (2011). Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *The Lancet*, 377(9769), 914–923. DOI: 10.1016/s0140-6736(11)60070-6
- Cuervo L.J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp.* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Bogotá: Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Custódio M.R., Hajdu E., Muricy G. Cellular dynamics of in vitro allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida). *Marine Biology*. 144, 999–1010 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1265-7>
- Dale J., Park S. (2004). *Molecular Genetics of Bacteria*. 4th ed. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Demain A.L.; Adrio J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38(1): 41-55
- Desai J., Banat I. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, 61(1), 47–64.
- Dobretsov S.; Qian P.Y. (2004). The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya sp.* in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 299: 35-50.
- Donadio S., Monciardini P., Sosio M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Natural Product Reports*. 24(5), 1073. DOI: 10.1039/b514050c
- Duckworth A. R. (2009). Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: a review. *Marine Biotechnology*. 11(6): 669-679.
- Dudley-evans T., Hamp-lyons L., Master P., Preece R., Johns A., Belcher D., Perrin, M. (2012). *Advances in Marine Biology: The physiology and molecular biology of sponge tissues* (Vol. 62). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90094-6)
- Easson C.G., Thacker R.W. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers Microbiology*. 5:532. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00532

- Easson, C.G., Chaves-Fonnegra, A., Thacker, R.W., Lopez, J.V. (2020). Host population genetics and biogeography structure the microbiome of the sponge *Cliona delitrix*. *Ecology and Evolution*. 10:4. DOI: 10.1002/ece3.6033
- Enticknap, J. J., M. Kelly, O. Peraud, and R. T. Hill.2006. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*72:3724-3732.
- Fakruddin Md. (2012) Biosurfactant: Production and Application. *J Pet Environ Biotechnol* 3:124. doi:10.4172/2157-7463.1000124
- Faulkner D. J., Harper M.K., aygood M.G., Salomon C.E., Schmidt E.W. (2000). Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. *Drugs from the Sea*, DOI: 10.1159/000062486.
- Faulkner D.J. (2000). Highlights of marine natural products chemistry (1972– 1999). *Natural Products Reports*. 17, 1–6. DOI: 10.1039/A909113K
- Faulkner D.J. (2001) Marine natural products. *Natural Products Reports*. 19, 1–48
- Fieseler L., Horn M., Wagner M., Hentschel U. (2004). Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in Marine sponges. *American Society for microbiology*. 2:3724-3732p
- Frank J.A., Reich C.I., Sharma S., Weisbaum J.S., Wilson B.A., Olsen G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial *16S rRNA* genes. *Applied And Environmental Microbiology*, 74 (8): 2461-70. DOI: 10.1128 / AEM.02272-07
- Friedrich A.B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., Hentschel U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*. 134: 461-470.
- Friedrich V. Wintzingerode, Ulf B. Göbel, Erko Stackebrandt, (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 21(3): 213–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>
- Fu W.T., Sun L., Zhang X., Zhang W. (2006). Potential of the marine

- sponge Hymeniacion perleve as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture ecosystems. *Biotechnology and Bioengineering*. 93:1112- 1122. DOI: 10.1002/bit.20823
- Funayama N., Nakatsukasa M., Karaku S., Takechi K., Doji M., Iwabe N., Miyata T., Agata K. (2005). Isolation of Ef Silicatein and Ef Lectin as Molecular Markers for Sclerocytes and Cells Involved in Ante Immunity in the Freshwater Sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Zoological Science*. 22: 1113-1122. DOI: 10.2108/zsj.22.111.
- Gasi3n F., Fernandez A. (2013). Picaduras y mordeduras de animales: tratado de toxicolog3a cl3nica. Primera edici3n. Barcelona. Bubok Publishing S.L.
- Gomes N.G., Dasari R., Chandra S., Kiss R., Kornienko A. (2016). Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. *Marine drugs*. 14(5): 98.
- Gontang E.A., Fenical W., Jensen P.R. (2007). Phylogenetic diversity of Gram-Positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 73(10): 3272 – 3282.
- Gonz3lez R. (2006). Diversidad microbiana e identificaci3n de genes asociados a la producci3n de metabolitos secundarios en bacterias asociadas a esponjas marinas. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. P-3
- Grossart H.P., Schlingloff A., Bernhard M., Simon M., Brinkhoff T. (2004). Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea, *FEMS Microbiology Ecology*. 47: 3, 387–396. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00305-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00305-2)
- Gudi3a E.J., Fernandes E.C., Rodrigues A.I., Teixeira J. A., Rodrigues, L.R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in microbiology*. 6, 59.
- Hallam S.J., Konstantinidis K.T., Putnam N., Schleper C., Watanabe Y., Sugahara J., Preston C., de la Torre J., Richardson M.P., DeLong E.F. (2006) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *PNAS*. 103(48): 18296–18301.
- Hardoim P; Costa R; Araujo V; Hajdo E; Pexioto R; Lins U; Rosado U; Elsas D. (2009).

- Diversity of bacterias in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. Brazil. Universidad de Rio de Janeiro.. 14p.
- Hardoim, P., Costa, R., Araujo, V., Hajdo, E., Pexioto, R., Lins, U., Rosado, U., Elsas, D. (2009). Diversity of bacterias in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. Brazil. *American society for microbiology* . 14p.
- Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W. (1998) Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*. 35:1–21
- Hedges S.B., Blair J.E., Venturi M.K., Shoe J.L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology*. DOI: 10.1186 / 1471-2148-4-2
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Anja B., Wagner M., Hacker J. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 4431–4440. DOI: 10.1128/AEM.68.9.4431
- Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., Hacker J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Microbiology Ecology*. 35(3): 305-312
- Hentschel U., Usher K. M., Taylor M.W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*55:167-177.
- Hill M. S., Sacristán-Soriano O. (2017). “Molecular and functional ecology of sponges and their microbial symbionts,” in *Climate Change, Ocean Acidification and Sponges*, eds J. L. Carballo and J. J. Bell (Cham: Springer International Publishing), 105–142. DOI: 10.1007/978-3-319-59008-0\_5
- Hirata Y., Uemura D. (1986). Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry*. 58(5), 701–710. DOI:10.1351/pac198658050701
- Hofrichter R., & Sidri, M. (2001). ‘Ein Mittel für jeden Zweck: der Badeschwamm. Das Mittelmeer Flora, Fauna, Ökologie, Hofrichter R, ed. Spektrum Verlag, Bd, 608-



- Höller U., Wright A.D, Matthee G.F., König G.M., Draeger S., Aust H.-J., Schulz B. (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*. 104: 1354-1365. DOI: 10.1017 / s0953756200003117
- Hooper J.N.A, Lévi C. (1994). Biogeography of indo-west pacific sponges: Microcionidae, Raspailiidae, Axinellidae. *Sponges in time and space*. 191, 212.
- Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M. (2002). Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges. *Systema Porifera*. 1–7. DOI:10.1007/978-1-4615-0747-5\_1
- Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M. (2002a). Clase *Demospongiae* Sollas, 1885. *Systema Porifera*, 15–51. DOI: 10.1007 / 978-1-4615-0747-5\_3
- Hsieh F.C., Li M.C., Lin T.C., Kao, S.S. (2004). Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*. 49, 186–191. DOI: 10.1007 / s00284-004-4314-7.
- Hu Y., Chen J., Hu G., Yu J., Zhu X., Lin Y., Chen S., Yuan J. (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*. 13: 202–221.
- Imhoff J.F., & Stöhr R. (2003). Sponge-Associated Bacteria: General Overview and Special Aspects of Bacteria Associated with *Halichondria panicea*. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 35–57. DOI:10.1007/978-3-642-55519-0\_2.
- Jackson S., Borchert E., O’Gara F., Dobson A. (2015). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. *Current Opinion in Biotechnology*. 33, 176–182.
- Jensen P.R., Fenical W. (1995). The relative abundance and seawater requirements of Gram-positive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microbial Ecology*. 29(3): 249-257
- Jensen P.R., Fenical W. (1996). Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 17:346 – 51. DOI: 10.1007 / bf01574765

- Jimenez P.C., Wilke D.V., Branco P.C., Bauermeister A., Rezende-Teixeira P., Gaudencio S. P., Costa-Lotufo L.V. (2019). Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *Journal of Pharmacology*. 177, 3–27. DOI: 10.1111/bph.14876
- Jin Q., Yu H., Li P. (2018). The evaluation and utilization of marine-derived bioactive compounds with anti-obesity effect. *Current Medicinal Chemistry*. 25, 861–878. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170602082620>
- Kalinovskaya N., Kuznetsova T.A., Ivanova E.P., Romanenko L.A., Voinov V.G., Huth F., Laatsch, H. (2002). Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine Biotechnology*. 4(2): 179–189.
- Kalinovskaya N.I., Kuznetsova T.A., Rashkes Y.V., Milgrom Y.M., Milgrom E.G., Willis R.H., Wood A.I., Kurtz H.A., Carabedian C., Murphy., Elyakov G.B. (1995). Surfactin-like structures of five cyclic depsipeptides from the marine isolate of *Bacillus pumilus*. *Russian Chemical Bulletin* 44(5):951-955. DOI: 10.1007 / bf00696935
- Karuppiyah V., Li Z. (2015). Metagenómica de la esponja marina. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. 457–473. DOI: 10.1007 / 978-3-642-53971-8\_17
- Kasiya T.R., Denoj S. (2021). Iturin and surfactin from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain RKEA3 exhibits antagonism against *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 36, 102125. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102125
- Kennedy J., Baker P., Piper C., Cotter P.D., Walsh M., Mooij M.J., Bourke M.B., Rea M.C., O'Connor P.M., Ross R.P., Hill C., O'Gara F., Marchesi J. R., Dobson A. W. (2009). Isolation and analysis of bacteria from antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish Waters. *Marine Biotechnology*. 11: 384 – 396. DOI: 10.1007 / s10126-008-9154-1
- Kennedy J., O'Leary N. D., Kiran G. S., Morrissey J. P., O'Gara F., Selvin J., Dobson, A.

- D. (2011). Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *Journal of Applied Microbiology*. 111(4): 787-99.
- Keren R., Lavy A. Ilan, M. (2016). Increasing the Richness of Culturable Arsenic-Tolerant Bacteria from *Theonella swinhoei* by Addition of Sponge Skeleton to the Growth Medium. *Microbial Ecology*. 71(4), 873–886. DOI: 10.1007/s00248-015-0726-0
- Kim T.K., Hewavitharana A.K., Shaw P. N., Fuerst J.A. (2006). Discovery of a New Source of Rifamycin Antibiotics in Marine Sponge Actinobacteria by Phylogenetic Prediction. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2118–2125. DOI: 10.1128/aem.72.3.2118-2125.2006
- Konstantinou D., Gerovasileiou V., Voultziadou E., Gkelis S. (2018). Sponges-cyanobacteria associations: Global diversity overview and new data from the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*. 13(3): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195001>
- Koumoutsis A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*. 186, 1084–1096. DOI: 10.1128 / JB.186.4.1084-1096.2004
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., ... Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084–1096. doi:10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004
- Kumar C., John B., Khan S., Lyla P., Kamaruzzaman B., & Jalal K. C. (2013). Cultivable marine bacterial isolates from a sponge *Hyattella cribriformis*. *J. Biol. Sci*, 13(1), 26-32.
- Kumar M.S. (2019). Peptides and peptidomimetics as potential antiobesity agents: overview of current status. *Frontiers in Nutrition*. 6:11. DOI: 10.3389/fnut.2019.00011

- Kumar S., Stecher G., Tamura K., (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 7: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lauckner G. (1980). Diseases of Porifera. *Diseases of marine animals*. 1: 139-165.
- Leal M.C., Sheridan C., Osinga R., Dionísio G., Rocha R.J.M., Silva B., Rosa R., Calado, R. (2014). Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “supply problem” in the initial steps of drug discovery. *Marine drugs*. 12(7): 3929-3952. DOI:10.3390/md12073929
- Lee O.O., Wang Y., Yang J., Lafi F.F., Al-Suwailem A., Qian, P.Y. (2011). Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *ISME*. 5, 650–664. DOI: 10.1038/ismej.2010.165
- Lee O.O., Wong Y. H., Qian P. Y. (2009). Inter-and intraspecific variations of bacterial communities associated with Marine sponges from San Juan Island, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(11): 3513 – 3521. DOI: 10.1128 / aem.00002-09
- Leys S. P., Hill A. (2012). The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues. *Advances in Sponge Science: Physiology, Chemical and Microbial Diversity, Biotechnology*, 1–56. DOI: 10.1016/b978-0-12-394283-8.00001-1
- Li Z. (2019). Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals. *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*. *Marine Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612->
- Li Z., He I., Miao X. (2007). Cultivable bacterial community from South China Sea Sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Current Microbiology*. 7: 113 – 129.
- Lloyd K.G., Steen A.D., Ladau J., Yin J., Crosby L. (2018). Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate earth microbiomes. *Applied and Environmental Science*. 3(5). DOI: 10.1128/mSystems.00055-18
- Long R. Azam F. (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4975–4983.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (1999). Brock. *Biología de los microorganismos*.

Octava edición. Prentice Hall, Madrid. 1064 p.

Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. (2015). Brok Biología de los microorganismos. 14ª Edición. Pearson educación. Madrid – España. 511 – 551.

Maier R.M. (2003). Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 101–121. doi:10.1016/s0065-2164(03)01004-9

Maldonado M., Cortadellas N., Trillas M.I., Rutzler K. (2005). Endosymbiotic yeast maternally transmitted in a marine sponge. *Biological Bulletin*. 209:94-106. DOI: 10.2307/3593127

Martins A., Vieira H., Gaspar H., Santos S. (2014). Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, 12(2): 1066–1101. DOI:10.3390/md12021066

Maxam A.M., Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(2), 560-564.

Mayer A.M.S., Guerrero A.J., Rodríguez A.D., Tagliatela-Scafati O., Nakamura F., Fusetani N. (2019). Marine pharmacology in 2014-2015: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, antiviral, and anthelmintic activities; Affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs* 18:5. DOI: 10.3390/md18010005

McCauley E.P., Piña I.C., Thompson A.D., Bashir K., Weinberg M., Kurz S.L., Crews F. (2020). Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates. *The journal of Antibiotics*. 73, 504–525. DOI: 10.1038/s41429-020-0330-5

Mohamed N.M., Rao V., Hamann M.T., Kelly M., Hill R.T. (2008). Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(13):4133-4143. <https://doi.org/10.1128/AEM.00454-08>

Mohamed N.M., Saito K., Tal Y., Hill R. T. (2010). Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. *ISME Journal*. 4(1), 38–48.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.84>

- Moitinho-Silva L., Bayer K., Cannistraci C. V., Giles E. C., Ryu T., Seridi L., Ravasi T. (2013). Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. *Molecular Ecology*. 23, 1348–1363. DOI: 10.1111/mec.12365
- Moitinho-Silva L., Nielsen S., Amir A., Gonzalez A., Ackermann G. L., Cerrano C., et al. (2017a). Astudillo-García 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., Reveillaud J., Steindler L., Pineda M.C, Marra M., Ilan M., Taylor M.W., Polymenakou P., Erwin P.M, Schupp P.J., et al. The sponge microbiome project. *Gigascience* 6, 1–7. DOI: 10.1093/gigascience/gix077
- Mol V.P.L., Raveendran T.V., Parameswaran P.S. (2009). Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 67-72. DOI: 10.1016 / j.ibiod.2008.07.001
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14(4), 213–223. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>
- Moriarty D.J.W., Hayward A. C. (1982). Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram-negative bacteria in marine sediments. *Microbial Ecology*. 8: 1- 14.
- Müller W.E., Korzhev M., Le Pennec G., Müller I. M., Schröder, H.C. (2003). Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*). *Biomolecular Engineering*. 20: 369-379. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00055-8)
- Müller W.E.G., Grebenjuk V.A., Le Pennec G., Schröder H.C., Brümmer F., Hentschel U., Müller I.M., Breter H. (2004). Sustainable production of bioactive compounds by sponges - cell culture and gene cluster approach: a review. *Marine Biotechnology*. 6, 105–117. DOI: 10.1007/s10126-002-0098-6
- Murphy B.T., Jensen P.R., Fenical W. (2012). The chemistry of marine bacteria. *Handbook of Marine Natural Products*. DOI: 10.1007/978-90-481-3834-0\_3

- Muscholl-Silberhorn A., Thiel V., Imhoff J. (2008). Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*. 55: 94-106.
- Nadyne A.L. (2006). Identification, phylogenetic characterization, and preliminary bioactivity screening of bacteria isolated from *Suberites zeteki*, a Hawaiian sponge. *Journal of Young Investigators*. 15:(7) <http://www.jyi.org/research/re.php?id=869>.
- Nakano M., Marahiel M., & Zuber P. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170(12): 5662–5668. DOI: 10.1128/jb.170.12.5662-5668.1988
- Nakano Michiko., Corbell N., Besson J., & Zuber P. (1992). Isolation and characterization of *surfactin*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*. 232(2): 313–321. <https://doi.org/10.1007/bf00280011>
- Nanjundan J., Ramasamy R., Uthandi S., & Ponnusamy M. (2019). Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microbial pathogenesis*, 128, 374-380.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*. 17:215 – 34. DOI: 10.1039/a902202c.
- Nigrelli R.F., Stempien M.F., Ruggieri G.D., Liguori V.R., Cecil J.T. (1967). Substances of potential biomedical importance from marine organisms. *Federation Proceeding*. 26(4):1197 – 205
- Osinga R., Kleijn R., Groenendijk E., Niesink P., Tramper J., Wijffels, R.H. (2001). Development of in vivo sponge cultures: particle feeding by the tropical sponge *Pseudosuberites aff. andrewsi*. *Marine Biotechnology*. 3(6): 544-554.
- Pape T., Hoffmann F., Quéric N.V., Juterzenka J.R., Michaelis W. (2006). Dense populations of *Archaea* associated with the *demosponge* *Tentorium semisuberites* Schmidt, 1870, from Arctic deep-waters. *Polar Biology* 29 (8): 662–667.
- Parera-Valadez Y. (2012). Identificación y actividad antibacteriana de bacterias cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp. de la Bahía de la Paz, B. C. S., México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 76 p

- Perdicaris S., Vlachogianni T., Valavanidis A. (2013). Bioactive Natural substances from marine sponges: new developments and prospects for future pharmaceuticals. *Natural Products Chemistry*. 3:114. DOI: 10.4172/2329-6836.1000114
- Pesci E.C., Milbank J.B.J., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P., Iglewski B.H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. USA96, 11229–11234.
- Petit C.A., Bosshard P.P., Brandt M.E., Clarridge J.E., Feldblyum T.V., Foxall P., Procop G. (2008). Criterios de interpretación para la identificación de bacterias y hongos mediante secuenciación de ADN diana; directriz aprobada. *Documentos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)*. 28, 19087-1898.
- Pírez M., Mota M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. 3ª edición. Temas de bacteriología y virología médica. Montevideo. 25-45.
- Pita L., Erwin P. M., Turon X., López-Legentil, S. (2013). Till death do us part: stable sponge-bacteria associations under thermal and food shortage stresses. *PLoS One* 8:e0080307. DOI: 10.1371/journal.pone.0080307
- Pita L., Rix L., Slaby B. M., Franke A., Hentschel U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome*. 6:46. DOI: 10.1186/s40168-018-0428-1
- Plaza G., Chojniak J., Rudnicka K., Paraszkiwicz K., & Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 1023-1034.
- Prasad P., Aalbersberg W., Feussner K.D., Van Wagoner R.M. (2011). Papuamides E and F, cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Melophlus* sp. *Tetrahedron*. 67(44):8529-8531. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.08.100>
- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F., DeLong E.F. (1996). A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov. sp. nov. *PNAS*. USA 93: 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6241>
- Proksch P., Edrada R.A., Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 125–134. DOI: 10.1007/s00253-002-1006-8



- Raczkowski J. V. (2010). Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges of Puerto Rico, and their metabolic profiles. Tesis de Maestría. Universidad del Norte de Carolina, Estados Unidos. 137 p.
- Radax R., Hoffmann F., Rapp T.R., Leninger S., Schleper C. (2012). Ammonia-oxidising Archaea as main drivers of nitrification in cold-water sponges. *Environmental Microbiology*. 14(4): 909–923. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02661.x>
- Rasiya K., & Sebastian, D. (2021). Iturin and surfactin from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain RKEA3 exhibits antagonism against *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102125.
- Reveillaud J., Maignien L., Eren M.A., Huber, J.A., Apprill A., Sogin, M.L., Vanreusel A. (2014). Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *ISME J*. 8, 1198–1209. DOI: 10.1038/ismej.2013.227
- Rocha M.P. (2017). Produção de surfactina por *Bacillus Subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. Tesis de maestría. Universidad federal de Rio Grande do Norte- UFRN. <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/23394>
- Rodicio M., Mendoza M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Science Direct*. 22(4), 238–245. DOI:10.1016/s0213-005x(04)73073-6
- Rodicio M., Mendoza M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22: 238-45. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6)
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 57(4), 609-618.
- Rodriguez E., Gamboa M., Hernández F., García J. (2006). Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. Editorial EUCR, Costa Rica. 370 p
- Rodríguez-Marconi S., De la Iglesia R., Díez B., Fonseca C.A., Hajdu E., Trefault, N. (2015). Characterization of bacterial, archaeal and eukaryote symbionts from antarctic sponges reveals a high diversity at a three-domain level and a particular signature for this ecosystem. *PLoS One*. 10:e0138837. DOI:

10.1371/journal.pone.0138837

- Rodríguez-Santiago B., Armengol L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diagnóstico prenatal*. 23(2), 56-66.
- Rosenfeld W.D., ZoBell C.E. (1947). Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of bacteriology*. 54:393 – 8.
- Rotter, A., Barbier, M., Bertoni, F., Bones, A. M., Cancela, M. L., Carlsson, J., *et al.* (2021). The essentials of marine biotechnology. *Frontiers In marine science*. 8, 158.
- Ruppert E.E., Barnes R.D. (1994). Invertebrate zoology. 6th ed. Saunders College Publishing, Fort Worth, TX.
- Sacristán-Soriano O., Pérez Criado N., Avila, C. (2020a). Host Species Determines Symbiotic Community Composition in Antarctic Sponges (Porifera: *Demospongiae*). *Frontiers in Marine Science*. DOI: 10.3389/fmars.2020.00474
- Sacristán-Soriano O., Turon X., Hill M. (2020b). Microbiome structure of ecologically important bioeroding sponges (family *Clionaidae*): the role of host phylogeny and environmental plasticity. *Coral Reefs*. DOI: 10.1007/s00338-020-01962-2
- Sakai R., Higa T., Jefford, C. W., Bernardinelli, G. (1986). Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 108(20), 6404–6405. DOI: 10.1021/ja00280a055
- Sanger F., G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe y M. Smith. 1977b. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687–695.
- Sanger F., S. Nicklen y A.R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Santavy D.L. Colwell R.R. (1990). Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Marine Ecology Progress Series*. 67: 73-82
- Schippers, K. J., Sipkema, D., Osinga, R., Smidt, H., Pomponi, S. A., Martens, D. E., & Wijffels R.H. (2012). Cultivation of Sponges, Sponge Cells and Symbionts:

- Achievements and Future Prospects. *Advances in marine biology*. 62: 273.
- Schirmer, A., R. Gadkari, C. D. Reeves, F. Ibrahim, E. F. Delong, and C. R. Hutchinson. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4840-4849.
- Schmitt S., Deines P., Behnam F., Wagner M., Taylor M. W. (2011). Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology*. 78, 497–510. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01179.x
- Schmitt S., Tsai P., Bell J., Fromont J., Ilan M., Lindquist N., Perez T., Allen R., Schupp P.J., Vacelet J., Webster N., Hentschel U., Taylor M.W. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME*. 6, 564–576. DOI: 10.1038/ismej.2011.116
- Selvin J.R., Gandhimathi G., Seghal Kiran S., Shanmugha Priya, Ravji T.R., Hema T.A. (2009). Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: Isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgoland Marine Research*. 63: 239-247.
- Sen R. (2010). Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. *Biosurfactants*. 316-323.
- Sfanos K., Harmody D., Dang P., Ledger A., Pomponi S., McCarthy P., Lopez, J. (2005). A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic and applied microbiology*. 28(3), 242-264.
- Shinde P., Banerjee P., Mandhare A. (2019). Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 29(4), 283–309. DOI: 10.1080/13543776.2019.1598972
- Siegl A., Kamke J., Hochmuth T., Piel J., Richter M., Liang C., Hentschel U. (2011). Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME Journal*. 5(1): 61– 70. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.95>
- Simister R.L., Deines P., Botté E.S., Webster N.S., Taylor, M. W. (2012). Sponge-specific clusters revisited: A comprehensive phylogeny of sponge-associated

- microorganisms. *Environmental Microbiology*. 14(2), 517–524.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02664.x>
- Simpson T.L. (1984). *The cell biology of sponges*. Springer-Verlag, New York, NY.
- Singh P., Cameotra S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS in Biotechnology*. 22(3), 142-146.
- Sipkema D., Franssen M.C., Osinga R., Tramper J., Wijffels, R.H. (2005). Marine sponges as pharmacy. *Marine biotechnology*, 7(3), 142.
- Slaby B.M., Franke A., Rix L., Pita L., Bayer K., Jahn M. T., Hentschel U. (2019). “Marine sponge holobionts in health and disease,” in *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*, ed. Z. Li (Dordrecht: Springer), 81–104. DOI: 10.1007/978-94-024-1612-1\_7
- Snyder L., Champness W. (2003). *Molecular Genetics of Bacteria*. 2<sup>a</sup> Ed. Washington, DC. Address Editorial.
- Stackebrandt E., Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and *16S* rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary*. 44:846-9.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stead P., Hiscox S., Robinson P.S., Pike N.B., Sidebottom P.J., Roberts A.D., Taylor N.L, Wright A.E, Pomponi S.A, Langley D. (2000). Eryloside F, a novel penasterol disaccharide possessing potent thrombin receptor antagonist activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10: 661–664. DOI: 10.1016/s0960-894x(00)00063-9
- Steinert G., Taylor M.W., Deines P., Simister R.L., de Voogd, N.J., Hoggard M., Schupp P.J. (2016). In four shallow and mesophotic tropical reef sponges from guam the microbial community largely depends on host identity. *PeerJ*. 4:e1936. DOI: 10.7717/peerj.1936
- Steinert G., Wemheuer B., Janussen D., Erpenbeck D., Daniel R., Simon M., Brinkhoff T., Schupp P.J. (2019). Prokaryotic diversity and community patterns in antarctic continental shelf sponges. *Frontiers in Marine Science*. 6, 1–15. DOI:

10.3389/fmars.2019.00297

Storr J. F. (1957). The sponge industry of Florida. Marine Laboratory, University of Miami.

Sunshine Florio de Real. (2012). Tendencias de la biotecnología. Revista Vinculando. [https://vinculando.org/articulos/sociedad\\_america\\_latina/tendencias-de-la-biotecnologia.html](https://vinculando.org/articulos/sociedad_america_latina/tendencias-de-la-biotecnologia.html).

Surget G., Roberto V.P., Le Lann K., Mira S., Guérard F., Laizé V., Poupart N., Leonor Cancela M. (2017). Marine green macroalgae: a source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. *Journal of Applied Phycology*. 29, 575–584. DOI: 10.1007/s10811-016-0968-3

Swaathy, S., Kavitha, V., Pravin, AS, Mandal, AB y Gnanamani, A. (2014). Degradación mediada por tensioactivos microbianos de antraceno en fase acuosa por *Bacillus licheniformis* marino MTCC 5514. *Biotechnology Reports* , 4 , 161-170.

Taggart J.B., Hynes R. A., Prodöuhl P. A., Ferguson A. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish biology*. 40(6), 963-965.

Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(2), 295–347. DOI:10.1128/mmbr.00040-06

Taylor M.W., Schupp P.J., Dahllöf, I., Kjelleberg S., Steinberg P.D. (2004). Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*. 6:121-130. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00545.x.

Taylor M.W., Schupp P.J., R. de Nys, Kjelleberg S., Steinberg P.D. (2005). Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environmental Microbiology*. 7: 419-433. DOI:10.1111/j.1462- 2920.2004.00711.x

- Thiel V., Neulinger S.C., Staufenberger T., Schmaljohann R., Imhoff J.F. (2007). Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol Reviews*. 59(1): 47–63
- Thomas T., Moitinho-Silva L., Lurgi M., Björk J. R., Easson C., Astudillo-García C., Olson K.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., Lopez J.V, Taylor M.W, Thacker R.W, Montoya J.M, Hentschel U., Webster N. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*. 7:11870. DOI: 10.1038/ncomms11870
- Thomas T.R., Kavlekar D.P., LokaBharathi P.A. (2010). Marine drugs from sponge-microbe association-a review. *Marine Drugs*. 8, 1417-1468. DOI: 10.3390/md8041417
- Topor Z.M., Rasher D.B., Duffy J.E., Brandl S. J. (2019). Marine protected areas enhance coral reef functioning by promoting fish biodiversity. *Conservation Letters*, (November 2018), 1–9.
- Tortora G, Funke B., Case C. Introducción a la microbiología. (2007). 9na edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires- Argentina. 2 – 24.
- Tresa R., Devanand T., Kavlekar P., LokaBharathi P. (2010). Marine Drugs from Sponge Microbe Association. A Review. *Marine Drugs*. 8, 1417-1468.
- Trincon A. (2011). Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. *Marine Drugs* 9, 478–499. DOI: 10.3390/md9040478
- Trivedi S., Aloufi A., Ansari A., Ghosh S. (2015). Role of DNA Barcoding in Marine Biodiversity Assessment and Conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(2), 161 – 171. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.001>
- Vacelet J. (1975). Etude en microscopie electronique de l'association entre bacteries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell*. 23:271-288.
- Vacelet J., Donandey C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.30:301-314. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(77\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(77)90038-7)
- Vacelet, J., & Gallisian, M. F. (1980). Virus-like particles in a marine sponge *Verongia*

- cavernicola. In Colloque de la Societe Francaise de Microbiologie. *Section Virologie*. 75-Paris (France).
- Valdelamar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. (2011). Secuenciación de fragmentos de ADN.
- Van Soest R., Boury-Esnault N., Vacelet J., Dohrmann M., Erpenbeck D., De Voogd N. J., Santodomingo N., Vanhoorne B., Kelly M., Hooper, J. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035105>
- Van Soest R.W.M., Boury-Esnault N., Hooper J.N.A., Rützler K., de Voogd N.J., Alvarez de Glasby B., Hajdu E., Pisera A.B., Manconi R., Schoenberg C., Klautau M., Picton B., Kelly M., Vacelet J., Dohrmann M., Díaz M.-C., Cárdenas P., Carballo J. L. (2016). World Porifera database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2016-09-17
- Van Soest R.W.M., Braekman J.C. (1999). Chemosystematics of Porifera: a review. *Memoirs of the Queensland Museum* 44:569-598.
- Vaz D.A., Gudina E.J., Alameda E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 89, 167-174.
- Vieira V., Silveira E. & Barbosa B. (2018). Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 21(6-8), 382-399.
- Sará M., Bavestrello G., Cattaneo-Vietti R., Cerrano C. (1998). Endosymbiosis in sponges: relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis*. 25:57-70.
- Vijayaraj R., Altaff K., Rosita A.S., Ramadevi S., Revathy J. (2020). Bioactive compounds from marine resources against novel corona virus (2019-nCoV): in silico study for corona viral drug. *Natural Product Research*. DOI: 10.1080/14786419.2020.1791115
- Villarreal, M. F., Villa, E. D., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).

DOI: 10.18781/r.mex.fit.1706-5

- Vogel S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proceedings of the national academy of science. USA*. 74:2069-2071. DOI: 10.1073/pnas.74.5.2069
- Voultsiadou E. (2007). Sponges: an historical survey of their knowledge in Greek antiquity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 87(6): 1757-1763
- Wade W. (2002). Unculturable bacteria-the uncharacterized organisms that cause oral infections. *Journal of the royal society of medicine*. 95,81–83. DOI: 10.1258/jrsm.95.2.81
- Wahl M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*. 58: 175-189.
- Ward D.M., Weller R., Bateson, M.M. (1990). *16S rRNA* sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 345: (6270): 63-65
- Webster N. S., Taylor M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: Love and other relationships. *Environmental Microbiology*. 14(2): 335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x>
- Webster N. S., Taylor M. W., Behnam F., Lückner S., Rattei T., Whalan S., Horn M., Wagner M. (2010). Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environmental Microbiology*. 12, 2070–2082. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02065.x
- Webster N.S., Taylor M.W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology*. 14, 335–346. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x
- Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: Love and other relationships. *Environmental Microbiology*, 14(2), 335–346. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x>
- Weisz J.B., Hentschel U., Lindquist N., Martens C.S. (2007). Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Marine Biology*. 152: 475-483.



- Wilcox M.H. Finch R.G. Smith D.G.E. Williams P. Denyer S.P. (1991) Effects of carbon dioxide and sub-lethal levels of antibiotics on adherence of coagulase-negative staphylococci to polystyrene and silicone rubber. *J. Antimicrob. Chemother.* 27, 577–587.
- Wilderman N. (2012). Distribución y estructura comunitaria de esponjas marinas en parches arrecifales y pastos marinos de Golfo de Venezuela. Tesis para magister. Venezuela. Universidad de Zulia. 98p.
- Wilkesman, G. J. (2007). Microbial symbiosis in marine sponges: Over view on ecological aspects. *Ciencia. Venezuela.* 11p.
- Wilkinson C.R. (1978a). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology.* 49, 161-167.
- Wilkinson C.R. (1978b). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Marine Biology.* 49, 177-185.
- Wilkinson C.R. (1983). Net primary productivity in coral reef sponges. *Science.* 219, 410-412.
- Woese C.R., Stackebrandt E., Macke T.J., Fox G.E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology.* 6, 143-51. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3)
- Woo P.C., Lau S.K., Teng J.L., Tse H., Yuen K.Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection.* 4, 908-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Yuan L., Zhang S., Wang Y., Li Y., Wang X., Yang Q. (2018). Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses. *Journal of virology.* 92(21), e00809-18.
- Zobell C.E. (1946). Marine microbiology. A monograph on hydrobacteriology. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 240 p.

## VIII. ANEXOS

### **ANEXO 1. PROTOCOLO DE LAMINAS DE ESQUELETO DE ESPONJAS MARINAS**

1. Separar un fragmento de esponja.
2. Colocar el fragmento en un tubo de ensayo con hipoclorito de sodio.
3. Agitar suavemente.
4. Esperar hasta que la materia orgánica se disuelva y las espículas sedimenten.
5. Quitar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
6. Agregar 1 ml (aproximadamente) de agua destilada y agitar suavemente.
7. Esperar a que las espículas sedimenten nuevamente y retirar el sobrenadante.
8. Repetir el paso 6 y 7 tres o cuatro cinco veces (lavado).
9. Agregar 1 ml (aproximadamente) de alcohol absoluto y agitar suavemente.
10. Esperar a que las espículas sedimenten y retirar el sobrenadante.
11. Repetir el paso 9 y 10 dos veces (deshidratación).
12. Resuspender las espículas en alcohol absoluto (0.5mL, aproximadamente).
13. Colocar un poco de la muestra en la lámina.
14. Con ayuda de una pinza de madera, flamear la lámina.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN (Taggart, 1992) MODIFICADO

#### Lavado para eliminar el medio

1. Centrifugar a 1380g a 4°C por 10 minutos.
2. Extraer el sobrenadante y quedarse únicamente con el pellet.
3. Agregar 500ul de solución PBS y llevar a vortex para homogenizar la muestra. Posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 1 minutos y descartar el sobrenadante. Repetir este paso por tres veces.

#### Día 1

4. Al pellet obtenido agregar 300ul de solución 1. Luego congelar a -50°C por media hora.
5. Pasado los 30 minutos, sacar los tubos eppendorf y colocarlos a temperatura ambiente. Posteriormente agregar 10ul de proteinasa K (10mg/ul).  
**Nota:** los tubos con la solución 1, al salir de la congeladora tiene una coloración blanca lechosa. Esperar hasta que el líquido se vuelva transparente.
6. Incubar durante toda la noche a 37°C en el mini incubador, previo sellado con Parafilm en cada tubo.

#### Día 2

7. Agregar 5ul de RNAsa MIX A1/T1 (2mg/ml), a cada tubo, mezclar bien con ayuda del tip, después incubar a 37°C por 90 minutos en un mini incubador con movimiento (600rpm).
8. Agregar 400ul de fenol equilibrado a cada tubo en la campana de gases. Mezclar bien por medio de inversiones y luego colocar en un mini incubador por 20 minutos a temperatura de 27°C y 600rpm.
9. Agregar 400ul de cloroformo a cada tubo en la campana de gases. Mezclar bien por medio de inversiones y luego colocar en un mini incubador por 20 minutos a temperatura de 27°C y 600rpm.
10. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 12000 rpm.
11. Cuidadosamente remover 200ul del sobrenadante, usando un tip de boca ancha (cortar los tips de 200ul creando una boca ancha), a un tubo eppendorf nuevo.  
**Nota:** no tocar el material de la interfase.

- 12.** Agregar 900ul de etanol 92% frio. Mezclar vigorosamente por inversión. El ADN debería precipitar, dejarlo reposar por tres o cinco minutos y luego centrifugar por 5 minutos a 12000rpm. Posteriormente retirar el etanol.
- 13.** Agregar 1000ul de etanol 70% frio. Agitar suavemente por medio de inversiones, luego colocar en mini incubador en movimiento por 30 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar por cinco minutos a 12000rpm.
- 14.** Retirar el etanol de los tubos cuidadosamente y si es necesario hacer uso de los tips.
- 15.** Permitir que el ADN se seque colocándolos a temperatura ambiente. También es recomendable colocarlo a 50°C por 15 minutos para eliminar todo residuo de etanol.
- 16.** Re-suspender el ADN en 30ul de Buffer TE.
- 17.** Colocar los tubos a 37°C por media hora o más para que el ADN se disuelva. Luego cuantificar o congelar a -20°C.

### ANEXO 3

**Secuencia:** A3

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio alginolyticus strain TV11*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 563

```
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAAC
CATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGT
AGTTAATAGCTGCATTAYTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCC
GGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAG
A
```

**Secuencia:** LB2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio harveyi strain SETBT5*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 529

```
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAAC
CATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAAGGGCTACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGT
AGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCC
GGGGCTCAACCTCGGAAT
```

**Secuencia:** c2a2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio sp. strain GAMALI SWC*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 562

GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACC  
ATTGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGA  
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG  
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTA  
GTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT  
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCG  
GGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGA

**Secuencia:** E2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio sp. strain 201707CJKOP-Y96*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 562

GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACC  
ATTGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTTCGGGCCAAAGAGGGGGA  
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG  
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGCGGATGT  
GTTAATAGCGCATTTCGTTTACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT  
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCG  
GGGCTCAACCTCGGAATTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGA

**Secuencia:** E3

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio harveyi strain DS1907-aSP\_2\_1*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 562

GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGGTGTGGGGGATAACC  
ATTGAAACGATGGCTAATACCGCATAATACCTACGGGTCAAAGAGGGGGA  
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG  
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTA  
GTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT  
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCG  
GGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGA

**Secuencia:** O3

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus zhangzhouensis strain 105S01*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 529

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC  
GGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
TGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTA  
ACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGG

**Secuencia:** T2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus zhangzhouensis strain 105S01*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 541

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC  
GGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
TGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTA  
ACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAAC

**Secuencia:** O4

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus altitudinis strain O6*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 537

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC  
GGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA

CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTA  
ACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG

**Secuencia:** c2a1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio alginolyticus strain TV11*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 564

GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAA  
CCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATRATGCCTACGGGCCAAAGAGGGG  
GACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA  
TCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTG  
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTG  
TAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAAT  
TACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCC  
CGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTA  
GA

**Secuencia:** C2c1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Paenibacillus azoreducens strain VPTFN04*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 605

TGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGCAAGACCGGGATAACTAGCGGAAAC  
GTTAGCTAATACCGGATAATTTATCGCTTTCATGAAGCGGTAATGAAAGA  
CGGAGCAATCTGTCACTTGCAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
ACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA  
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGACCG  
TTAGAGTAACTGCTAACGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCGCTTAAGTCTGGTGTTTAAGG  
CCAAGGCTCAACCTTGGTTCGCACTGGAAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAA  
GAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT



**Secuencia:** c2d1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Paenibacillus azoreducens J34TS1*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 555

AGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGCAAGACCGGGATAACTAGCGGAAACGT  
TAGCTAATACCGGATAATTTATCGCTTTGCATGAAGCGGTAATGAAAGACG  
GAGCAATCTGTCACTTGCAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA  
GGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAAC  
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGACCGTTA  
GAGTAACTGCTAACGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCGCTTAAGTCTGGTGTTTAAGGCCA  
AGGCTCAACCTTGGTTCGCACTGGAACTGGGTGACTTGAGTGCAG

**Secuencia:** C4a

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio crassostreae strain 1-15*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 556

ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCYTGATGTGGGGGATAACCATTGG  
AAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTC  
GGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG  
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAGCGTT  
AATAGCGYTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGG  
CTCAACCTCGGAAGTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTAGAGTACTGTAG

**Secuencia:** LB1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus sp. SPB7*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 552

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT  
AATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTC  
GGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA

TGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCRAA  
TAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGACAG

**Secuencia:** A4

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus zhangzhouensis strain 105S01*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 530

TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA  
GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGT  
TTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT  
AATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG  
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAG  
TAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG  
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG  
CTCAACCGGGGAGGGTCATT

**Secuencia:** B1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio sp. strain PH44*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 553

GGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAA  
ACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGG  
GCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA  
GGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG  
GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGYGGTGTTCGTTAAT  
AGCGGCRTCGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  
GTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTC  
AACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTA

**Secuencia:** C2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio fluvialis strain A8*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 559

GGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATT  
GGAAACGATGGCTAATACCGCATGATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCT  
TCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG  
GTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG  
CCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA  
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGTATCGT  
TAATAGCGGTATCTTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACT  
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG  
GCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGA

**Secuencia:** F2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio alginolyticus strain 1675*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 529

GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATT  
GGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCT  
TCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG  
GTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG  
CCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA  
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGGTGT  
TAATAGCWGTATYATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACT  
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG  
GCTCAACCTCGGAATAGCA

**Secuencia:** D1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio sp. strain 201707CJKOP-Y105*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 558

GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTG  
GAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCT  
CGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAAGGGCTCACCAAGGCRACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC  
CACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTRGTGTCTGTTA

ATAGCTGCRRTTAATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGC  
TCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGA

**Secuencia:** D3

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Vibrio fluvialis strain A8*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 555

ACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCYGATGTGGGGGATAACCATTGG  
AAACGATGGCTAATACCGCATGATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTC  
GGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTRTGAAG  
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCMGTGAGGAAGGAGGTRTCGTT  
AATAGCGGTATCTTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGG  
CTCAACCTCGGAATTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTGA

**Secuencia:** T1

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Bacillus zhangzhouensis strain 105S01*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 529

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC  
GGCTGCTACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
TGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTA  
ACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
CAACCGGGGAGGGTCATTGG

**Secuencia:** O2

**Gen:** 16S

**Especie más cercana:** *Oceanobacillus picturae strain B5*

**Lugar y fecha de colecta:** Balneario Tortugas – Casma, 2018

**Lugar de Secuenciación:** Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción - UNS

**No. De Bases:** 527

GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC  
CCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTTTCTTTTGCATAAAGGAA  
AGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATT  
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG  
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC  
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAA  
GAACAAGTTGGGTAGTAACTGACCCARCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGAT  
GTGAAATCTCGCGGCTC

Aislamiento, identificación  
molecular usando el gen ADNr  
16 y actividad biológica de  
bacterias asociadas a esponjas  
marinas de la clase  
Demospongiae de la playa  
Tortugas

*por* Chauca Astete, Brenda Ketsire Vasquez Cunya, Francisco Alvaro

---

**Fecha de entrega:** 06-jul-2022 12:21p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1867373813

**Nombre del archivo:** INFORME-DE-TESIS-INFORME\_FINAL\_corregido.pdf (2.33M)

**Total de palabras:** 25997

**Total de caracteres:** 160862

# Aislamiento, identificación molecular usando el gen ADNr 16 y actividad biológica de bacterias asociadas a esponjas marinas de la clase Demospongiae de la playa Tortugas

## INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="http://myslide.es">myslide.es</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://Repositorio.unal.edu.co">Repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://fondecyt.gob.pe">fondecyt.gob.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.uns.edu.pe">repositorio.uns.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://docslide.us">docslide.us</a> Fuente de Internet	<1%

9	<a href="http://scielo.conicyt.cl">scielo.conicyt.cl</a> Fuente de Internet	<1 %
10	<a href="http://repositorio.usfq.edu.ec">repositorio.usfq.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://qdoc.tips">qdoc.tips</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://ribuni.uni.edu.ni">ribuni.uni.edu.ni</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://repositorioinstitucional.uabc.mx">repositorioinstitucional.uabc.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://www.os-cfd.ru">www.os-cfd.ru</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://edepot.wur.nl">edepot.wur.nl</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="http://repository.eafit.edu.co">repository.eafit.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://vsip.info">vsip.info</a> Fuente de Internet	<1 %
20	<a href="http://peerj.com">peerj.com</a> Fuente de Internet	<1 %



---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo