



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Antagonismo e Inhibición de la Comunicación Bacteriana  
en Bacterias Cultivables Aisladas de Esponjas Del Caribe  
Colombiano con *Biofouling* y sin *Biofouling***

**Angie Daniela Burgos Toro**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología  
Bogotá, Colombia

2019

**Antagonismo e Inhibición de la Comunicación Bacteriana  
en Bacterias Cultivables Aisladas de Esponjas Del Caribe  
Colombiano con *Biofouling* y sin *Biofouling***

**Angie Daniela Burgos Toro**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias – Microbiología**

Directora:

Dr. Rer. Nat. Catalina Arévalo Ferro  
Profesora Departamento de Biología

Línea de Investigación:

Ecología bacteriana

Grupo de Investigación:

Comunicación y Comunidades Bacterianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología

Bogotá, Colombia

2019

## RESUMEN

Los poríferos y su microbiota simbiote poseen una relación muy estrecha que busca el establecimiento y el mantenimiento de la homeostasis del holobionte. Dentro de este vínculo se transfieren servicios ecosistémicos que no sólo benefician a la comunidad bacteriana simbiote y al cuerpo de la esponja sino al ecosistema marino al que pertenecen; de esta manera, la secreción de metabolitos secundarios, la transformación y puesta en disposición de nutrientes esenciales y la intermediación en eventos de comunicación del porífero y su entorno, modulan la composición de la microbiota que interviene como el establecimiento de nuevas especies bacterianas y organismos de orden superior en la superficie de la biopelícula en donde la microbiota simbiote se estructura, dando lugar al *biofouling* o epibiosis. La comunidad bacteriana dentro de sus relaciones “sociales” complejas, regula tanto la composición de sus poblaciones como la expresión de genes que pueden no ser benéficos para el contexto del consorcio. Así, la producción de factores de virulencia, sustancias bactericidas y bacteriostáticas e incluso la producción de sustancias tóxicas para organismos eucariotas se encuentran reguladas desde el control de la proliferación celular y desde la misma activación de genes específicos. En eventos como la comunicación bacteriana tipo *Quorum Sensing* (QS), se usan moléculas de señalización celular que aumentan en concentración con la densidad poblacional. Estas moléculas, se convierten en una señal que activa la expresión de genes requeridos por la población total e incluso por la comunidad a la que pertenecen, permitiendo que los consorcios bacterianos adquieran ventajas o respondan a presiones del entorno. Modular los eventos de comunicación tanto como regular el crecimiento poblacional son algunos de los mecanismos usados por la comunidad para mantener la estabilidad del holobionte. La producción de moléculas inhibitoras del QS y de compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano, que también se encuentran altamente regulados, provee al sistema biológico herramientas para evitar que algunas poblaciones excedan la producción de estas sustancias alterando tanto a la comunidad como la integridad del hospedero. En esta investigación, pionera en el campo de la ecología microbiana asociada a esponjas del Caribe colombiano, caracterizamos comunidades

bacterianas cultivables asociadas a cuatro esponjas marinas con *biofouling* (*Aplysina insularis* (AiBf) y *Desmapsamma anchorata* (DaBf)) y sin *biofouling* (*Xestospongia muta* Xm1 y Xm2) en su superficie. Realizamos la determinación taxonómica y la comparación de la composición de cada comunidad, seguida de una descripción cualitativa de la capacidad que tienen estos aislamientos para producir e inhibir el QS vía moléculas tipo Acil Homoserín Lactonas (AHLs). Así mismo evaluamos la capacidad de producir sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano sobre aislamientos de su mismo consorcio.

Los resultados demostraron dominancia por parte del filo Firmicutes (representado por el género *Bacillus*), seguido por el filo Actinobacteria (representado por el género *Micrococcus*) y la presencia de apenas cuatro especies bacterianas pertenecientes al filo Proteobacteria, de los géneros *Pseudomonas*, *Oceanimonas* y *Paracoccus*. Se reportó por primera vez la producción de moléculas AHL por parte de aislamientos de las especies *Pseudomonas oceani* y *Pseudomonas stutzeri*; y la producción de moléculas inhibitoras del QS por 25 aislamientos bacterianos, 13 de ellos asociados a esponjas sin *biofouling* y 12 asociados a esponjas con *biofouling*. De un total de 2148 ensayos se reportaron 138 eventos de antagonismo por parte de aislamientos de esponjas sin epibiosis y 118 eventos de esponjas con epibiosis. Los resultados obtenidos y la información colectada de bibliografía sirvieron para proponer el papel de ciertas especies bacterianas en ambos nichos ecológicos con y sin epibiosis; además se observó un número similar eventos de antagonismo e inhibición de la comunicación celular entre bacterias pertenecientes a las comunidades microbianas asociadas a *biofouling* o a la ausencia de éste. Esto nos permite inferir que existen variables dentro de la comunidad bacteriana, además de las evaluadas, que regulan estos fenotipos, generando las condiciones adecuadas para que el *biofouling* se establezca, se desarrolle, o se inhiba.

**Palabras clave:** Comunidades Bacterianas, *Biofouling*, *Biofilm*, *Quorum Sensing*, Inhibición del Quorum Sensing, Antagonismo Bacteriano

# CONTENIDO

RESUMEN .....	3
I. LISTA DE FIGURAS.....	7
II. LISTA DE TABLAS.....	9
III. INTRODUCCIÓN .....	11
IV. MARCO TEÓRICO.....	18
4.1 ESPONJAS MARINAS.....	37
4.2 COMUNIDADES BACTERIANAS .....	18
4.3 ESPONJAS MARINAS Y SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS .....	21
4.4 QUORUM SENSING.....	30
4.5 <i>BIOFILM</i> .....	37
4.6 <i>BIOFOULING</i> O EPIBIOSIS .....	47
4.7 INHIBICIÓN DE LA COMUNICACIÓN BACTERIANA TIPO <i>QS</i> .....	53
4.8 ANTAGONISMO BACTERIANO .....	57
V. OBJETIVOS.....	62
5.1 Objetivo general.....	62
5.2 Objetivos específicos.....	62
VI. METODOLOGÍA .....	63
6.1 TOMA DE MUESTRAS .....	63
6.2 AISLAMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVABLES.....	64
6.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACRO Y MICROSCÓPICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS.....	64
6.4 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA USANDO EL GEN RIBOSOMAL 16S ARN .....	65
6.4.1 Extracción del ADN de colonia bacteriana .....	65
6.4.2 Amplificación del gen ribosomal 16S ARN .....	67
6.4.3 Parámetros para la asignación de nivel taxonómico de los aislamientos bacterianos....	69

6.4.4 Secuenciación y análisis bioinformático.....	69
6.5 DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN TIPO ACIL HOMOSERÍN LACTONA POR PARTE DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN ESTUDIO.....	71
6.6 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE <i>QUORUM SENSING</i> .....	73
6.7 PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO.....	75
VII. RESULTADOS .....	76
7.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS MARINAS CON Y SIN <i>BIOFOULING</i> .....	76
7.1.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de los aislamientos bacterianos .....	76
7.1.2 Caracterización taxonómica usando el gen ribosomal 16S ARN.....	79
7.1.3 Consideraciones sobre las modificaciones en los protocolos de extracción y amplificación del gen ribosomal 16S RNA.....	92
7.2 DETECCIÓN DEL FENÓMENO DE <i>QUORUM SENSING</i> MEDIADO POR MOLÉCULAS SEÑAL TIPO ACIL HOMOSERÍN LACTONAS (AHLs) .....	99
7.3 INHIBICIÓN DE LA COMUNICACIÓN BACTERIANA .....	101
7.4 ANTAGONISMO BACTERIANO .....	104
VIII. DISCUSIÓN .....	110
8.1 COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS SIN <i>BIOFOULING</i> .....	116
8.2 COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS CON <i>BIOFOULING</i> .....	132
IX. CONCLUSIONES .....	153
X. RECOMENDACIONES.....	156
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	158

# I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de sistemas canónicos de <i>Quorum Sensing</i> para bacterias Gram negativas y Gram positivas .....	33
Figura 2. Esquema general de la formación de <i>biofilm</i> y eventos trascendentales durante su desarrollo .....	43
Figura 3. Esquema del proceso de formación del <i>biofouling</i> marino .....	49
Figura 4. Actividad lactonasa y acilasa sobre las moléculas señal AHL.....	54
Figura 5. Caracteres morfológicos para la descripción macroscópica de las colonias de aislamientos en estudio .....	65
Figura 6. Diagrama de las dos técnicas de siembra usadas para detectar la producción de AHLs por los aislamientos bacterianos en estudio .....	71
Figura 7. Diagrama de técnica usada para la evaluación de la inhibición de QS por parte de los aislamientos en estudio <i>sobre C. violaceum</i> ATCC31532 .....	74
Figura 8. Diagrama de técnica usada para evaluar la actividad antagónica de los aislamientos de una misma comunidad bacteriana.....	75
Figura 9. Fotografías de colonias y tinción de Gram de algunos aislamientos bacterianos a las 24h.....	78
Figura 10. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana presente en la esponja <i>Xestospongia muta</i> Xm1 sin <i>biofouling</i> .....	85
Figura 11. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana presente en la esponja <i>Xestospongia muta</i> Xm1 sin <i>biofouling</i> , con variaciones en la extensión de la secuencia (por debajo de las 1400bp).....	86
Figura 12. Relación taxonómica del aislamiento CCBXm1-27 perteneciente a la comunidad bacteriana de la esponja <i>Xestospongia muta</i> Xm1 sin <i>biofouling</i> .....	86
Figura 13. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana presente en la esponja <i>Xestospongia muta</i> Xm2 sin <i>biofouling</i> .....	87
Figura 14. Relaciones taxonómicas del aislamiento CCBXm2-1 perteneciente a la comunidad bacteriana de esponja <i>Xestospongia muta</i> Xm2 sin <i>biofouling</i> con variaciones en la extensión de la secuencia (por debajo de las 1400bp).....	88
Figura 15. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana presente en la esponja <i>Aplysina insularis</i> (AiBf) con <i>biofouling</i> .....	89

Figura 16. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana asociada a la esponja <i>Aplysina insularis</i> (AiBf) con <i>biofouling</i> , con variaciones en la extensión de la secuencia (por debajo de las 1400bp) .....	90
Figura 17. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana presente en la esponja <i>Desmapsamma anchorata</i> (DaBf) con <i>biofouling</i> .....	91
Figura 18. Relaciones taxonómicas de los aislamientos pertenecientes a la comunidad bacteriana asociada a la esponja <i>Desmapsamma anchorata</i> (DaBf) con <i>biofouling</i> , con variaciones en la extensión de la secuencia (por debajo de las 1400bp) .....	92
Figura 19. Ensayos con biosensores para la detección de la producción de moléculas señal tipo AHLs por parte de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas con y sin <i>biofouling</i> . .....	100
Figura 20. Ensayo de estría sobre extendido para el biosensor CV026 .....	101
Figura 21. Prueba de inhibición de QS para los aislamientos de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas con y sin <i>biofouling</i> .....	102
Figura 22. Montaje general de ensayos de antagonismo bacteriano.....	105
Figura 23. Algunos ejemplos de resultados individuales de antagonismo bacteriano.....	105
Figura 24. Comparación entre eventos de antagonismo de comunidades bacterianas con y sin <i>biofouling</i> .....	114
Figura 25. Modelo de relación entre la actividad antagónica, susceptibilidad e inhibición de QS para especies bacterianas relevantes en la comunidad asociada a <i>X. muta</i> Xm1 sin <i>biofouling</i> (Modificado del diagrama de climatología de holdridge) .....	123
Figura 26. Modelo de relación entre la actividad antagónica, susceptibilidad e inhibición de qs para especies bacterianas relevantes en la comunidad asociada a <i>X. muta</i> Xm2 sin <i>biofouling</i> (modificado del diagrama de climatología de Holdridge) Descripción de Figura 25. ....	131
Figura 27. Modelo de relación entre la actividad antagónica, susceptibilidad e inhibición de qs para especies bacterianas relevantes en la comunidad asociada a <i>Aplysina insularis</i> AiBf sin <i>biofouling</i> (modificado del diagrama de climatología de Holdridge) Descripción de Figura 25. ....	140
Figura 28. Modelo de relación entre la actividad antagónica, susceptibilidad e inhibición de qs para especies bacterianas relevantes en la comunidad asociada a <i>D. anchorata</i> DaBf sin <i>biofouling</i> (modificado del diagrama de climatología de Holdridge) Descripción de Figura 25. ....	149

## II. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Código de identificación de los aislamientos purificados para cada grupo de muestreo de esponjas marinas con y sin <i>biofouling</i> .....	64
Tabla 2. Modificaciones de extracción de DNA estandarizados para algunos aislamientos bacterianos en estudio.....	67
Tabla 3. Estandarizaciones al protocolo de PCR para algunos aislamientos en estudio. Las modificaciones al protocolo inicial se realizaron en las temperaturas de alineamiento y unión a <i>primers</i> y extensión del amplificado .....	68
Tabla 4. Biosensores usados para la detección de moléculas señal involucradas en el Quorum Sensing producidas por los aislamientos bacterianos en estudio.....	73
Tabla 5. Cepas control para los ensayos de detección de producción de moléculas señal tipo AHL .....	73
Tabla 6. Total de aislamientos obtenidos para cada grupo de esponjas marinas .....	77
Tabla 7. Especie con mayor similitud de acuerdo con los valores de Distancia p y Kimura 2-parámetros para cada uno de los aislamientos bacterianos pertenecientes al grupo de <i>Xestospongia muta</i> (1) sin <i>Biofouling</i> .....	80
Tabla 8. Especie con mayor similitud de acuerdo con los valores de Distancia p y Kimura 2-parámetros para cada uno de los aislamientos bacterianos pertenecientes al grupo de <i>Xestospongia muta</i> (2) sin <i>biofouling</i> .....	81
Tabla 9. Especie con mayor similitud de acuerdo con los valores de Distancia p y Kimura 2-parámetros para cada uno de los aislamientos bacterianos pertenecientes al grupo de <i>Aplysina insularis</i> con <i>biofouling</i> . (Descripción Tabla 7.).....	82
Tabla 10. Especie con mayor similitud de acuerdo con los valores de Distancia p y Kimura 2-parámetros para cada uno de los aislamientos bacterianos pertenecientes al grupo de <i>Desmapsamma anchorata</i> con <i>biofouling</i> .....	83
Tabla 11. Aislamientos bacterianos que mostraron actividad inhibitoria del QS para la cepa biosensora ATCC31532 <i>C. violaceum</i> .....	103
Tabla 12. Ensayos de antagonismo bacteriano de los aislamientos asociados a la comunidad de la esponja sin <i>biofouling</i> <i>Xestospongia muta</i> (Xm1).....	106
Tabla 13. Ensayos de antagonismo bacteriano de los aislamientos asociados a la comunidad de la esponja sin <i>biofouling</i> <i>Xestospongia muta</i> (Xm2).....	107
Tabla 14. Ensayos de antagonismo bacteriano de los aislamientos asociados a la comunidad de la esponja con <i>biofouling</i> <i>Aplysina insularis</i> (AiBf).....	108

Tabla 15. Ensayos de antagonismo bacteriano de los aislamientos asociados a la comunidad de la esponja con *biofouling* *Desmapsamma anchorata* (DaBf) ..... 109

### III. INTRODUCCIÓN

A pesar del supuesto de que organismos como las esponjas marinas son muy simples, múltiples estudios han demostrado que estos organismos basales, aunque con una anatomía poco compleja, poseen interacciones muy estrechas, diversas y dinámicas con la microbiota asociada a su tejido superficial y en el interior de sus cámaras (Hentschel *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2007a; Wulff, 2001; Xin *et al.*, 2017). Así, la comunidad bacteriana asociada a las esponjas proporciona formas asimilables de nitrógeno, fósforo, carbono y otros nutrientes a los que el porífero por sí mismo no podría acceder en ausencia del servicio ecosistémico que estos microorganismos le ofrecen (Peterson *et al.*, 2006; Ribes & Jimenez, 2011).

Las comunidades bacterianas presentes en la esponja producen además un arsenal químico dada la síntesis de sustancias bacteriostáticas, bactericidas, fungicidas e inhibidoras de la comunicación celular, y toxinas a las que son susceptibles otros organismos eucariotas de orden superior; sustancias que permiten seleccionar y modular el crecimiento y desarrollo de organismos que puedan traer beneficio al porífero o puedan promover complicaciones como enfermedades y pérdida del tejido (Papaleo *et al.*, 2012; Sayem *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011; Wietz, *et al.*, 2013). Dadas las ventajas que trae permitir el asentamiento y desarrollo del microbioma, la esponja hospedera provee el material indispensable para la generación y maduración de las comunidades de microorganismos, como lo es proporcionar la superficie de asentamiento, secretar sustancias que posibilitan la adhesión y proveer de nutrientes esenciales para alimentar al consorcio (AlAbbas *et al.*, 2013; Solano *et al.*, 2014; Webster & Taylor, 2012).

El término holobionte, usado en principio para la descripción de la asociación de microorganismos procariotas y eucariotas a la superficie de los corales, se ha extendido a la definición general de asociación entre organismos de orden superior como plantas y animales y su microbioma (Cerqueda-García & Falcón, 2016; Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2014). Así, la relación del microbioma y la esponja, con sus interacciones complejas y dependientes, son abarcadas por el término holobionte, permitiendo que en torno a este, se realicen conjeturas y descripciones de la dinámica anatómica, fisiológica y bioquímica que todo el conjunto del porífero

y su comunidad microbiana asociada realizan para mantener la homeostasis de su relación (Webster & Thomas, 2016).

Para que el holobionte se establezca deben suceder ciertos pasos obligatorios que permiten tanto la adhesión de los microorganismos a la superficie del hospedero, como la formación y maduración de la comunidad en la que participarán. Todo esto comienza con el asentamiento de bacterias planctónicas sobre una superficie enriquecida con proteínas, polisacáridos y proteoglicanos (Solano *et al.*, 2014), que proveen los recursos suficientes para la adhesión definitiva e irreversible de estas bacterias, permitiendo el aumento de su densidad poblacional junto a la producción de exopolisacáridos (EPS) que funcionan como matriz para el asentamiento de nuevas bacterias y microalgas (Mieszkin *et al.*, 2013).

Cuando las bacterias aumentan en número y su matriz se enriquece con nuevos compuestos de señalización, de nutrición y de modulación de esa comunidad que se está formando, inicia el siguiente paso conocido como la formación de biopelículas o *biofilms*; estas estructuras hacen que la comunidad sea más compleja, le permite sectorizar a sus participantes y establecer funciones metabólicas particulares para mantener al consorcio bacteriano en equilibrio, semejante a un organismo multicelular. Esta estratificación y diferenciación dentro de la comunidad está acompañada de la sincronización en sus eventos de comunicación, de la que derivan actividades específicas y vitales en diferentes regiones de la biopelícula, como la incorporación de nutrientes, producción de sustancias para competencia con otros microorganismos y de resistencia a moléculas tóxicas, secreción de matriz extracelular y producción de esporas, entre otras funciones (Dickschat, 2010; Papenfort & Bassler, 2016).

La comunicación bacteriana es orquestada por un fenómeno conocido como *Quorum Sensing* (QS) que es fundamentalmente la expresión de genes en respuesta al aumento en la densidad poblacional (Batista, *et al.*, 2018; Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994; Rice, Mcdougald, & Givskov, 2008). Así, una bacteria produce de forma basal una molécula señal que difunde al espacio extracelular, pero que en bajas concentraciones no puede activar ninguna respuesta fisiológica ni en ella ni en otras bacterias circundantes (Parray *et al.*, 2018). Al aumentar la

densidad poblacional bacteriana, aumenta también la producción de moléculas señal hasta el punto en que las concentraciones de esta señal son iguales dentro y fuera de las células; cuando esto ocurre, la molécula señal activa una serie de respuestas bioquímicas al interior de la célula, promoviendo la expresión de genes como factores de virulencia, pigmentos accesorios, aumento en la efectividad de alguna ruta metabólica específica, producción de esporas, etc., que responden al contexto social y ambiental en el que se desarrollan (Solano *et al.*, 2014).

El QS es fundamental para la maduración de las biopelículas y además modula la composición de la comunidad; es decir, mediante la comunicación celular, las bacterias producen sustancias que no sólo inhiben el crecimiento de ciertas especies bacterianas que pueden alterar la homeostasis del holobionte, sino que también bloquea la expresión de otros fenotipos dependientes de QS en otras bacterias asociadas al consorcio; así, toda la comunidad bacteriana busca su equilibrio entre la densidad poblacional de diferentes especies bacterianas presentes en la biopelícula y el ingreso de nuevas especies procariontas o eucariotas que traigan algún beneficio al holobionte (Delauney *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2013). Cuando la comunidad bacteriana produce sustancias que permiten el asentamiento de organismos de nivel superior como macroalgas y crustáceos, y les provee además de nutrientes y defensas; este nuevo consorcio, aún más complejo, recibe el nombre de *biofouling* (Delauney *et al.*, 2010).

El *biofouling* o epibiosis, es un fenómeno en el cual la superficie del holobionte se coloniza por organismos eucariotas como productores primarios (algas), secundarios y terciarios (como crustáceos y moluscos) que completan el ciclo trófico dentro de este micronicho que se forma (Mieszkin *et al.*, 2013). Así, el holobionte adquiere complejidad y promueve el asentamiento de nuevos microorganismos a las superficies de los organismos secundarios adheridos al hospedero, microorganismos que pueden traer al *biofouling* nuevos nutrientes que aseguren el éxito de esta comunidad ahora más heterogénea. La formación del *biofouling* solo es posible cuando existe una biopelícula madura en la superficie a colonizar, que permite el asentamiento de estos nuevos organismos (Goecke *et al.*, 2010).

Aunque el *biofouling* es un problema a nivel industrial porque se genera sobre la superficie de los navíos y aumenta con esto la fricción y la energía necesaria para la navegación que repercute en la cantidad de combustible necesario, estas epibiosis en ciertos nichos marinos promueven el asentamiento y desarrollo de organismos necesarios para mantener el equilibrio del ecosistema en general (Sayem *et al.*, 2011; Schultz *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2007b). Por ejemplo, Franco y colaboradores encontraron que bacterias asociadas a la superficie del cangrejo *Pagurus longicarpus* promueven el asentamiento y maduración de larvas del cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus* a la superficie de la concha de este cangrejo. Lo anterior pone en evidencia que los procesos de asentamiento y desarrollo de los organismos marinos son mucho más complejos de lo que se piensa (Franco, Cadavid, & Arévalo-ferro, 2019).

Los organismos de orden superior también evitan el asentamiento de organismos en su superficie; por ejemplo, el alga *Delisea pulchra* controla el desarrollo de *biofouling* en su superficie produciendo furanonas halogenadas similares a las moléculas señal usadas generalmente por bacterias Gram negativas para su comunicación. Así, el alga bloquea el QS evitando la generación del *biofilm*, indispensable para desarrollar la epibiosis, manteniendo su superficie desprovista de organismos que imposibiliten la fotosíntesis (Sandy *et al.*, 2011).

La inhibición del *biofouling* no sucede únicamente por la intervención directa del organismo; en muchos casos bacterias asociadas a este, modulan e impiden el asentamiento de organismos más complejos, tal como sucede en el alga *Ulva lactuca* con la bacteria *Pseudoalteromonas tunicata* que produce unas sustancias pigmentadas que inhiben la formación de *biofilm* de otras especies bacterianas, mediante el bloqueo de la transcripción de genes activados por QS; así, la superficie del alga se mantiene desprovista de *biofouling* (Dobretsov *et al.*, 2011).

En el caribe colombiano se pueden observar esponjas con *biofouling* en su superficie, así como esponjas completamente desprovistas de esta epibiosis. Tras esta observación inicial y con el conocimiento de la complejidad de los holobiontes marinos se puede sospechar que este fenómeno está modulado tanto por la esponja

como por el consorcio bacteriano asociado, que puede promover o inhibir el asentamiento de algas, crustáceos y moluscos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si estos aislamientos realizan comunicación bacteriana QS vía moléculas señal tipo Acil- Homoserín- Lactonas (AHLs), y si producen sustancias que inhiban el QS o que tengan actividad antagónica sobre otras bacterias pertenecientes a su consorcio, además de caracterizar y comparar las comunidades bacterianas cultivables presentes en esponjas marinas con y sin *biofouling* en su superficie. Estos fenotipos de inhibición y antagonismo son relevantes dentro del contexto de comunidad, pues demuestran la potencial participación de las bacterias del consorcio en procesos de modulación y restricción de la participación de otras bacterias y eucariotas en el holobionte. La caracterización de las bacterias aisladas presentes en las esponjas con y sin *biofouling* se realizó mediante la amplificación, secuenciación y comparación del gen ribosomal 16S ARN de cada aislamiento bacteriano obtenido (Hadaidi *et al.*, 2018). La actividad QS vía moléculas tipo AHL se evaluó mediante el uso de biosensores capaces de detectar la producción de estas moléculas por parte de los aislamientos en estudio. Para la determinación de la producción de moléculas inhibitoras del QS por parte de los aislamientos en estudio, éstos se enfrentaron con la cepa tipo *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, que en presencia de alguna molécula inhibidora de QS, deja de producir el pigmento violeta y sus colonias mantienen su color blanco crema (McLean *et al.*, 2004). Por último, se evaluó la actividad antagónica de las bacterias en estudio mediante el enfrentamiento de cada una de ellas con su comunidad, a fin de determinar si producen moléculas inhibitoras del crecimiento bacteriano a las que puedan ser susceptibles otras bacterias del consorcio.

Los estudios realizados en esponjas marinas, más específicamente en la relación con su microbiota asociada, demuestran que aún existen muchas incógnitas en la comprensión del holobionte y en el papel que tienen estos microorganismos en los procesos de nutrición, metabolismo, protección e interacción con el ambiente marino de la esponja, particularmente en los mediados por comunicación celular y

antagonismo bacteriano, eventos asociados a la conformación de la estructura de la comunidad del holobionte.

La evaluación de la composición de la comunidad aislada, asociada a esponjas con y sin epibiosis, junto a la caracterización de fenotipos como la producción de moléculas de QS, la inhibición de la comunicación celular y la producción de sustancias antagónicas, contribuye con evidencia experimental al conocimiento de los consorcios bacterianos y a los fenotipos que pueden estar regulando la composición y la expresión de genes por parte de la comunidad, demostrando que estas variables existen y deben estar involucradas en un sistema biológico complejo, organizado y jerarquizado que permite o no el establecimiento y proliferación de organismos específicos sobre el holobionte, diversificando la composición del ecosistema marino.

En esta investigación encontramos que las comunidades bacterianas asociadas a esponjas con *biofouling* (*Aplysina insularis* y *Desmapsamma anchorata*) y sin *biofouling* (*Xestospongia muta* Xm1 y Xm2), son diferentes entre ellas y existen aislamientos compartidos entre estas comunidades bacterianas, que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Micrococcus*, conocidos por su capacidad de colonizar diversos ambientes gracias a su perfil bioquímico versátil. La gran mayoría de las bacterias cultivables en estudio pertenecen a los filos Firmicutes y Actinobacteria. Del filo Proteobacteria se reportaron 5 aislamientos de 3 especies, pertenecientes a la comunidad de *D. anchorata* con *biofouling*, y un aislamiento del género *Paracoccus* de la comunidad asociada a *X. muta* Xm1. Se reporta también producción de moléculas señal tipo AHL para *Pseudomonas oceani* y *P. stutzeri*. Además, se reportaron 25 aislamientos bacterianos con capacidad inhibidora de QS sobre la cepa tipo *C. violaceum* ATCC31532, 13 de ellos aislados de esponjas con epibiosis y 12 aislados de esponjas con ausencia epibiosis.

Durante la evaluación de la capacidad antagónica de los aislamientos frente a otros de su misma comunidad cultivable, reportamos de un total de 2162 ensayos, un total de 138 eventos de antagonismo en comunidades asociadas a esponjas sin *biofouling*, y, de un total de 2362 ensayos, un total de 118 eventos de antagonismo en comunidades asociadas a esponjas con *biofouling*. En este estudio se observa que

la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas especies bacterianas sobre otras de su consorcio existe en ambos eventos y que esta propiedad puede contribuir significativamente en la composición y diversificación de la comunidad bacteriana, modificando a su vez el perfil bioquímico y fisiológico que expone para permitir o no el asentamiento de organismos de orden superior que configuren el *biofouling*.

Los hallazgos de esta investigación que es pionera en la caracterización taxonómica de bacterias aisladas y de fenómenos trascendentes en el contexto de comunidad bacteriana y del holobionte, para esponjas marinas del caribe colombiano, demuestran de forma descriptiva que la comunicación bacteriana mediada por moléculas tipo AHL, la producción de moléculas que bloquean el QS, y la producción de sustancias antagónicas dentro del mismo consorcio, existen y pueden estar participando activamente en la distribución, la composición y el comportamiento de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas con y sin epibiosis en su superficie. Además, se observa que la configuración de estos micronichos no está dada únicamente por la aparición de estos fenotipos reguladores; sino que estos deben estar súper-regulados por otras variables fisicoquímicas, por otras bacterias, por otros organismos pertenecientes al consorcio, y por la relación entre ellos. Todos estos elementos modulan la producción de los compuestos inhibidores y antagónicos, y permiten, por ejemplo, la proliferación de otras bacterias que posibilitan la formación de *biofouling*. Esta investigación contribuye al conocimiento de las comunidades bacterianas asociadas a organismos marinos como las esponjas, y demuestra que más allá de la descripción de eventos trascendentes en la regulación de las comunidades bacterianas, la explicación de cómo surgen y se modulan estos consorcios requiere de la evaluación de otros múltiples eventos y fenotipos que se jerarquizan y modulan la proliferación y expresión de genes capaces de permitir o inhibir el asentamiento de organismos eucariotas para la generación de nichos como el *biofouling*.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.2 COMUNIDADES BACTERIANAS

Las comunidades bacterianas que crecen y se desarrollan en toda la extensión del planeta Tierra son transformadores de sustratos para numerosos organismos de orden superior y proveen a todos los hábitats de servicios ecosistémicos dentro de los cuales se encuentra la asimilación y puesta en disposición de nutrientes esenciales para los organismos que allí se desarrollan; además de configurarse como una barrera inmune frente a organismos patógenos, una vez estas comunidades se incorporan a los organismos tanto en su tegumento como en su sistema digestivo (Snajdr, Urbanov, & Baldrian, 2015; Zhu, *et al.*, 2016). Incluso, las comunidades bacterianas asociadas a animales marinos que reciben un gran nivel de radiación proveen de una capa reflectora que impide que los rayos UV ingresen al tejido del animal, generando mutaciones y lesiones, como en el caso de las esponjas (Webster & Taylor, 2012). La evolución de la vida en el planeta incluyendo organismos conocidos y extintos se le debe a las bacterias que, organizadas en poblaciones y comunidades altamente estructuradas y complejas, pudieron acceder a sustratos que otros organismos no podían usar, modificándolos, transformándolos y ofreciéndolos al resto del bioma para su utilización (Hamilton, Bryant, & Macalady, 2016; Ramanan *et al.*, 2016; Ribes & Jimenez, 2011). También, la disponibilidad de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono se ha dado gracias a la participación de microorganismos dentro de los que se encuentran principalmente las bacterias (Hamilton *et al.*, 2016).

Dada la importancia de las comunidades bacterianas en la Tierra y su importancia tanto en eventos de colonización, establecimiento, desarrollo, mantenimiento de salud y procesos de enfermedad, investigadores en el área de la microbiología han aunado esfuerzos para comprender no solamente la composición de las comunidades presentes en amplios nichos, sino adquirir información que articule el conocimiento de estos sistemas biológicos, a fin de generar modelos que reúnan tanto a los organismos participantes como a sus perfiles bioquímicos y el papel de éstos en el contexto de comunidad, ofreciendo servicios tanto al consorcio al que

pertenecen como al organismo donde se hospedan o sobre los sustratos en donde proliferan.

En el contexto de los ecosistemas marinos encontramos múltiples investigaciones enfocadas en comprender las interacciones entre las comunidades procariontas asociadas a organismos eucariotas, donde se incluyen no sólo la relación metabólica y el préstamo de servicios ecosistémicos dentro del holobionte, sino la producción de moléculas involucradas en la comunicación inter-reinos, que permiten la sincronización y mantenimiento de la homeostasis del consorcio, demostrando que muchos de los elementos usados por los procariontas, modulan el comportamiento de los eucariotas hospederos y viceversa (Joint *et al.*, 2002).

Además de evaluar estas interacciones, investigadores han aunado esfuerzos en evaluar cómo la modificación de las comunidades bacterianas que tienen una relación obligada con sus hospederos (la gran mayoría de organismos marinos), pueden concluir en la generación de eventos de enfermedad, o cómo ese mismo cambio de la composición en la comunidad permite que nuevos organismos encuentren un sitio de asentamiento, maduración y reproducción (Cárdenas, *et al.*, 2012; Franco, Cadavid, & Arévalo-ferro, 2019; Zimmer *et al.*, 2014). Por ejemplo, el grupo CCB, que ha realizado múltiples investigaciones asociadas a las comunidades bacterianas simbiotes de corales del caribe, han encontrado que en eventos de enfermedad las comunidades bacterianas asociados a esos cnidarios cambian, dando paso a especies oportunistas que proliferan y extienden la enfermedad tanto a todo el cuerpo del octocoral como al resto del arrecife al que se encuentra asociado (Miller & Richardson, 2012; Roder, *et al.*, 2014). Es el caso de la enfermedad de la Plaga Blanca en octocorales. Cárdenas y colaboradores encontraron que durante la enfermedad la composición de la comunidad es diferente y es muestra de que en estados de salud existe una composición del consorcio bacteriano que se mantiene, contribuyendo a la homeostasis de todo el holobionte (Cárdenas *et al.*, 2012). Cuando aumenta la temperatura, la eutrofización y la turbidez del cuerpo de agua, las comunidades bacterianas que son susceptibles tanto como el coral, no puede mantener el equilibrio y algunas bacterias antes reguladas pueden dominar el consorcio, promoviendo nuevas vías metabólicas que

buscan usar al tejido coralino como fuente de nutrición (Cárdenas *et al.*, 2012). En otras investigaciones realizadas por el grupo del CCB (en proceso de publicación; (Ripe, Diaz, & Arévalo-Ferro, 2016) en enfermedad de la Banda Negra, también en octocorales del caribe colombiano, se presenta el mismo fenómeno: una desestabilización del equilibrio del consorcio bacteriano permite la proliferación de bacterias que antes estaban reguladas y estas no sólo proveen de toxinas degradadoras de sustrato coralino sino que además ofrecen las condiciones para el asentamiento y proliferación de nuevas bacterias patógenas que rediseñan la arquitectura de la comunidad (Voss & Richardson, 2006; Zimmer *et al.*, 2014). En el caso de la Banda Negra, las bacterias oportunistas estatifican la comunidad, generando una película de bacterias en la superficie que impiden la difusión de oxígeno y luz solar, asfixiando no sólo a la comunidad bacteriana sino al mismo hospedero (Miller & Richardson, 2012).

En otro estudio realizado también por el CCB sobre la comunidad bacteriana cultivable presente en la concha de *Pagurus longicarpus*, que es colonizada por cnidarios de la especie *Hydractinia symbiolongicarpus*, se encontró que las bacterias de esta comunidad producen moléculas que señalizan el sitio de colonización y modifica el ritmo de la metamorfosis de las larvas de este cnidario (Franco, Cadavid & Arévalo-ferro, 2019). Este ejemplo demuestra que las comunidades bacterianas no solo modifican el sustrato o nicho en donde se desarrollan otros organismos, sino que además proveen de moléculas de señalización que modifican la conducta y el desarrollo de organismos tan importantes para la manutención del ecosistema arrecifal como lo son los cnidarios, convirtiéndose en una clara demostración de la comunicación inter-reinos, presentes no solo en este modelo sino en una gran cantidad de simbioses marinos y terrestres (Sun *et al.*, 2016).

Los anteriores son ejemplos de cómo las comunidades bacterianas representan un tópico importante no sólo para el reconocimiento del comportamiento de estas en su ecosistema sino como su participación modula el funcionamiento de niveles tróficos superiores, manteniendo la estabilidad de hábitats completos. Lo anterior se

constituye con el móvil principal para esta investigación, que comprende la complejidad de las interacciones del microbioma con los organismos de orden superior en un contexto de relaciones tróficas obligatorias y definitivas para la manutención de la vida en el mar.

### **4.3 ESPONJAS MARINAS Y SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS**

Las esponjas marinas, como miembros funcionales en las comunidades marinas bentónicas, proveen de múltiples servicios ecosistémicos que no son desarrollados únicamente por el organismo, sino que dependen significativamente de las comunidades bacterianas asociadas a sus tejidos. Del peso total de las esponjas, un 35% de su biomasa corresponde a la microbiota asociada, lo que da cuenta de la densidad poblacional de la comunidad bacteriana que se mantiene dentro del porífero (Hentschel *et al.*, 2012)

Procesos tan importantes para la supervivencia de las esponjas marinas como la fijación y asimilación de carbono y nitrógeno, son desarrollados por las bacterias simbiotes que proveen constantemente al organismo de nutrientes asimilables, tras la transformación y puesta en disposición de los compuestos que se filtran por el cuerpo del porífero, más la producción de compuestos propios del metabolismo de las bacterias asociadas (Dudley-evans *et al.*, 2012). Además de participar en procesos de adquisición de nutrientes esenciales para el simbiote, las bacterias cooperan para la defensa del tejido del porífero, y así, complejizan al sistema inmune de la esponja, produciendo sustancias antagónicas que inhiben la fijación y crecimiento de organismos patógenos u oportunistas (Slaby *et al.*, 2017).

A continuación, se presentará un resumen de los dos procesos de fijación y asimilación de nutrientes esenciales más estudiados en la interacción entre la microbiota simbiote y las esponjas marinas:

**Asimilación del carbono:** Los reportes sobre las comunidades bacterianas asociadas a esponjas revelan que estos simbiotes poseen perfiles metabólicos heterotróficos y autotróficos (Schmitt *et al.*, 2011; Slaby *et al.*, 2017). Un estudio realizado por Siegl y colaboradores encontró, tras muestreo de bacterias asociadas a diferentes especies de esponjas del género *Aplysinidae*, que existe un alto

enriquecimiento de genes que codifican para reacciones de glicólisis, de la reacción de pentosa-fosfato, del ácido tricarboxílico (o ciclo de Krebs) y de fosforilación oxidativa, entre otras rutas metabólicas; demostrando que gran cantidad de microorganismos usan un amplio rango de carbohidratos en su metabolismo primario (Hentschel *et al.*, 2012; Siegl *et al.*, 2011). Bacterias asociadas al género tentativo “*Poribacteria*”, encontradas únicamente en esponjas, como su nombre lo indica, poseen un perfil mixótrofo en la que puede fijar carbono por la vía Wood-Ljungdahl (Hentschel *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2011). Estos eventos de fijación de carbono y transformación a compuestos consumibles por la esponja hospedera, además, se encuentran asociados a procesos de adhesión al sustrato, liderados por un incremento en la producción de transcritos para la producción de tetratricopéptidos y anquirinas, que son proteínas específicas usadas como marcadores para reconocer a las bacterias del simbiote como microbiota propia de la esponja y no ser degradadas por los amebocitos, que son las células encargadas de la fagocitosis y degradación de bacterias del cuerpo de agua y nutrientes adquiridos (Webster & Taylor, 2012; Webster & Thomas, 2016). Estudios sobre la microbiota de la esponja del caribe *C. singaporensis* y *S. flabelliformis* han demostrado que la comunidad asociada provee la mayor cantidad de carbono asimilable por la esponja, lo que fue medido mediante la detección y cuantificación de copias de los genes asociados a las importinas tipo ABC para D-xylosa, alfa-1,4-digalactorunato, arabinosacáridos y lactosas/L-arabinosa, entre otras, que son producida por bacterias heterótrofas del simbiote (Botté *et al.*, 2019). Otros genes expresados por la microbiota como los que codifican para enzimas que solubilizan el material orgánico particulado (POM), interactúa con la masa de agua filtrada modificando la disponibilidad de Carbono, tanto para sí misma, como para su consorcio y el de la esponja y los organismos de orden superior asociados al nicho (Azam & Malfatti, 2007).

Las Cyanobacterias, que en numerosos estudios ha demostrado una gran abundancia dentro de la microbiota bacteriana, y que posee actividad fotosintética, ha estado asociada con esponjas del caribe que dependen de estos organismos para que recibir más del 60% de la energía requerida para su supervivencia

(Webster & Taylor, 2012). De esta forma, las Cyanobacterias proveen un suplemento nutricional importante para el crecimiento y desarrollo de las esponjas. El género *Synechococcus* ha sido catalogado como el más influyente en el flujo de carbono de las esponjas de la clase *Desmospongiae*, no sólo por su alta abundancia sino por la gran cantidad de copias de transcritos asociadas al anabolismo de carbohidratos (Botté *et al.*, 2019; Simister *et al.*, 2012). Estas bacterias simbiotes además de participar en el metabolismo del carbono, juega un papel importante en la fijación del nitrógeno y en la defensa del tejido de la esponja, produciendo un *biofilm* en la superficie y el mesohilo del individuo que actúa como aislante al daño de los rayos UV (Konstantinou *et al.*, 2018).

Se ha reportado que dentro de la comunidad simbiote de algunas esponjas marinas de la familia *Pachastrellidae* se encuentran especies bacterianas con perfil quimioautotrófico, en el que las bacterias pueden asimilar sulfatos e incorporarlos en vías de metabolismo energético. Algunos géneros representantes son *Bathymodiolus sp* y *Methilobacter sp.* (Nishijima *et al.*, 2010; Webster & Taylor, 2012)

Las descripciones antes mencionadas son muestra de la gran variedad de microorganismos y vías metabólicas activas en ellos que participan activamente en la fijación y transformación del carbono que sirve de sustrato propio, para el consorcio y para la esponja hospedera.

**Asimilación de Nitrógeno:** Las bacterias asociadas a las esponjas marinas han demostrado una alta capacidad en la fijación, asimilación y transformación de Nitrógeno, a fin de disponibilizarlo para la comunidad bacteriana y la esponja hospedera (de Voogd *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 2011).

Las comunidades bacterianas presentan numerosas vías de participación en el ciclo del nitrógeno como lo es la vía ANAMMOX (o degradación anaeróbica del amonio), con los Planctomycetales como filo representativo; desnitrificación, con los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Aquificae, como representantes de este proceso metabólico; fijación de nitrógeno, nitrificación, asimilación, reducción y mineralización de amonio, con el filo Nitrospira, caracterizado en numerosos estudios como el filo más relevante en el metabolismo del nitrógeno para varias especies de poríferos, incluido el género *Aplysinia*

(Hoffmann *et al.*, 2009; Reveillaud *et al.*, 2014); las cuales complejizan las interacciones de la microbiota, incrementando el número de especies bacterianas asociadas y la dependencia de las mismas para la consolidación y mantenimiento del holobionte (Hoffmann *et al.*, 2009).

Estudios dirigidos a la detección y cuantificación de genes involucrados en enzimas usadas en la fijación del nitrógeno como *nifH* (que codifica para una subunidad nitrogenasa) en esponjas de la clase *Desmospongiae* como *Ircinia strobilina* y *Mycale laxissimai*, demostraron que la principal participación está asociada los filos Cyanobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Li, 2019; Mohamed *et al.*, 2010). Para el caso de *Xestospongia muta*, una esponja ampliamente descrita, los análisis metatranscriptómicos han encontrado que tal y como los anteriores resultados quienes participan activamente en la fijación del nitrógeno son las bacterias del filo Cyanobacteria, Cloroflexi, Proteobacteria y Actinobacteria (Fiore *et al.*, 2015), aunque existen investigaciones que suman a la lista de bacterias fijadoras de nitrógeno la clase Flavobacteria (de Voogd *et al.*, 2015).

Otros reportes en la caracterización del metabolismo del nitrógeno asociado a la microbiota de los poríferos, describen comunidades bacterianas que metabolizan los productos de desecho de las esponjas, principalmente, asimilando el amonio a través de la vía GS-GOGAT, que involucra a la glutamín-sintasa y a la aminotransferasa oxoglutarato (Hentschel *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016). Además de las vías antes mencionadas, se han caracterizado comunidades bacterianas asociadas a esponjas, que pueden metabolizar la úrea (principal componente de desecho de animales pertenecientes al nicho coralino), convirtiéndose en una fuente alternativa de nitrógeno, en escases de otras fuentes del mismo (Webster & Taylor, 2012).

Las caracterizaciones metabólicas y taxonómicas de las comunidades asociadas a esponjas marinas han permitido describir los procesos activos para el metabolismo y ciclo de elementos esenciales como el nitrógeno, que va desde la obtención de este nutriente gracias al proceso de filtrado, hasta el aprovechamiento de productos de excreción de la esponja y otros organismos eucariotas asociados, lo que demuestra que la comunidad bacteriana puede articularse en todos los niveles del

ciclo del nitrógeno, aprovechando los sustratos de cada nivel (Hoffmann *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2010; Webster & Taylor, 2012).

Aunque la participación de las comunidades bacterianas en la asimilación del nitrógeno es muy activa y dinámica, la contribución de éstas y de la esponja al ciclo del nitrógeno del ecosistema arrecifal no es significativa en áreas del caribe, pero sí lo es en otras regiones geográficas como en el hemisferio sur y los polos (Gilan *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2009; Webster & Taylor, 2012).

La composición y estructura que desarrollen las comunidades bacterianas del holobionte, definen en gran medida las interacciones ecológicas entre los individuos de esponja y el nicho en el que viven. Por tanto, resulta de interés la caracterización de estas comunidades, que proveen no sólo información de las especies bacterianas asociadas, sino de los procesos complejos que podrían estar realizando en su interior, que pueden suponerse tras el conocimiento del perfil bioquímico reportado para las especies encontradas (Hentschel *et al.*, 2003; Wulff, 2001).

Múltiples estudios han usado técnicas de secuenciación de última generación para la determinación de las especies bacterianas del holobionte de las esponjas, encontrando que en general y sin distinción de especie, se asientan en abundancia filos como Chloroflexi, Cyanobacteria, Actinobacteria y Proteobacteria (Principalmente Alfa y Delta-Proteobacteria)(Schmitt *et al.*, 2011; Siegl *et al.*, 2011; Simister *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016). En estudios descriptivos aplicados a especies particulares de esponjas, se ha propuesto que las comunidades bacterianas son específicas de cada género de porífero (incluso de cada especie), encontrando, por ejemplo, que especies de esponjas del género *Hexadella* y *Mycale* comparten una composición de microbiota única de ese grupo taxonómico (Reveillaud *et al.*, 2014); y especies como *Ircinia ramosa* posee una microbiota bacteriana que difiere significativamente del resto de las especies de su género (Webster *et al.*, 2010).

Además de la especificidad de las comunidades bacterianas por género o especie de esponjas, se ha estudiado un filo candidato *Poribacteria* reportado únicamente para ese taxón animal (Thomas *et al.*, 2016). El filo *Poribacteria* fue propuesto en el

año 2004 por Fieseler y colaboradores, como un nivel taxonómico que agrupa bacterias cercanas a los filos Planctomycetes, Verrucomicrobia y Chlamydia, pero que presentan menos del <75% de similitud con estos grupos y sólo se encuentran asociados a tejido de esponja marina, descritos por microscopía electrónica como células bacterianas asociadas a cuerpos nucleares (compartimientos nucleados que permiten el ingreso y almacenamiento de bacterias), descritos únicamente para el filo Planctomycetes (Fieseler *et al.*, 2004; Siegl *et al.*, 2011; Webster & Taylor, 2012). Tal como se describió anteriormente, las bacterias identificadas dentro del filo Poribacteria participan activamente dentro del holobionte en el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Mohamed *et al.*, 2010), y al tener relaciones físicas y fisiológicas tan estrechas, demuestran que este filo, tal como los otros participantes en el holobionte, co-evolucionan con las esponjas, se transmiten de forma vertical y generan asociaciones particulares con cada individuo, respondiendo a las presiones ambientales a lo largo de la vida del porífero (Taylor *et al.*, 2007a; Webster & Thomas, 2016).

El género de poríferos *Xestospongia* se ha descrito en numerosas investigaciones dado el impacto que ha tenido en el descubrimiento de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico. Por ejemplo, de la especie *X. testudinaria* se encontraron péptidos citotóxicos producidos por la comunidad bacteriana simbiote que mostraron una alta toxicidad en cultivos de células de cáncer cervical (HeLa)(Sathiyarayanan *et al.*, 2017). Para el género *Xestospongia* se ha reportado una alta diversidad y dominancia asociada al filo Cloroflexi, seguido del filo Cyanobacteria y Nitrospira (Hentschel *et al.*, 2012), reportado en numerosas ocasiones específicamente para las especies *X. muta* y *X. testudinaria* (de Voogd *et al.*, 2015; Fiore *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011) Los filos con perfil heterotrófico más abundantes en las comunidades bacterianas asociadas a *Xestospongia* son Aquificiaae, Proteobacteria (donde delta y gamma- proteobacterias son dominantes, y en menor medida, alfa y beta-proteobacteria) y Actinobacteria. Los filos menos dominantes son Firmicutes (representado principalmente por las clases Bacilli, Negativicutes y Clostridia), Acidobacteria y Bacterioidetes, con una muy baja

abundancia, para todos los reportes encontrados (de Voogd *et al.*, 2015; Fiore *et al.*, 2015; Hentschel *et al.*, 2001). Para este género también se ha reportado la presencia del filo Poribacteria, sin embargo, estos reportes se han hecho con una baja riqueza y abundancia en las muestras analizadas; resultados similares a los encontrados para el género *Aplysina*, aunque los reportes de abundancia y riqueza son incluso más bajos que los reportados para *Xestospongia* (Fieseler *et al.*, 2004; Simister *et al.*, 2012; Slaby *et al.*, 2017), demostrando que aunque es un filo candidato propio de los poríferos, no es dominante en la comunidad bacteriana y se reportan pocas especies asociadas (Webster & Taylor, 2012).

Para el género *Aplysina* se han descrito comunidades bacterianas en las que participa el filo Poribacteria, pero, comparado con géneros de esponja ampliamente descritos como *Xestospongia*, *Aplysina* presenta la menor abundancia de bacterias de este filo, asociada al holobionte (Slaby *et al.*, 2017). Al comparar distintas especies de este género, se ha encontrado que las comunidades bacterianas son muy similares entre especies testeadas (con cerca del 80% de similitud) (Hentschel *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2011; Simister *et al.*, 2012) y dominan principalmente el filo Cloroflexi, Planctomycetes y del filo Proteobacteria, la clase delta-proteobacteria; mientras que el filo Firmicutes, el filo Actinobacteria, el filo Bacteroidetes y las clases beta y gamma-proteobacterias, se encuentran en baja abundancia (Friedrich, *et al.*, 2001; Pimentel-Elardo, *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2016). Sin embargo, un estudio realizado por Hardoim y colaboradores en el 2009 encontró que en *Aplysina fulva*, Firmicutes es uno de los filos dominantes (Hardoim *et al.*, 2009), lo que lleva a pensar que existen modificaciones a la composición bacteriana del simbionte que debe modularse por otros eventos distintos de la pertenencia a un género de esponja específico (Pawlik, 2011).

Dentro de los estudios realizados se analizó el nivel de riqueza de las comunidades bacterianas asociadas a los géneros *Aplysina* y *Xestospongia*, reportando que la especie *X. bocatorensis* posee una menor riqueza en su comunidad bacteriana asociada, mientras *A. fulva* y *A. cauliformis* poseen un índice inverso de Simpson-

Gini alto, que traduce en una alta riqueza y equitabilidad de especies, por tanto una diversidad compleja en la comunidad bacteriana simbiote (Easson & Thacker, 2014; Thomas *et al.*, 2016). Además, reportes de comparación entre comunidades de diferentes esponjas arrojaron que, tal como se mencionó antes, el género *Aplysina* tiene comunidades muy similares entre las especies de porífero de este grupo taxonómico, mientras *Xestospongia* posee similitud entre comunidades bacterianas de menos del 60% (Thomas *et al.*, 2016).

Para el género de esponjas *Desmapsamma* no se encuentran reportes detallados sobre la composición de la comunidad bacteriana simbiote. Sin embargo, se han realizado aproximaciones donde se reporta presencia de Actinobacterias (aunque sin descripción de niveles taxonómicos inferiores) (Liu, Lai, & Shao, 2019). Adicionalmente, se han realizado ensayos de cultivo de esponjas de este género, encontrando que cerca de 48h después de la siembra del individuo en el acuario, éste empieza procesos de degradación y necrosis del tejido que aceleran hasta alcanzar la muerte del animal en 72h (Wanick & Cunha, 2015). Los autores especulan que este organismo, al encontrarse no sólo en arrecifes coralinos sino asociados a zonas de manglar (creciendo en la superficie de las raíces sumergidas de *Rizophora mangle*), posee requerimientos fisiológicos muy específicos para ambos nichos, donde depende estrechamente no sólo de los nutrientes asociados al cuerpo de agua que pueden estar disponibles en el cultivo, sino también de las condiciones fisicoquímicas, que incluyen el cambio de salinidad del agua, el intercambio de microbiota asociada a la columna de agua y al sustrato donde esta esponja crece; de tal forma que en ausencia de esas relaciones ecológicas, tanto el porífero como la microbiota asociada entran en estrés, desestabilizando la homeostasis del simbiote y provocando la muerte (Hunting *et al.*, 2013; Wanick & Cunha, 2015). De este género también se reporta la producción de sustancias inhibitoras del fouling, que no se han caracterizado a la fecha, sin reconocer si son producto del metabolismo del porífero o de la comunidad bacteriana simbiote (Ribeiro *et al.*, 2013).

Aunque la mayor contribución de las comunidades bacterianas al holobionte de los poríferos está asociado a la asimilación del carbono y el nitrógeno (Bell, 2008; Taylor *et al.*, 2007a; Webster & Taylor, 2012), las bacterias asociadas también cumplen funciones de defensa del holobionte mediante procesos de comunicación bacteriana y producción de sustancias antagónicas o inhibidoras de *Quorum Sensing* que modulan, promueven o evitan el asentamiento de otros organismos de todos los reinos, seleccionando los participantes del micronicho y coordinando la manifestación de fenotipos sociales que contribuyen a la homeostasis del holobionte, evitando parásitos, formación de *biofouling* o proliferación de enfermedades (Cebrian *et al.*, 2011; Pawlik, 2011; Thurber *et al.*, 2009).

Cuando se produce un cambio sobre la comunidad bacteriana establecida en un individuo de esponja sano, muchos microorganismos que se encontraban limitados encuentran la forma de proliferar sin la presión que la comunidad ejercía sobre ella, promoviendo con esto un aumento en la abundancia de esa población particular junto con la consecuente producción de metabolitos secundarios asociados que pueden deteriorar al simbiote, o llamar a nuevas bacterias causantes de patologías. Un ejemplo de esto es el reporte para la especie *Geodia barretti*, donde en un estado saludable, los filos dominantes de la comunidad bacteriana asociada son Proteobacteria (Particularmente Gamma-proteobacterias), Thaumarchaeota, Acidobacterias y Poribacterias, mientras que en estado de enfermedad los filos más abundantes son Firmicutes, Bacterioidetes y del filo Proteobacteria la clase Delta-proteobacteria, que promueven la decoloración y degradación del tejido del porífero, junto con el aumento en la formación de *biofouling* (Luter *et al.*, 2017).

Otro ejemplo en el cual un cambio en la composición de la microbiota altera la integridad de la esponja hospedera, es el reportado para la especie *Lubomirskia baicalensis*, donde existe un cambio en la composición de la microbiota y en estado de enfermedad aumenta dramáticamente la abundancia del filo Cyanobacteria y Verrucomicrobia, mientras decrece la abundancia de los filos Bacterioidetes, Actinobacteria, Planctomycetes y Proteobacteria (sin especificidad en la clase que se reduce en la patología) (Denikina *et al.*, 2016). El cambio en la composición de la comunidad simbiote no se da únicamente en la diferencia de abundancia en los

filos antes descritos, sino que es acompañado por una reducción significativa de la diversidad de especies asociadas, haciendo que la comunidad se homogenice y primen poblaciones que producen en el tejido una pigmentación rosada anormal, seguida de una supresión en el número de algas asociadas, para concluir con la necrosis del tejido y muerte del animal (Denikina *et al.*, 2016).

En el caso de *Agelas tubulata*, en estado de salud los filos dominantes son Proteobacteria, Thaumarchaeota y Chloroflexi mientras en estado de enfermedad, estos se reducen dramáticamente mientras incrementa la abundancia de los filos Proteobacteria (particularmente el orden Rhodobacterales, Sphingomonadales y la familia Ectothiorhodospiraceae), promoviendo la pérdida de tejido de esponjina, dejando expuesto un cúmulo de fibras orgánicas retenidas en un entramado de espículas expuestas (Deignan, Pawlik, & Erwin, 2018; Deignan & Pawlik, 2016).

Comparando las enfermedades asociadas a esponjas producto de un cambio en la composición de la microbiota simbiote, es claro que no existe un cambio predecible durante los eventos de enfermedad que permita identificar un agente etiológico específico, y que en cambio, demuestra que el proceso de enfermedad se encuentra asociado a las condiciones del contexto en el que la comunidad bacteriana se desestabiliza, que involucra entre otros efectos, el aumento de la temperatura del océano, la eutrofización del cuerpo de agua y el aumento de salinidad (Cebrian *et al.*, 2011; Deignan *et al.*, 2018; Denikina *et al.*, 2016; Luter *et al.*, 2017).

#### **4.4 QUORUM SENSING**

El *Quorum Sensing* (QS), es el mecanismo por el cual una comunidad bacteriana regula su expresión genética en respuesta a un aumento en la densidad celular, mediante el uso de una molécula señal (Fuqua *et al.*, 1994; Miller & Bassler, 2001; Papenfort & Bassler, 2016). Con el QS, las poblaciones bacterianas se cohesionan formando comunidades y adquieren complejidad conforme interpretan las señales químicas, modulando el entorno conformado (Solano *et al.*, 2014).

El QS puede dividirse en cuatro etapas: (1) se producen unas moléculas señal por parte las células bacterianas; (2) estas moléculas se liberan ya sea de forma activa o pasiva hacia el medio circundante; (3) una vez las moléculas alcanzan una

concentración suficiente para ser detectadas por el total de la población en el ambiente (concentración que es directamente proporcional a la densidad poblacional), son reconocidas por receptores específicos de otras bacterias y de sí mismas.(4) Tras el reconocimiento de la molécula señal se generan cambios en la regulación de la expresión genética (Bodelón *et al.*, 2016; Leoni & Rampioni, 2018; Papenfort & Bassler, 2016).

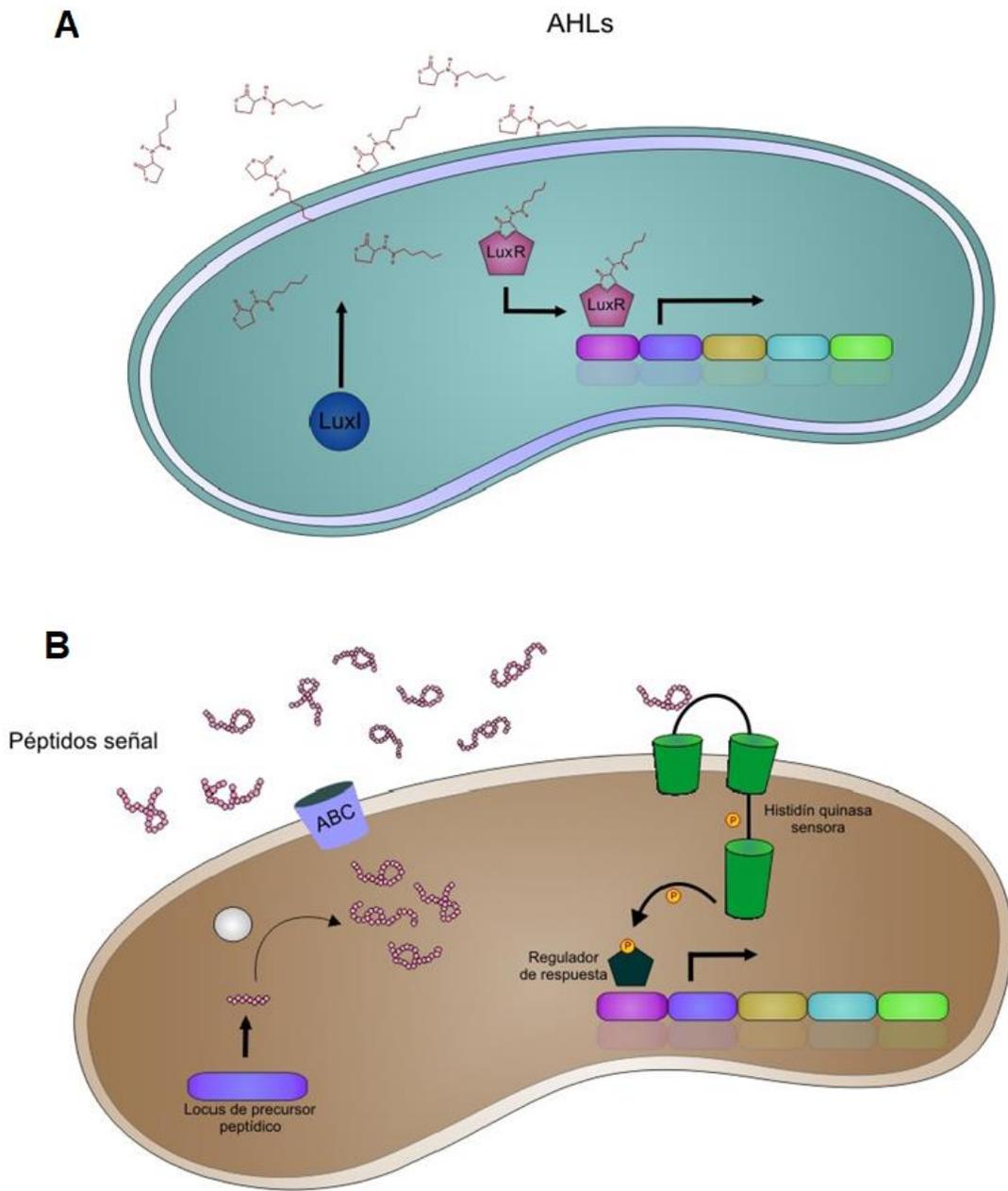
Los pasos anteriores contribuyen a la expresión de fenómenos tan llamativos como la bioluminiscencia en el calamar *Euprymna scolopes*, que albergando en una cavidad aislada a una población bacteriana de *Vibrio fischeri*, promueve el QS usando moléculas señal tipo Acil Homoserín Lactonas (AHLs), sintetizadas por sintetasas de la familia LuxI, que una vez alcanzan la concentración adecuada en el espacio extracelular, difunden hacia el interior cada célula bacteriana y es detectada por un receptor específico que recibe el nombre de LuxR, que junto a la molécula señal se convierte en factor de transcripción, promoviendo la expresión de los genes de la bioluminiscencia (Dickschat, 2010). Este modelo, aunque sencillo, sirvió como punto de partida para la descripción de nuevos circuitos que activan otros fenotipos, algunos asociados con la producción de factores de virulencia, promoción de la generación y maduración del *biofilm* y elaboración de algunos pigmentos específicos como la violaceína (Mireille *et al.*, 2015; Papenfort & Bassler, 2016; Solano *et al.*, 2014; Swift *et al.*, 1993).

*Salinispora arenícola* y *Salinispora pacífica*, dos especies de actinobacterias pertenecientes a esponjas del pacífico producen moléculas tipo 3-oxo-C12-AHL, descritas tras la caracterización con cromatografía líquida y espectrometría de masas. Aproximaciones bioinformáticas demostraron que estas moléculas, participan en un circuito de comunicación bacteriana LuxI/LuxR, similar al descrito para *Vibrio fischeri* (Bose *et al.*, 2017).

A diferencia del modelo canónico asociado a bacterias Gram negativas donde la molécula tipo AHL difunde de forma pasiva al interior de cada célula bacteriana; en la comunicación mediada por péptidos, existe un transporte activo dependiente de proteínas que usan energía para el reconocimiento, transformación y exportación de esos péptidos cortos que no difunden al interior de la célula, sino que son

captados por otras proteínas receptoras o transportadoras, ancladas a la membrana y pared celular de cada bacteria (Dickschat, 2010; Monnet, Juillard, & Gardan, 2016).

En el modelo canónico propuesto para los eventos estudiados en este grupo de bacterias, la molécula señal es producida como un péptido grande que luego de ser clivado se cicla y se exporta mediante canales exportadores transmembranales tipo ABC. Una vez fuera de la célula y alcanzando la concentración umbral, la molécula se adhiere a un receptor transmembranal que, tras la unión de la molécula, realiza un cambio en su estructura, promoviendo corriente abajo, eventos de fosforilación y defosforilación que activan factores de transcripción que encienden genes importantes en el contexto de comunidad. En caso de que el péptido ingrese, lo hace mediante una proteína transmembranal que reconoce esa secuencia y permite su ingreso selectivo; y una vez dentro, es capaz de adherirse a un factor de transcripción particular que al activarse promueve la transcripción de genes particulares necesarios para el consorcio (Monnet *et al.*, 2016). Los dos modelos canónicos se ilustran en la Figura 1. (pg.33)



**FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE SISTEMAS CANÓNICOS DE *QUORUM SENSING* PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS**

**A.** Sistema canónico de QS en bacterias Gram negativas donde las AHLs son producidas por la sintetasa LuxI y se difunden de forma pasiva a través de la membrana. Tras un aumento en la concentración, estas moléculas se unen al receptor LuxR, activándolo e iniciando la expresión de genes particulares. **B.** Sistema canónico de QS en bacterias Gram positivas donde péptidos de cadena corta salen de la célula por medio de transportadores

tipo ABC y en altas concentraciones se unen a un receptor transmembranal de dos componentes, activando un factor de transcripción que inicia la expresión de genes particulares. (Tomado de Cárdenas, 2012)

Las moléculas señal tipo Acil Homoserín Lactonas han sido ampliamente estudiadas entorno a la descripción del QS, específicamente en bacterias Gram negativas, que son las que generalmente usan esta vía de comunicación, aunque en los últimos años estudios han demostrado que bacterias Gram positivas (de las que se han descrito en su mayoría comunicación celular mediante péptidos cortos) también producen y se comunican mediante este tipo de moléculas (Biswa & Doble, 2013; Pillai *et al.*, 2017; Steindler & Venturi, 2007). La primera evidencia de la producción *in situ* de AHLs por bacterias asociadas a esponjas marinas fue reportada en *Roseobacter ruegeria*, una Alfa-Proteobacteria aislada del porífero *Cymbastela concéntrica*. Los autores sugirieron que la presencia de AHLs puede estar implicada en la colonización de estas y otras bacterias sobre la superficie de la esponja (Taylor *et al.*, 2004).

Se han desarrollado varias herramientas para la detección de moléculas señal como los biosensores, que son bacterias modificadas genéticamente para detectar las señales de QS (generalmente detectando moléculas tipo AHL), y manifestar un fenotipo visible en respuesta, sin tener la capacidad de producir estas moléculas (Kumar *et al.*, 2017; Steindler & Venturi, 2007). Con los biosensores bacterianos, múltiples estudios sobre bacterias asociadas a simbiosis marinos han reportado la producción de moléculas señal que están interviniendo en la comunicación de esas bacterias con su consorcio. Por ejemplo, Mohamed y colaboradores reportaron que algunas especies bacterianas asociadas a las esponjas *Mycale laxissima* e *Ircinia strobilina* producen moléculas señal tipo AHLs, reportadas por los biosensores CV-AHL (Homólogo al biosensor CV026); At-AHL (Homólogo a pZLR12) y Sm-AHL *Sinorhizobium meliloti*, con rango de detección de AHLs con cadena C16 a la C20 (Mohamed, *et al.*, 2008). Dentro de los géneros descritos se encontró *Vibrio sp.*, *Silicibacter sp.*, *Pseudovibrio sp.* y *Erythrobacter sp.*, todos pertenecientes al filo Proteobacteria, que producen AHLs con cadenas laterales que se extienden desde 6 a 20 carbonos (Mohamed *et al.*, 2008).

Un estudio realizado por Mangano y colaboradores en esponjas marinas de la región polar (que posee más del 80% de la diversidad de esponjas del planeta), reportó especies bacterianas cultivables asociadas a los géneros *Pseudoalteromonas sp.*, *Roseobacter sp.*, *Vibrio sp.* y *Shewanella sp.* con actividad QS mediada por moléculas tipo AHLs de cadena entre 6 y 12 carbonos en su cadena lateral radical (Mangano *et al.*, 2018).

Durante los últimos años estos fenómenos de comunicación celular que promueven la estructuración las comunidades bacterianas, se ha convertido en tópico de interés entre los investigadores de la ecología microbiana marina, quienes han reconocido la complejidad detrás de los procesos de interacción celular que pueden estar promoviendo el bienestar de organismos marinos tan frágiles como las esponjas y los corales, así como pueden ser responsables del inicio y propagación de enfermedades y la producción de *biofouling* en esponjas (Cebrian *et al.*, 2011; Flemming & Wingender, 2010; Harder *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2014; Tait *et al.*, 2005; Wahl *et al.*, 2012; Wheeler *et al.*, 2006; Whiteley, Lee, & Greenberg, 1999), por tanto, esos primeros reportes de actividad QS en simbioses bacterianas asociadas a esponjas, adquieren un gran valor pues además de determinar que esos fenómenos de comunicación existen dentro del holobionte, ofrecen nuevos campos de estudio donde se pueden describir los eventos dependientes del QS y las relaciones bacterianas que complejiza.

Por ejemplo, las señales de QS, que resultan ser diversas y varían de acuerdo con la especie bacteriana, desempeñan un papel importante en la interacción ecológica entre las bacterias y su hospedero eucariota, incluso determinando fenómenos de asentamiento y desarrollo de organismos de orden superior. Un ejemplo de este fenómeno fue reportado por Franco y colaboradores, donde encontraron que sobre la concha del cangrejo *Pagurus longicarpus*, existen bacterias cultivables que se comunican vía AHL. La producción de estas moléculas no sólo está involucrada en la comunicación entre bacterias, sino que participa en la señalización de asentamiento y promoción de la metamorfosis de las larvas del cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus* que habitan en la superficie de la concha (Franco, Cadavid, Arévalo-ferro, 2019). Estos eventos de sensibilidad de los eucariotas a la producción

de moléculas de señalización bacteriana no han sido descritos para las esponjas hasta la fecha.

Los microorganismos también son sensibles a la producción de sustancias por parte de algas, corales y esponjas, que buscan promover o inhibir el asentamiento de ciertas especies de bacterias benéficas para el organismo hospedero. Por ejemplo, el alga verde *Ulva australis* utiliza señales de Acil- Homoserín Lactona (AHL) para promover el asentamiento en su superficie de bacterias como *Pseudalteromonas tunicata* y *Roseobacter gallaeciensis* que, al establecerse y formar *biofilm*, evitan el asentamiento y desarrollo de otras bacterias, posiblemente nocivas para el alga (Burke *et al.*, 2011; Mieszkin, Callow, & Callow, 2013; Rao, Webb, & Kjelleberg, 2006). Otro ejemplo es el alga roja *Delisea pulchra*, que produce una furanona halogenada que imita a las AHLs. Este compuesto bloquea la comunicación bacteriana inhibiendo el asentamiento y desarrollo de bacterias dependientes de este tipo de interacción, que pueden ser contaminantes para la macroalga (Defoirdt, Brackman, & Coenye, 2013; Harder *et al.*, 2012; Sandy *et al.*, 2011).

Se ha reportado que géneros de esponjas marinas como *Agelas sp.*, *Aplysina sp.* y *Ectyoblasia sp.* producen sustancias que promueven la adhesión y generación de *biofilm* de *Vibrio harveyi*, mediante moléculas descritas como Esceptrina, Oroidina Aeroplysinina-1, Formosida, y Amfitoxina etc., donde esta última molécula produce un efecto mayor de adhesión de las bacterias, sobre el resto de moléculas relacionadas (Kelly *et al.*, 2003). Este es un único reporte a la fecha de la forma en que las esponjas pueden propiciar el acercamiento y fijación de bacterias benéficas para el consorcio bacteriano asociado. Además, algunas esponjas sintetizan sesterterpenos que actúa como *antifouling*, inhibiendo el QS. Así, las esponjas pueden interferir en la comunicación bacteriana como método para modular la formación de incrustaciones en su superficie (Quévrain & Domart-coulon, 2014).

El *Quorum Sensing*, al proveer los mecanismos necesarios para la comunicación y promoción de comportamientos sociales dentro del consorcio bacteriano, permite que dentro de la comunidad se desarrollen procesos de regulación de asentamiento y proliferación de nuevos participantes o de bacterias ya presentes, además de complejizar, jerarquizar y producir vías de dependencia entre algunos participantes

del consorcio (Rice *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2014). Por todo lo anterior, la información obtenida de los participantes en el consorcio, su papel metabólico y de regulación dentro de él, así como las vías de comunicación usadas para sus interacciones sociales, contribuye significativamente a la comprensión de la complejidad de las comunidades bacterianas y permite establecer eventos sociales que enriquecen algunos modelos biológicos que pueden predecir el comportamiento de la comunidad frente a distintas modificaciones del entorno o en respuesta a presiones ambientales (Berry *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2018).

En la actualidad, aunque existen reportes del cambio en la composición de la comunidad simbiote asociado a esponjas marinas de diferentes latitudes, en diferentes estados de desarrollo y en estados de enfermedad, y se han hecho investigaciones en torno a la producción de moléculas señal y metabolitos secundarios como inhibidores o promotores de la formación de *biofilm*, así como sustancias antagónicas de interés farmacológico e industrial; no existen aproximaciones donde converjan estas cualidades metabólicas como elementos asociados a una comunidad bacteriana compleja que puede usar estas moléculas con actividad como herramientas de modulación y manutención del holobionte.

#### **4.1 ESPONJAS MARINAS**

Las esponjas marinas se encuentran reportadas como los animales multicelulares más primitivos, con un registro fósil que data de hace aproximadamente 600 millones de años, desde tiempos del precámbrico (Li *et al.*, 2017). El filo Porífera, grupo taxonómico al que pertenece este organismo sésil, hace parte de las comunidades bentónicas marinas, distribuyéndose en hábitats templados, tropicales y polares; en este último, las esponjas pueden ocupar más del 80% de la superficie marina disponible (Abdelmohsen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011).

Las esponjas marinas tienen un cuerpo simple que ha permanecido sin cambios significativos durante toda su evolución. Al interior, las esponjas poseen una red compleja de conductos y cámaras cubiertos por una capa interna de células llamadas coanocitos: células flageladas encargadas del transporte del agua hacia el interior de la esponja y de la captura del alimento durante el movimiento del

líquido. En el sistema de cámaras y conductos se encuentra un gran número de microorganismos procariotas y eucariota que conviven en simbiosis con este hospedero ayudando a la captura y asimilación de nutrientes (Thomas *et al.*, 2016). El proceso de filtración en la esponja suministra oxígeno a las células propias del animal y a los microorganismos simbiotes, facilitando además la eliminación de tóxicos y desechos propios y de la comunidad microbiana asociada, así como la liberación y dispersión de los gametos de la esponja. El sistema de conductos y cámaras ciliadas permite que la esponja filtre su propio volumen en agua marina cada cinco segundos (Dudley-evans *et al.*, 2012; Muller, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Las esponjas marinas, en regiones cálidas como el caribe colombiano, tienen la capacidad de erosionar las estructuras coralinas y esa función es, probablemente, la primera descrita como rol funcional en los ecosistemas en que habitan (Bell, 2008). Durante el proceso de erosión, las esponjas procesan las estructuras carbonatadas sólidas en pequeños fragmentos que constituyen el sedimento, y la producción de estas partículas afecta la integridad de la estructura del coral. Aunque pareciera una actividad contraproducente, mantener el balance entre la erosión y el crecimiento de los esqueletos coralinos es crucial para el desarrollo y la sustentabilidad del ecosistema de arrecife (Bell, 2008; Stubler *et al.*, 2015). Su actividad erosiva es casi insignificante en regiones templadas y polares, y la tasa en que realiza esta función depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, abundancia de alimento, tipo de sustrato y la fisiología de la esponja (Bell, 2008). Ward-Paige y colaboradores mostraron que un factor que incrementa la actividad erosiva de las esponjas está directamente asociado con la eutrofización de las aguas, producto de la actividad humana en las costas, lo que en consecuencia afecta el balance de erosión-crecimiento antes mencionado (Stubler *et al.*, 2015; Ward-Paige *et al.*, 2005).

El filo porífera tiene, además, el rol de incrementar la supervivencia de los corales en los arrecifes del Caribe ya que se encargan de reunir fragmentos calcáreos y consolidarlos al sustrato inicial, lo que contribuye a aumentar la tasa de crecimiento del arrecife. Estudios demostraron que la supervivencia del coral aumenta en un orden de magnitud dada la presencia de esponjas, comparado con regiones

desprovistas de estas; allí, las esponjas contribuyen a la formación del sustrato donde más adelante se asentarán y desarrollarían corales del género *Porites* (Bell, 2008; González-Rivero *et al.*, 2011).

Dado el gran volumen de agua que es filtrada constantemente por las esponjas, restando oxígeno y nutrientes de la columna de agua tales como la sílice y el nitrógeno, estos organismos sésiles alteran significativamente el ecosistema pelágico diezmando los afloramientos de fitoplancton dada la reducción en la disponibilidad de nutrientes, modificando la actividad en general del ciclo del carbono (Peterson *et al.*, 2006).

En los arrecifes coralinos, los nutrientes como el nitrógeno son escasos y forman agregados con la materia particulada o disuelta en el cuerpo de agua, haciendo que su disponibilidad sea reducida. Para que el nitrógeno, en sus formas  $N_2$ , NO y  $NH_3$ , se encuentre disponible para los organismos del arrecife, debe ser transformado en formas de nitrógeno asimilables como el  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$ , proceso que es ejecutado principalmente por microorganismos como las Cyanobacterias, las bacterias fijadoras de nitrógeno, las bacterias nitrificadoras y denitrificadoras y las bacterias y archeas oxidadoras de amonio que, asociadas al tejido de la esponja, son encargadas de poner a disposición este nutriente tanto para los organismos vecinos como a la esponja misma. (Mohamed *et al.*, 2010; Ribes & Jimenez, 2011; Webster & Thomas, 2016).

Todos los procesos de intercambio de nutrientes y oxigenación se encuentran relacionados directamente con la actividad metabólica tanto de la esponja como de la comunidad microbiana simbiote, que, en interacción, potencian y complejizan los eventos de nutrición indispensables para la sustentabilidad de los ecosistemas coralinos, a los que los porífera pertenecen en su gran mayoría. Así, la existencia de estas relaciones constituyen un componente vital para la conservación de los ecosistemas coralinos (Reveillaud *et al.*, 2014; Webster & Thomas, 2016).

Se han descrito más de 8500 especies pertenecientes este Filo Porifera de las que varias del género *Aplysina*, *Amphimedon* y *Desmapsamma* han sido investigadas para la obtención de nuevos productos naturales, para la descripción de las comunidades microbianas simbiotes y en búsqueda del conocimiento de su

actividad inmune y su papel en los ecosistemas marinos (Abdelmohsen *et al.*, 2014; Bell, 2008; Hentschel *et al.*, 2012; Hunting *et al.*, 2013; Quévrain & Domart-coulon, 2014; Zhang *et al.*, 2011). Este interés radica en la capacidad que tienen las esponjas y sus comunidades bacterianas asociadas de sintetizar y/o acumular metabolitos secundarios: sustancias usadas en la defensa química y en la comunicación celular propia y con microorganismos huéspedes para garantizar su supervivencia y la de sus simbioses, modulando la adhesión y proliferación de nuevos organismos en su superficie (Leyton *et al.*, 2017; Slaby *et al.*, 2017). De las 25000 moléculas con propiedades bioactivas de origen marino que han sido identificadas, una tercera parte corresponde a sustancias extraídas de este filo animal (Quévrain & Domart-coulon, 2014). Dentro de las funciones de estas moléculas se incluye la defensa contra depredadores, competidores, organismos incrustantes y microorganismos (Taylor *et al.*, 2007a).

Aunque la producción de metabolitos secundarios producidos por los poríferos está destinada a controlar relaciones entre los microorganismos simbioses, la esponja hospedera y el contexto ecológico en general, estos compuestos se han investigado con posibles oportunidades de bioprospección, a fin de caracterizarlas y disponibilizarlas con objetivos de interés económico, clínico e industrial. Por ejemplo, de las esponjas pertenecientes a la familia Alysiniellidae, donde se encuentran géneros representativos como *Suberea* y *Aplysina*, se han reportado alcaloides simples y poliaromáticos, compuestos halogenados y terpenoides con actividades biológicas conocidas, como la inhibición de enzimas, efectos oncolíticos y citotóxicos y actividad antibacteriana y antifúngica, entre otras (Shaala, *et al.*, 2015). Reverter y colaboradores, en el 2015, caracterizaron dienonas producidas por esponjas del género *Aplysina*, determinando además que la mayor producción de este compuesto se da en estados de estrés del organismo, generalmente por el aumento de temperatura del agua, aunque se ha caracterizado como elemento de defensa química (Reverter, *et al.*, 2016). Las dienonas aisladas de esponjas han sido caracterizadas como sustancias citotóxicas, antifúngica y productoras de apoptosis en células de cáncer de seno (Castro *et al.*, 2019; Lam, Cadelis, & Copp, 2017; Robles-Escajeda *et al.*, 2016). Del género de esponjas *Xestospongia*, se han

reportado metabolitos producidos por los poríferos de este grupo taxonómico como alcaloides tipo isoquinolinequinonas con actividad citotóxica y antitumoral (Huang *et al.*, 2016).

La importancia del papel ecológico que desempeñan los poríferos, la complejidad de su microbiota simbiote y la bioprospección tras el estudio de los metabolitos producidos por estos organismos, son tópicos de gran interés por la comunidad científica que hasta la fecha aún esfuerzos por comprender mucho más las relaciones ecológicas, bioquímicas y funcionales de estos organismos tan importantes para la sostenibilidad de los ecosistemas coralinos, de los que depende todo el complejo ecosistémico marino y la economía de comunidades costeras (Allemand & Osborn, 2019; Cabral & Rollan, 2018; Topor, *et al.*, 2019).

#### **4.5 BIOFILM**

El QS modula la expresión genética de las bacterias cuando estas se encuentran en comunidad (Papenfort & Bassler, 2016), sincronizando la activación de nuevas rutas metabólicas, la producción de factores de virulencia, la transmisión y recepción de elementos genéticos para la resistencia bacteriana y la formación de estructuras como los *biofilms* o biopelículas (Zimmer *et al.*, 2014). El *biofilm* es definido como una comunidad estructurada de células bacterianas que se desarrolla en una matriz de exopolisacáridos autoproducidos y que se encuentra adherida a una superficie inerte o viva (Batista *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016; Solano *et al.*, 2014; Wahl *et al.*, 2012). Las bacterias pertenecientes a esta estructura encuentran ventaja en su participación dentro del *biofilm* sobre la vida planctónica, pues les permite aumentar su recombinación genética, su capacidad de defensa y les provee de un recurso nutricional constante (Kim *et al.*, 2009; Okutsu *et al.*, 2016; Ritchie, 2006; Wahl *et al.*, 2012).

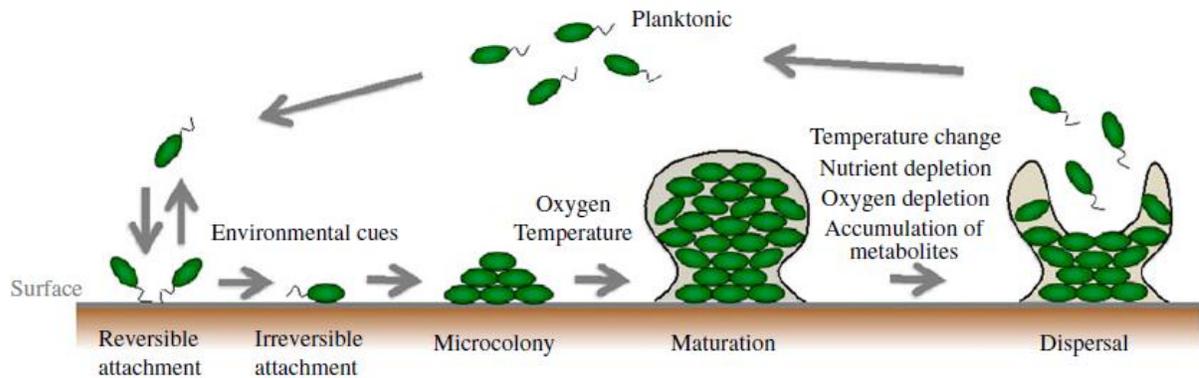
En la mayoría de los *biofilms*, los microorganismos representan menos del 10% del peso seco, mientras que la matriz puede presentar más del 90%. La matriz es el material extracelular, producido por los propios microorganismos asociados a la

estructura y se trata de un complejo de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS), que forman el andamiaje para la estructura tridimensional de la biopelícula. Estos EPS son responsables de la adhesión a la superficie y de la cohesión entre el conglomerado celular y el área de asentamiento (Flemming & Wingender, 2010; Kiran *et al.*, 2018; Wahl *et al.*, 2012).

La formación de *biofilm* puede resumirse en cinco pasos que inician tras la detección de las condiciones ambientales favorables para la formación de esta estructura, por parte de las bacterias planctónicas circundantes (Dobretsov, Teplitski, & Paul, 2009; Dufour, Leung, & Lévesque, 2012).

En un primer paso, las bacterias planctónicas que detectan una alta concentración de nutrientes en la superficie de alguna estructura inerte o en el tejido de un animal o planta, se adhieren de forma reversible a la superficie, formando una monocapa celular usando estructuras como proteínas de superficie, pilis, fimbrias o cilios. Tras la adhesión inicial, el segundo paso consiste en fortalecer la unión de esas bacterias al sustrato, haciendo que sea irreversible. En este paso, luego de la adhesión fuerte, las bacterias inician su división celular y forman microcolonias. En un tercer paso, la población bacteriana inicia el proceso de maduración, produciendo exopolisacáridos que más adelante constituirá la matriz principal de la biopelícula; aquí, además de la formación de la matriz, las bacterias desarrollan crecimientos en forma de setas que aumentarán el área de contacto con el cuerpo de agua donde se encuentra sumergido, optimizando la incorporación de nutrientes (Hou *et al.*, 2019). En el cuarto paso, la población bacteriana se complejiza aún más, consolidando las colonias preexistentes, permitiendo el asentamiento de nuevos individuos y promoviendo la diferenciación celular asociado a perfiles fenotípicos especializados en la asimilación de nutrientes específicos para el consorcio, bajo el contexto de temperatura y disponibilidad de oxígeno. En el quinto y último paso, las bacterias pertenecientes al *biofilm* ya maduro se reorganizan, formando canales y orificios que potencian la captación de nutrientes y otras moléculas asociadas al censo del ambiente (Hou *et al.*, 2019). En este nivel, las bacterias producen sustancias que promueven o inhiben la adhesión de nuevas bacterias participantes,

manteniendo así la homeostasis del micronicho elaborado (Guillonneau *et al.*, 2018). En este paso, además, existe una exportación de bacterias plantónicas con perfiles metabólicos fortalecidos por la comunidad de la que se desprenden, teniendo ventaja sobre las presiones ambientales a las que se enfrenta durante el proceso de colonización, de tal forma que resista a antibióticos, toxinas y aproveche nutrientes escasos que otros microorganismos del cuerpo de agua no metabolizan (Toyofuku *et al.*, 2016). Esta liberación sucede cuando la concentración de nutrientes y oxígeno dentro del *biofilm* se reduce significativamente, generando estados de estrés dentro de la comunidad que promueven la liberación y búsqueda de nuevos nichos (Guillonneau *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2019). Durante el establecimiento de los pasos cuatro y cinco, los eventos de comunicación bacteriana se complejizan y aumentan las concentraciones de moléculas señal involucradas en QS, tales como las AHLs, péptidos señales, autoinductores, etc. Lo anterior permite que la comunidad sincronice sus fenotipos que están coordinados con el metabolismo del hospedero para mantener la homeostasis del holobionte (Pita *et al.*, 2016). Un esquema general de estos pasos se ilustra en la Figura 2. (pg. 43)



**FIGURA 2. ESQUEMA GENERAL DE LA FORMACIÓN DE *BIOFILM* Y EVENTOS TRASCENDENTALES DURANTE SU DESARROLLO**

(Tomado de Toyofuku *et al.*, 2016)

El *biofilm* bacteriano es considerado como el paso fundamental para la formación, maduración, sucesión y mantenimiento de las comunidades bacterianas asociadas

a organismos marinos como esponjas y corales. En la estructura del *biofilm*, la comunidad bacteriana desarrolla todo el arsenal de respuestas para la interacción entre el hospedero y el cuerpo de agua circundante, manteniendo la salud del organismo tras el rechazo a ciertos organismos procariontes o eucariotes con potencial patógeno; sin embargo, ese consorcio es susceptible a modificaciones del ambiente que promuevan el asentamiento y desarrollo de patógenos oportunistas. Por ejemplo, se ha reportado que la comunidad bacteriana asociada en *biofilm* a octocorales del género *Eunicea*, *Montastrea* y *Orbicella*, mantiene la homeostasis de los cnidarios y de sus algas zoosantelas asociadas, produciendo metabolitos primordiales para su supervivencia. Sin embargo, tras eventos de aumento de temperatura, eutrofización del cuerpo de agua y producción de sulfuros, la comunidad bacteriana se reorganiza y reestructura sus poblaciones especializadas, dando paso a la proliferación de organismos anaerobios que asfixian a cnidarios y algas simbiotes, generando un ambiente alto en sulfuro y derivados, que atrae nuevas bacterias degradadoras del tejido del octocoral que producen necrosis, provocando la muerte del animal en cuestión de días (Hadaidi *et al.*, 2018). Esta enfermedad nombrada “enfermedad de la banda negra” o BBD por sus siglas en inglés, es un ejemplo en el que la comunidad asociada al *biofilm* que recubre a los corales pétreos y con el que se desarrolla una simbiosis muy estrecha, puede sufrir modificaciones que son promovidas por presiones ambientales y ponen en riesgo la integridad del holobionte (Boyett, Bourne, & Willis, 2007; Hadaidi *et al.*, 2018).

A pesar de que las bacterias inmersas en la biopelícula puede tener considerables ventajas al pertenecer a esta estructura en términos de autoprotección (que resulta útil para el desarrollo de sistemas de biorremediación *in situ*) (Delauney *et al.*, 2010; Singh, Paul, & Jain, 2006; Vu *et al.*, 2009), las biopelículas tienen grandes impactos negativos en la economía mundial debido a que plantean graves problemas a nivel industrial como la corrosión en las plantas de hidrocarburos (AlAbbas *et al.*, 2013); la promoción del *biofouling* en los navíos del transporte marítimo (Schultz *et al.*, 2011), y la dificultad en el tratamiento de enfermedades en la salud pública y la medicina, entre otros (Melander & Melander, 2015; Wolcott *et al.*, 2012). Lo anterior es consecuencia de que, en los *biofilms*, las bacterias adquieren mayor resistencia

a antibióticos y biocidas químicos, gracias al altísimo intercambio genético y el aumento de la producción de metabolitos secundarios (Sayem *et al.*, 2011).

Para el control de las biopelículas en sistemas industriales se ha acudido a la mitigación del crecimiento microbiano mediante la aplicación de sustancias químicas con acción biocida (Urzi *et al.*, 2016). Sin embargo, es probable que las biopelículas evadan estas sustancias antimicrobianas por múltiples mecanismos: 1. La imposibilidad del agente para penetrar a profundidad toda la biopelícula; 2. Que al menos una de las células del *biofilm* se encuentra en estado de latencia debido a la limitación de nutrientes; 3. Que al menos una de las células exprese un fenotipo distinto como respuesta biológica a la formación de la biopelícula (Sayem *et al.*, 2011). Este problema ha llevado al descubrimiento y desarrollo de compuestos amigables con el medio ambiente que logren combatir y erradicar las biopelículas, y en la última década, se han reportado numerosos compuestos producidos por organismos marinos o su microbiota asociada, que tienen efecto anti-*biofilm* (Brackman & Coenye, 2015). Muchas son las formas de abordar la inhibición de la formación de *biofilm* bacteriano, principalmente, se había implementado el uso de antibióticos para la eliminación de las poblaciones bacterianas asociadas, y este proceso fracasó poco después dado que esa estructura bacteriana permite una alta tasa de transmisión horizontal de genes, promoviendo la resistencia a los antibióticos tanto de la comunidad inmensa en los EPS, como de las células persistentes adheridas a la superficie (Dobretsov *et al.*, 2009; Wolcott *et al.*, 2012). Tras este evento, y reconociendo la importancia de los eventos de comunicación bacteriana como paso principal para la sincronización y complejidad de las comunidades, los investigadores abordaron el proceso de eliminación del *biofilm* imposibilitando el QS, ya sea por la degradación de la molécula señal, la competencia por el receptor con sustancias análogas y la degradación tanto de la sintasa como del receptor (Brackman & Coenye, 2015). Estos eventos de inhibición de la comunicación bacteriana serán descritos más adelante, sin embargo, es necesario tenerlos en cuenta pues sin la posibilidad de comunicación, el *biofilm* no puede madurar y por tanto, los procesos de degradación del sustrato artificial o

tejido animal, no se producen (Romaní, Guasch, & Balaguer, 2016; Sayem *et al.*, 2011).

Otra forma de inhibir la formación de *biofilm* es mediante la desestabilización de la matriz de exopolisacáridos mediante la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos (como pectinas o celulasas), o la interacción con nuevos compuestos que no permitan la estratificación y la especialización de la estructura en canales y poros (Brackman & Coenye, 2015; Sayem *et al.*, 2011; Thenmozhi *et al.*, 2009).

La mayoría de los invertebrados marinos han desarrollado formas únicas para combatir a los patógenos invasores, depredadores u otros competidores, a través de la producción de compuestos específicos que inhiben la comunicación bacteriana o QS, que buscan inhibir el asentamiento y propagación de bacterias patógenas que alteren la integridad de su tejido superficial. Varios compuestos naturales que son sintetizados por esponjas marinas o sus simbioses, se están convirtiendo en fuentes potenciales de nuevos metabolitos y han sido seleccionados para validar la actividad anti-*biofilm* (Sayem *et al.*, 2011; Webster & Taylor, 2012).

En esponjas, por ejemplo, se han reportado numerosas moléculas inhibitoras del *biofilm* bacteriano que no son bactericidas, producidas directamente por el individuo, que han sido categorizadas en dos grandes grupos: Terpenoides y derivados y Pirrol-imidazoles (Dahms & Dobretsov, 2017; Stowe *et al.*, 2011). La propiedad inhibitora pero no bactericida resulta importante dado que, de esta forma, la esponja mantiene su comunidad bacteriana asociada de la que depende para numerosos procesos de nutrición y defensa, mientras inhibe el asentamiento y desarrollo de bacterias patógenas o promotoras de *biofouling*. Estos compuestos, aunque tienen una actividad ecológica puntual, han sido descritos con propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antibiótica sobre especies bacterianas patógenas humanas y antifouling en superficies de navíos. Moléculas como las Manolidas, Secomanolidas y Neomanolidas, que son producidas por esponjas del género *Luffariela sp.* han demostrado actividad anti-*biofilm* y actividad antibiótica sobre Gram positivas, asociadas con patologías de esponjas (Cebrian *et al.*, 2011; Stowe *et al.*, 2011).

Bacterias cultivables aisladas de corales como *Acropora digitifera*, determinadas como *B. pumilus*, *B. firmus*, *Vibrio natriegens* y *Halomonas salaria*, producen sustancias que inhiben la maduración del *biofilm* de la especie *Streptococcus pyogenes*, involucrada en infecciones intrahospitalarias (Thenmozhi, *et al.*, 2009).

Dentro del consorcio bacteriano asociado a esponjas marinas, se ha reportado actividad anti-*biofilm* por parte de exopolisacáridos producidos por aislamientos identificados como *Bacillus licheniformis*, que actúan de forma negativa sobre la formación de biopelícula de *B. pumilus*, *B. cereus* y *B. subtilis* bloqueando el asentamiento, desarrollo y estratificación de las biopelículas de esas especies bacterianas (Sayem *et al.*, 2011). En otros estudios, se reporta también actividad anti-*biofilm* por parte de exopolisacáridos producidos por bacterias del género *Vibrio*, aisladas de macroalgas del género *Laminaria* (Jiang *et al.*, 2011).

Las biopelículas son una estructura fundamental para la generación y maduración de las epibiosis marinas. Una vez el *biofilm* se encuentra maduro, la producción y secreción de compuestos químicos específicos, atraen organismos tales como algas microscópicas, macroalgas y crustáceos entre otros eucariotas, para que esos se asienten y desarrollen en su superficie, convirtiéndose no sólo en un sustrato de adhesión sino promoviendo el intercambio de nutrientes y la recirculación de los mismos entre los microorganismos presentes, los eucariotas adheridos y el hospedero (Delauney *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013). La descripción de este fenómeno y la participación del *biofilm* será descrita a continuación.

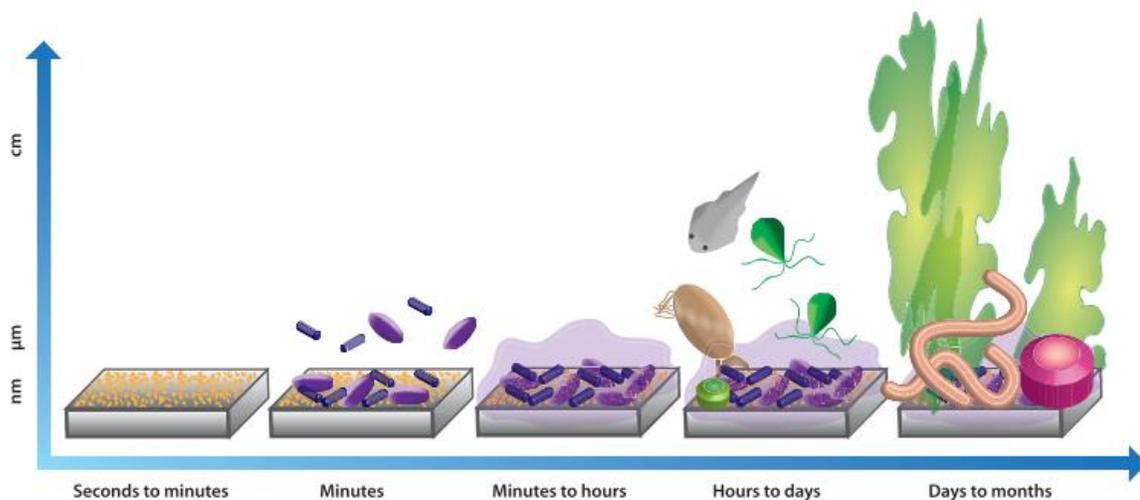
#### **4.6 BIOFOULING O EPIBIOSIS**

El *biofouling*, definido como la fijación y acumulación secuencial de microorganismos, algas y animales sobre las superficies sumergidas (incluyendo hospederos como esponjas y corales) (Quévrain & Domart-coulon, 2014), es un proceso muy común y natural que resulta de la competencia por espacio y nutrientes por parte de poblaciones de procariotas y eucariotas sumergidas en cuerpos de agua naturales (Batista *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2013), particularmente en el mar, donde estas relaciones son mucho más comunes y especialmente más fuertes (Holliday *et al.*, 2006).

Cuando una estructura se sumerge en agua de mar, se cubre rápidamente por incrustaciones de organismos marinos (Müller, 2013). En ambientes marinos, más de 4000 especies han sido relacionadas con la capacidad de adherirse y formar *biofouling* (Fitridge *et al.*, 2012). Los organismos pueden ser clasificados de acuerdo con su tamaño: *Microfoulers* (Microorganismos) y *Macrofoulers* (Macrorganismos) (Dahms & Dobretsov, 2017; Taylor *et al.*, 2007b).

El fenómeno de *biofouling* se da en varias etapas, esquematizadas en la Figura 3. (pg.49) (Delauney *et al.*, 2010; Mieszkin *et al.*, 2013):

- El primer evento es la formación de una película primaria por la adsorción de macromoléculas orgánicas e inorgánicas suspendidas en el agua, esto sucede inmediatamente después de la inmersión.
- En el segundo paso se da el transporte y asentamiento de células microbianas a la superficie, proceso que pasado un tiempo resulta irreversible.
- En la tercera etapa, se forma una biopelícula microbiana que se desarrolla gracias a la producción de EPS que permite la adhesión de la comunidad bacteriana al sustrato y el desarrollo de una estructura vertical, en forma de setas. De la formación y maduración de esta biopelícula depende el asentamiento de otros organismos participantes, convirtiéndose en un paso fundamental para la formación de la epibiosis (Railkin, 2004).
- La cuarta fase corresponde al desarrollo de una comunidad más compleja en la superficie, con la colonización de microalgas, sedimentos y otros organismos multicelulares de tamaño reducido.
- En la última etapa del *biofouling*, se genera el asentamiento de macroalgas e invertebrados marinos superiores como los percebes y mejillones.



**FIGURA 3. ESQUEMA DEL PROCESO DE FORMACIÓN DEL *BIOFOULING* MARINO**

(Tomado de Kirschner y Brennan, 2012)

La composición final de la epibiosis dependerá de factores ambientales y de disponibilidad de nutrientes, particularmente de la naturaleza del sustrato (natural o artificial), la posición geográfica, la temporada climática y los eventos de competencia entre procariontas y eucariontas para obtener los nutrientes fundamentales para el desarrollo del consorcio (Müller *et al.*, 2013). Además, si el sustrato es un organismo vivo, este en algunos casos, junto a su microbiota asociada, producirán sustancias de defensa, que bloqueará la maduración de la biopelícula inicial, deteniendo en fases tempranas el asentamiento de cualquier otro organismo (Dobretsov *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013).

A nivel ecológico, la formación de epibiosis posibilita la maduración de organismos importantes para el mantenimiento de los nichos arrecifales, haciendo que plántulas de macroalgas, larvas de moluscos y crustáceos, y fitoplancton, tengan un área dotada de nutrientes suficientes para desarrollarse, fortalecerse y una vez maduros, puedan colonizar superficies arrecifales abióticas

(Kirschner & Brennan, 2012; Mieszkin *et al.*, 2013). Aunque este proceso es trascendental para el establecimiento de ciertas poblaciones importantes en el ecosistema coralino, la existencia de epibiosis en la superficie de otros organismos de mayor tamaño como corales, macroalgas y esponjas, produce en el hospedero

una pérdida en la homeostasis, incluso, degradando el tejido, promoviendo un estado de enfermedad (Cebrian *et al.*, 2011; Stowe *et al.*, 2011).

Se sabe que existe una estrecha relación entre la comunidad bacteriana simbiote y el hospedero y que de este consorcio dependen gran cantidad de procesos de nutrición y defensa; particularmente en este último, donde la comunidad microbiana produce sustancias que inhiben el asentamiento y desarrollo de otros organismos sobre el hospedero (Reveillaud *et al.*, 2014; Toole, Kaplan, & Kolter, 2000). Así, la comunidad bacteriana simbiote promueve un equilibrio con el hospedero, promoviendo el bienestar para ambas partes y en caso de que la composición de la comunidad cambie, la nueva composición puede promover el desarrollo de patógenos e incluso puede producir sustancias que atraigan nuevos participantes del consorcio que ingresen al sistema como parásitos (Gil-Agudelo *et al.*, 2009; Kvennefors *et al.*, 2010). Entonces, la generación de *biofouling* puede ser un indicador de la alteración de las comunidades bacterianas presentes en la superficie del hospedero, que, en últimas, posibilita el asentamiento y desarrollo de los organismos eucariotas antes expuestos (Luter *et al.*, 2017).

El fenómeno de *biofouling* se encuentra muy regulado por organismos muy dependientes de su consorcio bacteriano como esponjas y corales, que producen sustancias inhibitoras y antagónicas que detienen el proceso (Bixler & Bhushan, 2012). Pero, en caso de que la epibiosis se desarrolle sobre esponjas y cubra una gran parte del cuerpo del individuo y si ese fenómeno se repite en toda la población vecina, se perderá significativamente la capacidad de los poríferos de ofrecer los servicios ecosistémicos antes mencionados, además de diezmar la población de esponjas sanas (Cebrian *et al.*, 2011; Luter *et al.*, 2017). Si bien, la superficie del holobionte se convierte en un sustrato que promueve el desarrollo y diversificación de numerosas especies, también se convierte en un impacto al reducir la efectividad en los procesos de filtración de las masas de agua tanto como la modulación de los Bloom de fitoplancton, contribuyendo a la desestabilización del sistema béntico (Bell, 2008; Dudley-evans *et al.*, 2012). Es por tanto que el conocimiento de las comunidades bacterianas asociadas al *biofilm*, que es sustrato de la epibiosis de las esponjas marinas, así como las comunidades presentes en esponjas que inhiben

este asentamiento, permitirán estructurar el conocimiento acerca de la ecología microbiana marina involucrada, así como la modulación de los procesos que se concatenan dentro de los ecosistemas marinos tales como los arrecifes coralinos (Hentschel *et al.*, 2003; Webster & Taylor, 2012).

La comunicación interreinos explica en gran medida, cómo son llamadas las larvas y plántulas de los eucariotas epibiontes a la superficie del hospedero. Durante el desarrollo evolutivo, tras la coexistencia de organismos eucariotas y procariotas, se han desarrollado herramientas de comunicación en procariotas que influyen sobre eventos de maduración y proliferación de eucariotas y viceversa (Cao *et al.*, 2011). Por ejemplo, algunas bacterias con actividad QS mediada por moléculas tipo AHLs, responden a sustancias secretadas por las plantas a las que se asocian, que actúan generalmente como hormonas promoviendo el crecimiento y desarrollo del tejido vegetal pero que, al ser secretadas al exterior y secuestradas en la matriz de EPS de la rizósfera, modulan el comportamiento de las bacterias asociadas. Además, se ha reportado la producción de moléculas tipo AHL de cadena larga por parte de las plantas, que promueven así, comportamientos benéficos para el holobionte en general (Venturi & Keel, 2016).

En otro ejemplo de comunicación interreinos, las células de respuesta inmune de mamíferos (principalmente macrófagos) activan la respuesta inflamatoria ante el reconocimiento de 3-oxo-C12 AHL producidas por bacterias, funcionando como moléculas de reconocimiento de infección (Lowery, Dickerson, & Janda, 2008).

Tal como se mencionó en el apartado de “*Quorum Sensing*”, otro ejemplo de comunicación interreinos es la influencia que tienen las moléculas tipo AHL sobre el asentamiento y metamorfosis de las larvas de *Hydractinia symbiolongicarpus*, donde esas señales propias de la comunicación intra-reino, indican a las larvas de ese cnidario dónde asentarse, y dependiendo la concentración de la molécula, promueven el paso de una fase inicial de metamorfosis a la siguiente, impulsando la generación de tentáculos en el cnidario (Franco, Arevalo-Ferro, & Cadavid, 2015). Aunque los eventos de comunicación inter-reinos han sido estudiados más profundamente con relación a cómo las moléculas de señalización usadas en QS, principalmente AHLs, modifican comportamientos tanto de procariotas como de

eucariotas en contextos ecológicos específicos, nuevas investigaciones han demostrado que este fenómeno puede implicar procesos de relación más complejos, como la transferencia horizontal de genes, entre reinos. Un ejemplo de esto es el reportado por Sun y colaboradores, que en el 2017, publican su investigación donde bacterias asociadas al nicho ecológico del hongo Quitridiomycete *Batrachochytrium dendrobatidis*, tras una aceptación de este hongo a su *biofilm*, le transmiten información que les confiere la producción de las enzimas metalo-beta-lactamasas y arsenato-reductasa, haciendo que este Quitridio sea un patógeno mucho más exitoso en la colonización y degradación de la dermis de algunos anfibios (Sun *et al.*, 2016).

La formación de estas epibiosis marinas no sólo se encuentran asociadas a animales bénticos como los corales, macroalgas, moluscos y esponjas; estos crecimientos también suceden sobre la superficie de los navíos, puertos y emisarios submarinos, resultando en la formación de grandes extensiones de *biofouling* que traducen en grandes costos para las industrias de transporte internacional y desarrollo portuario regional, pues, por ejemplo, la acumulación de crustáceos y algunos poliplacóforos aumentan la resistencia del navío mientras navega, aumentando la cantidad de combustible necesario para el trayecto (Fitridge *et al.*, 2012; Schultz *et al.*, 2011). Además, los consorcios microbianos asociados producen sustancias capaces de corroer las superficies de esas estructuras sumergidas, haciendo que se debiliten y pongan en riesgo procesos de transporte y desembarque de productos de alto costo (Fitridge *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2011).

Por las implicaciones económicas antes expuestas, varias industrias han patrocinado la búsqueda de sustancias que inhiban la producción de *biofouling*, que generalmente se realiza con la eliminación de las etapas tempranas en el desarrollo del *biofilm*, ya sea debilitando la estructura formada por la comunidad embebida en EPS, o por el bloqueo de la comunicación celular que es indispensable para la sincronización de la comunidad bacteriana en búsqueda de la maduración de la biopelícula que sostendrá el resto de la epibiosis (Egan *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2013; Xin *et al.*, 2017). Estas sustancias inhibitoras de la epibiosis han sido

encontradas en organismos con una superficie desprovista de cualquier asociación y crecimiento de eucariotes, principalmente en esponjas y macroalgas, que están produciendo directamente esos inhibidores o son sintetizados por su microbiota asociada (Chang *et al.*, 2017; Sayem *et al.*, 2011).

#### **4.7 INHIBICIÓN DE LA COMUNICACIÓN BACTERIANA TIPO QS**

El uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades ha provocado una emergencia de salud pública a nivel mundial gracias al aumento de cepas multirresistentes. Estudios en el tema y reportes del instituto nacional de salud en Estados Unidos, han demostrado que más del 80% de las infecciones bacterianas suceden tras la formación de biopelículas en los tejidos susceptibles (Dufour *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que la maduración del *biofilm* depende en gran parte de la comunicación bacteriana, y que esta, además, es usada para sincronizar procesos como la síntesis de factores de virulencia, se proponen nuevos mecanismos de atención a esas infecciones bacterianas mediante la inhibición del QS, de tal forma que la comunidad asociada a la enfermedad no pueda manifestar fenotipos tóxicos para el organismo parasitado y tampoco pueda fortalecer el *biofilm*, que en últimas es el que permite la persistencia de la enfermedad a pesar del uso de múltiples fármacos, por razones anteriormente descritas (Toyofuku *et al.*, 2016).

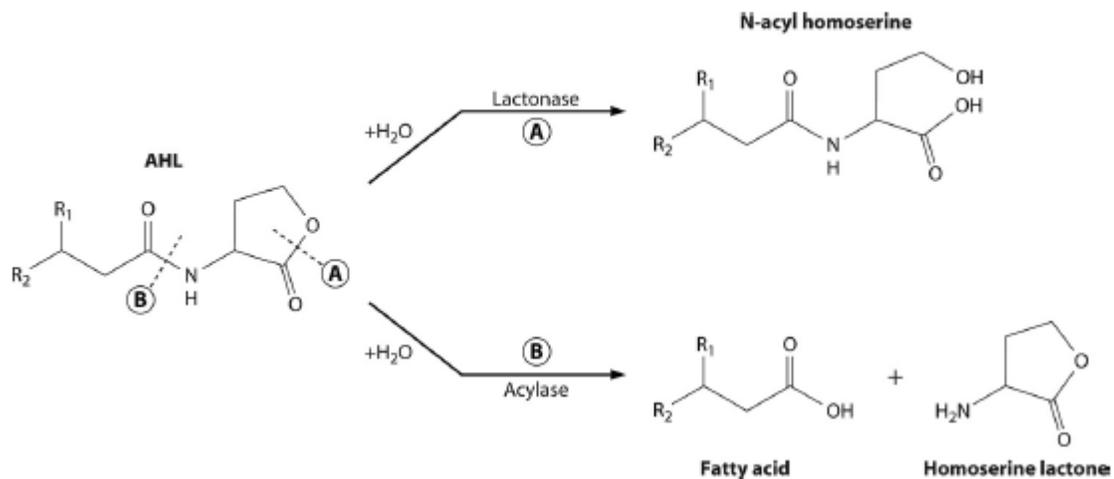
El proceso de inhibición del QS, conocido como *Quorum Quenching* (QQ), permite el bloqueo de la comunicación bacteriana mediante los siguientes mecanismos propuestos: el primero, mediante la reducción de la actividad del receptor de la molécula señal o de la sintasa que la produce; segundo, mediante la degradación de la molécula señal y tercero, mediante la incorporación de moléculas análogas a las moléculas señal, que se unen al receptor, bloqueando su función. Generalmente, las formas de inhibición más estudiadas son las asociadas a la degradación de la señal (Dobretsov *et al.*, 2011).

Se han caracterizado tres tipos de enzimas degradadoras de las señal AHL: AHL-Lactonasas, AHL-Acilasas y AHL-Oxidoreductasas. Las lactonasas son metaloproteínas que hidrolizan el enlace éster del anillo lactona (LaSarre & Federle,

2013). Este proceso sucede a pH alcalino, mientras que, a pH ácido, el anillo se restablece. Esa interacción Lactonasa-Acil Homoserín Lactona es de baja especificidad y la presenta un gran número de bacterias, a las que se les atribuye actividad anti-*biofilm* (Romero, *et al.*, 2011).

Las acilasas hidrolizan el enlace acil-amida entre la cola acilada y el anillo lactona, y este es un proceso irreversible a cualquier pH, en contraste con la actividad lactonasa (Nithya, Aravindraja, & Pandian, 2010; Romero *et al.*, 2011). Otra diferencia atribuible a las acilasas con respecto a las lactonasas, es que las primeras tienen una alta especificidad al sustrato, reconociendo la cadena acilada y la sustitución de la tercera posición de esa cadena. Los mecanismos de acción de las lactonasas y acilasas se encuentran ilustrado en la Figura 4 (pg 54).

Las oxidoreductasas no degradan las AHL, pero modifica la molécula a una forma inactiva, oxidando o reduciendo la cadena lateral carbonada (Brackman & Coenye, 2015; LaSarre & Federle, 2013).



**FIGURA 4. ACTIVIDAD LACTONASA Y ACILASA SOBRE LAS MOLÉCULAS SEÑAL AHL**

(Tomado de LaSarre & Federle, 2013)

*Erwinia carotovora* es una bacteria patógena de hojas de Tabaco y causa pérdidas importantes a nivel económico cuando progresa en cultivos extensos de esta planta (Dong, *et al.*, 2000). En presencia de la lactonasa AiiA, aislada de bacterias de la especie *Bacillus thuringiensis*, se detiene la expresión de los factores de virulencia

asociados a la necrosis del tejido vegetal, entonces, aunque la bacteria esté presente en las hojas de tabaco, no logra sincronizar la producción de toxinas y por tanto pierde su potencial patogénico (Conz *et al.*, 2001; LaSarre & Federle, 2013). En el género *Ralstonia* se ha descrito actividad AHL-acilasa, que mediante la enzima AiiD, sobre la cepa PAO1, demostró degradar moléculas 3-oxo-C12 AHL y C4AHL, que tuvo por consecuencia la atenuación del factor de virulencia de *swarming* (Lin *et al.*, 2003). Existen pocos reportes de oxido-reductasas que se involucren en la degradación de moléculas señal tipo AHL, pero el ejemplo más reconocido es el reporte de la bacteria *Bacillus megaterium*, que en ensayos frente a *Rhodococcus erythropolis*, detuvo la comunicación celular de esta última especie, reduciendo moléculas tipo 3-oxo-C14 AHL que no fueron reconocidos por el receptor de AHL intracelular (Chhabra, Ca & Williams, 2005).

La inhibición de la producción de AHL se produce principalmente por la alteración en la síntesis de SAM, intermediario necesario para la síntesis de la molécula AHL junto con el acil-ACP o acil-CoA; o por la inactivación directa de la AHL-sintasa. Por ejemplo, el triclosán, un antibacterial ampliamente usado en la industria cosmética, es inhibidor de la síntesis de C4 AHL en *P. aeruginosa*, pues bloquea la generación de butiril-ACP, un intermediario para la producción de acil-ACP, sustrato necesario para la producción de AHL (Kalia, 2013; LaSarre & Federle, 2013; Schweizer, 1999). Cuando se produce una inhibición del QS a nivel de receptor, es generalmente por la modificación de moléculas señal que, aunque llegan a unirse a este factor de transcripción, no permite el cambio conformacional necesario para que se exponga el dominio de unión al ADN, necesario para iniciar la transcripción de los genes blanco. Un ejemplo es el caso donde *Pectobacterium carotovora*, una bacteria patógena de la papa es sometida en ensayos *in vitro* a una solución con moléculas similares a las AHL, que poseen un anillo aromático halogenado asociado a su cadena carbonada lateral. En contacto con esas moléculas similares en estructura, *P. carotovora* no puede sincronizar la producción de factores de virulencia asociados a la degradación del tejido del tubérculo, pues los receptores asociados a esas vías, al recibir la señal falsa, no pueden realizar el cambio estructural y

exponer su dominio de unión al material genético (Palmer, Streng, & Blackwell, 2011).

Los mecanismos de inhibición de la comunicación bacteriana por QS son usados por organismos marinos para impedir el asentamiento de bacterias patógenas, además de bloquear la maduración de biopelículas, indispensables para la formación de *biofouling*. De esta manera, estos organismos y su comunidad simbiote se mantienen desprovistos de cualquier epibiosis o patógeno en su superficie (Dobretsov *et al.*, 2009).

Es el caso de la macroalga *Delisea pulchra*, productora de furanonas halogenadas que actúan como antagónicas, uniéndose a receptores de moléculas tipo AHL. Mediante este proceso, *D. pulchra* inhibe la comunicación bacteriana y con esto, no permite la maduración de la biopelícula bacteriana en su superficie, promoviendo que a lo largo de su vida, tanto su tejido como el simbiote asociado se mantenga en homeostasis, libre de nuevos integrantes que puedan promover enfermedad o reduzcan su actividad fotosintética (Harder *et al.*, 2012).

En el alga *Ulva lactuca* existe una selección muy estricta en las poblaciones bacterianas que pueden asentarse en su superficie. La comunidad bacteriana simbiote de esta macroalga es dominada por el género *Pseudoalteromonas* que, en el contexto del holobionte, produce pigmentos que bloquean el QS de bacterias promotoras de *biofouling*, de una forma similar a las furanonas de *D. pulchra* (Egan *et al.*, 2001; Rao, Webb, & Kjelleberg, 2005; Trivedi *et al.*, 2011).

Estos mecanismos de inhibición del Quorum para la promoción de la homeostasis en los holobiontes marinos han sido descritos también para esponjas marinas, donde tanto el individuo como bacterias del consorcio bacteriano producen compuestos que bloquean la comunicación de bacterias que desean asociarse a la comunidad simbiote. Mediante estos mecanismos de inhibición, la comunidad y el organismo hospedero seleccionan y modulan la participación de ciertas especies, que, de poder dominar en la comunidad, generarían eventos de enfermedad, o promoverían el asentamiento de organismos de orden superior, iniciando procesos de epibiosis.

En un estudio realizado por Batista y colaboradores se reportó que macerados de esponjas de las especies *Dysidea etheria* e *Hymeniacidon heliophila*, junto a su microbiota, poseen alta actividad inhibitoria de QS frente al biosensor CVO27 (Análogo a ATCC31532) (Batista *et al.*, 2018). Investigaciones realizadas sobre la comunidad bacteriana asociada a la especie porífera *Plakortis cf. lita* permitieron aislar y caracterizar al compuesto nombrado Plakofuranolactona, con actividad inhibitoria del QS en circuitos LasI/LasR de *P. aeruginosa* (Costantino *et al.*, 2017). De la comunidad bacteriana simbiote de poríferos se tienen numerosos reportes de moléculas inhibitoras de la comunicación bacteriana. Los filos más representativos con esta actividad inhibitoria son las Proteobacterias (con las clases gamma y Alpha proteobacterias como las más reportadas); Firmicutes (con el género *Bacillus* con el de mayor número de reportes) y actinomicetes (con *Streptomyces* como género representativo)(Borges & Simoes, 2019; Dobretsov *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2017; Naik, Wahidullah, & Meena, 2012). Particularmente del género *Paracoccus spp.* se tienen numerosos reportes de actividad inhibitoria de QS mediante la producción de una enzima denominada Penicilín-amidasa, que tiene actividad degradadora de moléculas señal tipo AHL (Gutierrez *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2017; Naik *et al.*, 2012). Además de esta actividad inhibitoria, muchas especies de este género reportan producción de moléculas tipo AHL, lo que es muestra de que estos dos fenómenos no son excluyentes y pueden ser desarrollados por un mismo organismo que mientras apaga eventos de relación bacteriana, activa otros específicos importantes para su contexto social (Gutierrez *et al.*, 2019).

#### **4.8 ANTAGONISMO BACTERIANO**

Existe un amplio reporte de metabolitos secundarios producidos por bacterias encontradas en ecosistemas marinos, que cumplen funciones de antibiosis, inhibición del QS, modulación del asentamiento de larvas de invertebrados y como defensa para la predación del hospedero. Estos eventos tanto como el antagonismo

bacteriano son relevantes en el contexto ecológico, dado que, mediante la modulación del asentamiento y proliferación de eucariotas y procariotas en un nicho específico, se genera la complejidad tanto del consorcio como del holobionte, que sincronizan sus eventos metabólicos para mantener la homeostasis del hospedero y de la comunidad bacteriana. A pesar de que estos eventos son relevantes dentro de la ecología microbiana y que los descubrimientos en estos metabolitos son numerosos, no existen a la fecha metodologías que permitan determinar cómo estos eventos funcionan dentro del consorcio, pues son reportes individuales de organismos aislados en condiciones *in vitro* (Wietz *et al.*, 2013).

Al hablar de antagonismo se tiene en cuenta una serie de elementos y mecanismos usados por parte de las bacterias para competir por el sustrato y por los recursos circundantes. De esta manera, las especies participantes del consorcio mantienen distantes a otras bacterias oportunistas o patógenas que podrían desestabilizar la estructura original de la comunidad y con esto, podría poner en riesgo la integridad del micronicho (Thomas *et al.*, 2016; Zinger *et al.*, 2011). La forma en como el antagonismo actúa sobre otras bacterias es tan variada como las moléculas producidas; se sabe que el antagonismo puede manifestarse con la toxicidad directa, donde el metabolito secundario provoca la muerte de otros; también se reporta la remoción de nutrientes en el medio, proceso que es realizado por factores de virulencia como los sideróforos, que secuestran iones esenciales para la síntesis de proteínas vitales en otros organismos, y finalmente, existen reportes de antagonismo mediante la producción de moléculas que alteran el ambiente asociado al consorcio haciendo que sea inhabitable por poblaciones ya incorporadas o por bacterias planctónicas que buscan asociarse (González-Rivero *et al.*, 2011; Wietz *et al.*, 2013).

El antagonismo se configura entonces como un mecanismo muy importante que explica la estructuración de las comunidades y permite reconocer la complejidad en las interacciones ecológicas internas que deja en evidencia el arsenal de compuestos como ventajas evolutivas para la supervivencia tanto de las poblaciones bacterianas, como del consorcio y del hospedero (Raina, *et al.*, 2009; Webster & Thomas, 2016). Para escalar estas observaciones que son descritas de

forma individual para cada aislamiento a un contexto de consorcio microbiano es necesario tener en cuenta dos factores principales, entre ellos la estructura química de los compuestos y cómo se mantienen en actividad mientras están embebidos en EPS con ciertas propiedades fisicoquímicas como el pH, la salinidad y la disponibilidad de oxígeno, que también son moduladas tanto por el ambiente como por los organismos participantes del consorcio. Otro factor para tener en cuenta es la concentración en la que ese compuesto activo existe en el nicho ecológico y el punto en el cual tiene relevancia ecológica, pues, aunque el microorganismo manifieste su capacidad de producir esas sustancias antagónicas *in vivo*, las concentraciones que alcanza el compuesto en el nicho no son suficientes para generar un cambio significativo en la comunidad. Lo anterior puede estar liderado por otras moléculas involucradas que realicen alelopatía sobre esa primera bacteria, modulando la expresión de la toxina particular para que no se convierta en un elemento degradador de la comunidad (Wietz *et al.*, 2013).

Los reportes de la composición de las comunidades bacterianas asociados a corales, por ejemplo, son numerosos y mediante técnicas independientes de cultivo se ha logrado determinar la abundancia, riqueza y diversidad de los consorcios y cómo estos cambian frente a una presión ambiental o en presencia de organismos colonizadores que pueden causar alguna enfermedad (Klaus, Janse, & Fouke, 2011; Muller & van Woesik, 2011; Roder *et al.*, 2014). Tras la evaluación de la composición de la comunidad, los investigadores pueden realizar una segunda aproximación, teniendo en cuenta el perfil metabólico y los compuestos obtenidos en la muestra, asignando un potencial de producción de ciertos compuestos antagónicos, gracias a las metabases de datos que relacionan esos hallazgos con reportes pasados. Estas aproximaciones comparadas con la forma en como las comunidades bacterianas cambian frente a cierta presión permiten inferir que son ellas mismas las que ejercen presión no solamente sobre las bacterias nuevas que desean asentarse sino sobre otras poblaciones ya existentes en el consorcio que, aunque tienen potencial patógeno, en estado de control, participan de forma benéfica o neutral en el consorcio (Kvennefors *et al.*, 2012; Mangano *et al.*, 2009; Roder *et al.*, 2014).

Tras una interrupción a la homeostasis de la comunidad bacteriana, microorganismos con potencial capacidad de desequilibrar la comunidad o generar daño, pueden emerger y dominar sobre el total de bacterias asociadas. Es el caso de la enfermedad de la banda negra o BBD en hexacorales, donde un cambio en la composición de la comunidad promueve la pérdida de tejido (como se explicó anteriormente), dada la desestabilización del consorcio, que da lugar a la producción de sustancias antagónicas tanto para su comunidad como para el tejido del hospedero. Las cianobacterias, por ejemplo, en estado de salud del coral, provee de metabolitos primarios que están involucrados en procesos de fijación de carbono y nitrógeno, pero tras el cambio en la composición del holobionte, aumentan en abundancia, produciendo sustancias tóxicas que matan directamente a las células procariontas y eucariontas circundantes, generando además, un ambiente anóxico que imposibilita el restablecimiento de la comunidad sana y llama organismos con perfiles patógenos, promoviendo la muerte del hospedero (Miller *et al.*, 2011; Sato, Willis, & Bourne, 2013; Zimmer *et al.*, 2014).

En esponjas se ha estudiado la composición de las comunidades bacterianas asociadas al tejido del mesohilo de estos invertebrados, destacando la importancia de su relación en eventos de metabolismo del Carbono y Nitrógeno, protección contra la radiación, aumentando la resistencia del tejido por la producción de exopolisacáridos, promoviendo la producción de pigmentos accesorios, el reciclaje de desechos del animal y de gran interés, la producción de sustancias para la defensa del holobionte (Fiore *et al.*, 2015; Webster & Thomas, 2016).

Se han estudiado toxinas proteicas producidas por bacterias cultivables presentes en los tejidos de esponjas marinas, determinadas como bacteriocinas. Estas moléculas inhiben el crecimiento de algunas bacterias circundantes y son producidas generalmente por bacterias que no se consideran patógenas pero que, en ausencia de estas, las comunidades bacterianas se desequilibran, fomentando la aparición y desarrollo de bacterias no benéficas, como antes se comentó. (Bibiana & Nithyanand, 2014; Hentschel *et al.*, 2001), dentro de los géneros que predominan en todos los estudios de comunidad asociada a porífera, con capacidad antagónica sobre bacterias de su consorcio y sobre bacterias de interés clínico se encuentran

las *Pseudoalteromonas spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Micrococcus spp.* y *Bacillus spp* (Bibiana & Nithyanand, 2014; Hentschel *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2016; Mangano *et al.*, 2009).

Estudios realizados por Mangano y colaboradores lograron establecer la interacción antagonica entre los microorganismos de dos esponjas y demostraron que existía una interacción compleja de antagonismo entre las bacterias cultivables de cada esponja que modulaban significativamente la abundancia de géneros asociados a estados de enfermedad, como lo es *Bacillus spp.*, recalcando la actividad antagonica de cepas determinadas con la especie *Bacillus licheniformis* (Mangano *et al.*, 2018; Mangano *et al.*, 2009; Sayem *et al.*, 2011). La comparación anterior es un ejemplo de cómo, especies bacterianas de un mismo género, pueden proveer a la comunidad de servicios como la producción de toxinas que inhiben la aproximación y asentamiento de otras bacterias que pueden afectar la homeostasis de la comunidad, pero en un contexto de desbalance, son estas mismas las que producen sustancias tóxicas que provocan daño al holobionte.

Otro ejemplo de bacterias productoras de sustancias antagonicas es el reporte realizado para las bacterias simbioses de esponjas de la especie *Xestospongia testudinaria*, que poseen actividad antagonica. Cita y colaboradores determinaron aislamientos bacterianos pertenecientes a los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria con actividad antagonica, produciendo metabolitos de naturaleza alcaloide y esteroide, principalmente ( Suhermanto, Radjasa, & Sudharmono, 2017). Matobole y colaboradores describieron la comunidad bacteriana asociada a esponjas de las especies *Isodictya compressa* e *Higginsia bidentifera* y tras ensayos frente a bacterias de interés clínico, encontraron que especies de los filo Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (Principalmente de las clases Alfa y Gamma Proteobacteria) poseen actividad antagonica. Especies como *Bacillus zhangzhouensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Arthrobacter citreus* y *Pseudomonas fulva*, sobresalen de la comunidad cultivable por su intensa actividad antagonica sobre especies bacterianas como *E. coli*, *B. cereus* y *S. epidermidis* (Bay *et al.*, 2016).

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Comparar la composición, actividad antagónica y la inhibición de la comunicación celular de las bacterias cultivables presentes en esponjas marinas con *biofouling* y sin *biofouling*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar por morfología macro y microscópica, las bacterias cultivables aisladas de la superficie de esponjas marinas con *biofouling* y sin *biofouling*.
- Identificar utilizando la secuenciación del gen ribosomal 16S rDNA, las bacterias cultivables aisladas de la superficie de esponjas marinas con *biofouling* y sin *biofouling*.
- Detectar el fenómeno de *Quorum Sensing* mediado por moléculas tipo aAHLs en las bacterias aisladas de la superficie de esponjas marinas con *biofouling* y sin *biofouling*.
- Evaluar la actividad inhibitoria del *Quorum Sensing* y el antagonismo de algunas las bacterias aisladas de la superficie de esponjas marinas con *biofouling* y sin *biofouling*.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 TOMA DE MUESTRAS

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron muestras de tejido de individuos de esponjas marinas con y sin *biofouling* en su superficie, que se encontraban ubicados a 20 metros de profundidad en Playa Blanca, Santa Marta, Colombia, con coordenadas 11° 10'0.00" N 74° 15'0.00" W.

Para lo anterior se cuenta con el permiso de colecta con número de radicación 4120-E1-97152 del 27 de agosto del 2008: "PERMISO MARCO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 4 DEL 10 DE FEBRERO DE 2010" expedido por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, resolución 0865, que permite al grupo de investigación CCB realizar la colecta de muestras de poríferos para desarrollar el proyecto global de investigación denominado "Perspectivas de bacterianas marinas en el Caribe colombiano como fuente de compuestos bioactivos" (Anexo 1).

Los tejidos de esponja extraídos correspondieron a dos individuos sin epibiosis en su superficie, identificados como *Xestospongia muta*; y dos individuos que poseían *biofouling* al momento del muestreo, identificados como *Aplysina insularis* y *Desmapsama anchorata*. De cada esponja se cortaron fragmentos de tres por tres centímetros (3x3 cm), los cuales fueron dispuestos en un recipiente estéril, con agua de mar, mientras fueron llevados a superficie.

En superficie, las muestras fueron transportadas al laboratorio de la Universidad Jorge Tadeo Lozano – sede Santa Marta donde se lavaron tres veces con agua, con el objetivo de retirar las bacterias plactónicas, así como las bacterias débilmente adheridas a la superficie de las esponjas. A continuación, las muestras fueron dispuestas en tubos falcon estériles de 50mL, agregando 10 mililitros de buffer PBS estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM y un pH de 7.4), para mantener la integridad de las células bacterianas.

Posteriormente, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Comunicación y Comunidades Bacterianas (CCB) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, bajo condiciones de refrigeración.

## 6.2 AISLAMIENTO DE COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVABLES

Para aislar las bacterias asociadas a las esponjas marinas con y sin *biofouling*, las muestras se maceraron con un mortero estéril a fin de separar las células bacterianas del tejido colectado. Del producto final del macerado se hicieron diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  con buffer PBS estéril, las cuales fueron inoculadas y cultivadas a 30°C por 24h en cajas de Petri con agar Luria Bertani (10 g de Triptona, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de Levadura y 16 g de Agar Agar por cada 1000 ml de agua destilada).

Usando la técnica de siembra por agotamiento se seleccionaron y purificaron las colonias que presentaron características macroscópicas distintas. Los aislamientos bacterianos purificados fueron conservados en caldo LB-glicerol a una temperatura de -80°C en el cepario del grupo Comunicación y Comunidades Bacterianas (CCB), del departamento de Biología - Universidad Nacional de Colombia, con un código de identificación que incluye las iniciales de la especie del individuo de esponja del que fue colectado (Tabla 1. pg.64).

**TABLA 1. CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS PURIFICADOS PARA CADA GRUPO DE MUESTREO DE ESPONJAS MARINAS CON Y SIN *BIOFOULING***

Individuo de esponja colectado del que proviene el aislamiento	Código de almacenamiento en cepario CCB
<i>Xestospongia muta</i> (1) sin <i>biofouling</i>	CCBXm1- (número consecutivo del aislamiento)
<i>Xestospongia muta</i> (2) sin <i>biofouling</i>	CCBXm2- (número consecutivo del aislamiento)
<i>Aplysina insularis</i> con <i>biofouling</i>	CCBAiBfBf- (número consecutivo del aislamiento)
<i>Desmapsama anchorata</i> con <i>biofouling</i>	CCBDaBfBf- (número consecutivo del aislamiento)

Xm1: individuo número 1 de *Xestospongia muta* sin *biofouling*; Xm2: individuo número 2 de *Xestospongia muta* sin *biofouling*; Ai: individuo de *Aplysina insularis* con *biofouling*; Da: individuo de *Desmapsama anchorata* con *biofouling*. CCB: Grupo Comunicación y Comunidades Bacterianas, por sus siglas. Bf: Esponja con *biofouling*.

## 6.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACRO Y MICROSCÓPICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Para la caracterización morfológica macro y microscópica de los aislamientos bacterianos obtenidos, se observaron colonias de cultivos de 24 horas de

crecimiento usando un estereoscopio marca Zeiss con un aumento de 16X, obteniendo características macroscópicas diferenciales enlistadas en la Figura 5. (pg.65)

FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 		Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa 		Acuminada 	

**FIGURA 5. CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA LA DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS DE AISLAMIENTOS EN ESTUDIO**

La caracterización microscópica de los aislamientos se realizó mediante la tinción de Gram y observación en microscopio LEICA DM500 con aumentos de 40X y 100X, con el fin de determinar si eran bacterias Gram negativas o Gram positivas, y su morfología celular (si eran bacilos, cocos, vibrios, etc.); además de corroborar la pureza de los aislamientos en estudio.

## 6.4 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA USANDO EL GEN RIBOSOMAL 16S ARN

### 6.4.1 Extracción del ADN de colonia bacteriana

Para la obtención del ADN bacteriano de los aislamientos en estudio se usaron cultivos de 24h a 34°C de los cuales se tomó una colonia de cada aislamiento y se lavó con agua estéril para remover exopolisacáridos y cualquier otro metabolito que pudiera interferir con la calidad del ADN. Luego del lavado y tras una centrifugación de 5000rpm por 5 minutos, las células se resuspendieron en agua destilada y desionizada y se produjo un choque térmico de 100°C por 10 minutos, seguido de

un enfriamiento en baño de hielo por 5 minutos para lograr lisis celular. Con una centrifugación a 15000rpm por 10 minutos se retiraron los residuos celulares que se separaron en el precipitado. Del sobrenadante obtenido se extrajo el ADN bacteriano usado para la amplificación del gen ribosomal 16S ARN.

Después de intentar una extracción de ADN por choque térmico sin resultados satisfactorios (baja cantidad y calidad del ADN extraído) para aislamientos bacterianos caracterizados microscópicamente como bacilos largos, bacilos largos y en cadena, y micrococcos, todos Gram positivos, se realizó una extracción con un paso adicional de digestión, agregando 50uL de lisozima (1mg/mL) a la colonia resuspendida en 50uL de agua destilada y desionizada. La solución en digestión se incubó por 1h 30 minutos a 40-45°C para bacilos largos en cadena (y otros bacilos Gram positivos sin extracción inicial satisfactoria) y por 45 minutos a 40°C para los aislamientos con morfología de micrococcos. Tras la digestión, el producto se llevó a choque térmico con las especificaciones antes mencionadas, seguido del resto del protocolo inicial (Tabla 2, pg.67).

Para algunos aislamientos caracterizados microscópicamente como bacilos largos y en cadena y otros bacilos Gram positivos de los que no se logró una extracción de ADN satisfactoria (baja calidad del ADN extraído), se realizó una inactivación de ADNsas usando proteinasa K 10mg/ml por 15 minutos a 37°C, justo después del baño de hielo, seguido un choque térmico corto de 100°C por 10 minutos y baño de hielo por 10 minutos, para inactivar las proteasas y otras enzimas degradadoras presentes en la muestra (Tabla 2, pg.67).

A todas las muestras de ADN extraído, tanto las obtenidos con el protocolo inicial como las obtenidas por protocolos particulares estandarizados, se les realizó seguimiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v con tinción de bromuro de etidio 2uL (2mg/ml) en 20mL de agarosa a 90V por 1 hora.

**TABLA 2. MODIFICACIONES DE EXTRACCIÓN DE DNA ESTANDARIZADOS PARA ALGUNOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN ESTUDIO**

DIGESTIÓN CON LISOZIMA			INACTIVACIÓN ADNAsas
Código del aislamiento	Temperatura de digestión con Lizozima	Tiempo de digestión	Código de aislamiento
CCBXm1-18	40°C	1h30min	CCBXm1-8
CCBXm1-19	42°C		
CCBXm2-3*	45°C		CCBXm1-18
CCBXm2-21*	45°C		
CCBXm1-6	40°C	45min	CCBXm1-19
CCBXm1-6D			CCBXm2-13
CCBXm1-33			
CCBXm2-14			CCBAi-1
CCBXm2-14D			CCBAi-19
CCBDa-2			CCBAi-24
CCBDa-22			

#### 6.4.2 Amplificación del gen ribosomal 16S ARN

Para realizar la amplificación del gen ribosomal 16S ARN, se usó una MM compuesta de 0.9uL de MgSO<sub>4</sub> (50mM), 0.9uL de dNTPs (10mM), 1.2uL de primer 27F y 1.2uL de primer 1429R (ambos a 50mM), 0.2uL de Taqpolimerasa *Platinum Pfx* (Invitrogen) (1U ->10nM de ADN en 30 minutos), 20uL de agua destilada desionizada grado HPLC y 3.8uL de sobrenadante de extracción de ADN. Los *primers* usados fueron los reportados como universales para la amplificación del 16S ARN, con las secuencias para 27F (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) y 1492R (5´TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3´) (Lane, 1991).

Las condiciones de amplificación constaban de un paso inicial de denaturación de la cadena de ADN a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por un minuto, 56°C por un minuto y 72°C por un minuto, más un ciclo final de extensión de 72°C por 10 minutos (Cárdenas, *et al.*, 2012).

El protocolo general fue satisfactorio para la mayoría de los aislamientos, sin embargo, se realizaron modificaciones para algunos con morfología de micrococos y dos aislamientos tipo bacilos, ambos Gram positivos. Las modificaciones particulares para cada aislamiento se hicieron sobre la temperatura de unión de los *primers* al molde de ADN (variando entre 55 y 58°C) y sobre la temperatura de

extensión de la hebra en amplificación (variando entre 72 y 76°C) Las estandarizaciones al protocolo de PCR para los aislamientos se encuentran en la Tabla 3 (pg. 68)

**TABLA 3. ESTANDARIZACIONES AL PROTOCOLO DE PCR PARA ALGUNOS AISLAMIENTOS EN ESTUDIO. LAS MODIFICACIONES AL PROTOCOLO INICIAL SE REALIZARON EN LAS TEMPERATURAS DE ALINEAMIENTO Y UNIÓN A *PRIMERS* Y EXTENSIÓN DEL AMPLIFICADO**

<b>MODIFICACIÓN A PROTOCOLO DE PCR</b>		
<b>Código de aislamiento</b>	<b>Alineamiento y unión a primers</b>	<b>Extensión</b>
CCBXm1-3	54°C	74°C
CCBXm1-4D		
CCBXm1-5		
CCBXm1-6		
CCBXm1-6D		
CCBXm1-33		
CCBXm2-6		
CCBXm2-15		
CCBXm2-18		
CCBAi-6		
CCBXm2-14	55°C	76°C
CCBXm2-14D		
CCBXm2-18D		
CCBAi-18		
CCBAi-22		
CCBDa-2		
CCBDa-22		
CCBDa-22D		
CCBXm1-22	58°C	76°C
CCBDa-12		

A los productos del protocolo de PCR para cada aislamiento bacteriano se les corroboró calidad de la amplificación y tamaño de banda esperado (1600pb aprox.) usando el marcador de peso molecular HyperLadder II, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con 2uL de bromuro de etidio (2mg/ml) en 20mL de agarosa a 90V por 1 hora (Anexo 2).

Los productos de la amplificación del gen ribosomal 16S ARN por PCR fueron secuenciados por MacroGen Inc.

### **6.4.3 Parámetros para la asignación de nivel taxonómico de los aislamientos bacterianos**

Para la asignación de nivel taxonómico de cada uno de los aislamientos se tuvo en cuenta los parámetros acordados por el comité ad hoc de sistemática y taxonomía bacteriológica (Rosselló-móra & Amann, 2015). Este comité enumera en sus últimos reportes de consideraciones para asignación de nivel taxonómico que, usando como marcador al 16S rADN, los porcentajes de similitud requeridos para asignar especie deben ser superiores al 97%, para asignar a género <96.9%, para familia <92%, para orden 89%, para clase <86% y para filo un porcentaje de similitud de 83% (Busse *et al.*, 2010; Konstantinidis, Rosselló-móra, & Amann, 2017). Las consideraciones del comité manifiestan que por debajo de un 98.7% se debe complementar la información de asignación de especie con otras técnicas moleculares como la hibridación DNA-DNA, la secuenciación del genoma, el %C-G, la identidad promedio de aminoácidos o AAI y la caracterización de las proteínas y ácidos grasos asociados a membrana plasmática, para asignar con seguridad un aislamiento a una especie bacteriana particular, dentro del género y correspondiente al epíteto específico (Konstantinidis *et al.*, 2017; Rosselló-móra & Amann, 2015).

Además, para los alineamientos múltiples se usó la secuencia de la cepa tipo de la especie *Haloarchaeobius iranensis*, especie que no pertenece a ninguno de los filos a los que pertenecen los aislamientos en estudio, permitiendo que al momento del alineamiento y generación de dendogramas, las relaciones de similitud entre cepas tipo y aislamientos tuvieran un agrupamiento evidente desde el nivel de filo hasta el nivel de especie.

### **6.4.4 Secuenciación y análisis bioinformático**

Con las secuencias obtenidas se construyeron los “*contig*” de cada aislamiento usando el programa CAP (Contig Assembly Program) en el software BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)), evaluando la calidad y resolución de cada secuencia observando el electroferograma obtenido, y se eliminaron las regiones distales sin resolución óptima, verificando el mínimo de extensión del

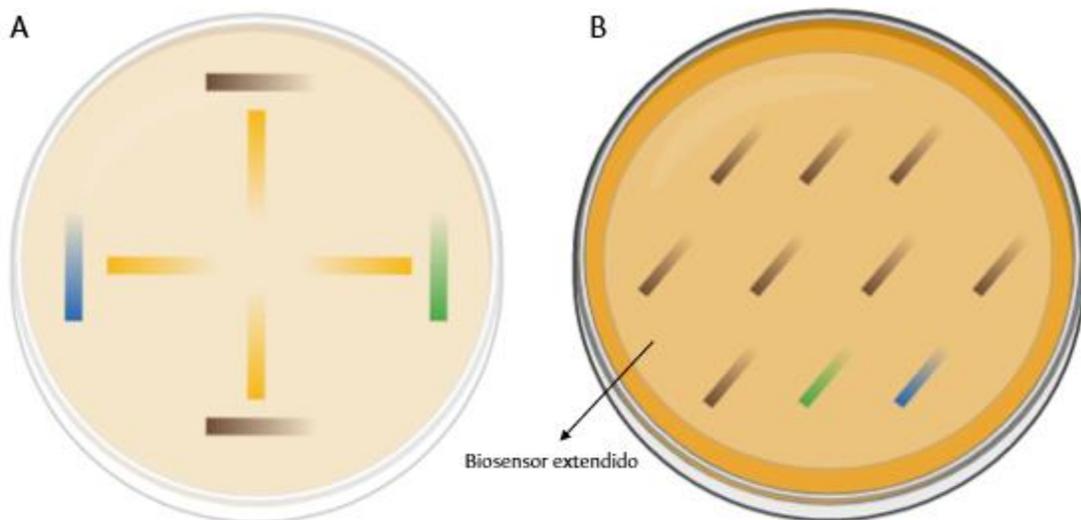
*contig* (1500pb a 1600pb). Usando la herramienta bioinformática BLAST se compararon los *contig* de cada aislamiento con la colección de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) siguiendo los parámetros del algoritmo de BLAST para encontrar las secuencias de la base de datos pertenecientes a los genes ribosomales 16S ARN similares a los *contig* obtenidos. Se eligieron las secuencias 16S ARN de especies bacterianas con porcentajes de identidad superiores al 97% y con el nombre de cada especie similar se obtuvieron las secuencias del gen 16S ARN reportadas en la base de datos curada de taxonomía bacteriana LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - [www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr))(Yarza *et al.*, 2010). Esta búsqueda siempre fue corroborada con la base de datos curada EZTAXON reportada en la base de datos ExBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)

Con las secuencias 16S rADN de las especies similares a cada aislamiento bacteriano se realizaron alineamientos múltiples usando el algoritmo ClustalW Multiple Alignment en el software BioEdit (Thompson, Gibson, & Higgins, 2002). Los valores de penalidad utilizados dependerán de la similaridad de las secuencias. Para especies del mismo género, la apertura y extensión de gaps se penalizó con valores de 50 puntos; para bacterias pertenecientes al mismo filo pero de diferente género, se penalizaron con valores de apertura y extensión de gaps de 30 puntos; finalmente, para especies de filo diferente, la penalidad fue de 20 puntos para apertura y extensión de gaps. Estos alineamientos fueron exportados al software MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) para ser analizados (Tamura *et al.*, 2013). Con MEGA 7 se calcularon matrices de distancia basadas en los modelos evolutivos de “Distancia p” y “Kimura 2-parámetros” usando el método de Bootstrap con 1000 réplicas para ambos modelos. Para visualizar las relaciones entre especies, se construyeron dendogramas utilizando el método “Neighbor-Joining” validado estadísticamente por el método de Bootstrap con 1000 réplicas (Saitou & Nei, 1987). Todos los aislamientos determinados taxonómicamente a nivel de especie fueron anexados a la base de datos del NCBI, GENBANK, la cual le otorgó un código de búsqueda particular a cada reporte.

## 6.5 DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN TIPO ACIL HOMOSERÍN LACTONA POR PARTE DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN ESTUDIO

Para la detección de la producción de moléculas señal tipo Acil Homoserín Lactona (AHL) por parte de las bacterias cultivables aisladas de esponjas con y sin epibiosis se usaron biosensores bacterianos. Los biosensores QS son cepas bacterianas que no producen moléculas señal ya que poseen una mutación en su AHL-sintasa, pero pueden detectar la señal porque el receptor que la reconoce se encuentra intacto. Cuando estos biosensores detectan la producción de AHLs, generan un fenotipo visible, como la bioluminiscencia, la producción de violaceína, la degradación de X-gal y producción de proteína verde fluorescente (GFP) (Steindler & Venturi, 2007). Los biosensores elegidos tienen diferentes rangos de sensibilidad a la detección de moléculas tipo AHLs (Tabla 4 pg. 74).

Para los ensayos in-vitro se usaron dos técnicas de siembra representadas en la Figura 6 pg.71.



**FIGURA 6. DIAGRAMA DE LAS DOS TÉCNICAS DE SIEMBRA USADAS PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE AHLs POR LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN ESTUDIO**

En color amarillo: estría biosensor (Tabla 4); en color verde: cepa control positivo que produce una alta gama de moléculas tipo AHL (*Pseudomonas aeruginosa* Pa01 ó *Pseudomonas putida* IsoF); en color azul: cepa control

negativo que es incapaz de producir moléculas tipo AHL (*P. putida* IsoF117) y en color marrón: aislamientos en estudio. (Tabla 5). **A.** Técnica siembra en T o “*cross-streak*”. **B.** Técnica siembra sobre extendido.

Se enfrentaron cada uno de los aislamientos en estudio con los biosensores bacterianos enumerados en la Tabla 4 pg.73 con sus respectivos controles positivo y negativo (Tabla 5, pg.73). Los co-cultivos se realizaron por triplicado en medio LB y se incubaron por 24 horas a 34°C. La bioluminiscencia producida por pSB -401 y pSB403 se capturaron usando el documentador de imágenes BIORAD Molecular Imager, Chemi Doc XRS+ con un tiempo de exposición de 0.5 minutos. La proteína verde fluorescente (GFP) producida por los biosensores W19 y PKR-C12 se captó usando la placa de selección de proteínas fluorescentes de BIORAD Molecular Imager, para Chemi Doc XRS+ con un tiempo de exposición de 0.5 minutos, en el documentador de imágenes de la misma referencia. El medio de cultivo LB usado para el co-cultivo de los aislamientos en estudio con pZLR4 fue enriquecido con X-gal 50uL (20mg/ml) como sustrato de la B-galactosidasa que se produce tras la detección de las AHL por parte del aislamiento enfrentado, y el medio de cultivo LB usado en el co-cultivo con los biosensores W19 y pKRC12 fue enriquecido con IPTG 20uL (1.5mM) molécula sustrato para la activación del plásmido productor de GFP tras la detección de AHLs.

**TABLA 4. BIOSENSORES USADOS PARA LA DETECCIÓN DE MOLÉCULAS SEÑAL INVOLUCRADAS EN EL QUORUM SENSING PRODUCIDAS POR LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS EN ESTUDIO**

Biosensor	Especie hospedera	Sistema de QS usado	Fenotipo Reportero	Alta sensibilidad	Sensibilidad general	Referencia
<b>CVO26</b>	<i>C. violaceum</i>	CviI/R	Producción de violaceína	C6-AHL	(C6-3-oxo; C8; C8-3-oxo; C4)-AHL	McClellan et al. (1997)
<b>pSB401</b>	<i>E. coli</i>	LuxI/R	Bioluminiscencia	C6-3-oxo-AHL	(C6; C8-3-oxo; C8)-AHL	Winson et al. (1998a)
<b>pSB403</b>	<i>E. coli</i>	LuxI/R	Bioluminiscencia	C6-3-oxo-AHL	(C6; C8-3-oxo; C8)-AHL	Winson et al. (1998a)
<b>W19</b>	<i>E. coli</i>	LuxI/R	Producción de GFP	C6-3-oxo-AHL	C6-3-oxo-AHL	Fernandez et al. (2011)
<b>pKR-C12</b>	<i>E. coli</i>	LasI/R	Producción de GFP	C12-3-oxo-AHL	C10-3-oxo-AHL	(Riedel et al., 2001)
<b>pZLR4</b>	<i>A. tumefaciens</i>	TralI/R	Producción de $\beta$ -galactosidasa	C8-oxo-AHL	Desde C6-AHL hasta C10-AHL; todos los 3-oxo-AHL	(Farrand et al., 2002)

**TABLA 5. CEPAS CONTROL PARA LOS ENSAYOS DE DETECCIÓN DE PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS SEÑAL TIPO AHL**

Cepa control	Hospedero	Molécula de señalización tipo AHL producida en mayor medida
<b>Pa01</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-AHL; C6-AHL; C8-AHL; C10-AHL; C12-AHL
<b>IsoF</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	C6-3-oxo-AHL; C6-AHL; C8-AHL; C8-3-oxo-AHL; C4-AHL
<b>IsoF 117</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	No produce AHLs

En los ensayos Pa01 e IsoF serán usados como controles positivos, mientras IsoF 117 como control negativo.

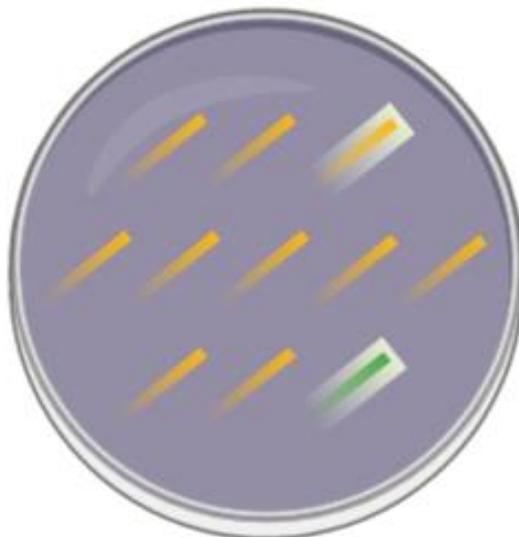
## 6.6 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE QUORUM SENSING

Para evaluar la producción de compuestos inhibitorios de QS por parte de los aislamientos bacterianos presentes en esponjas marinas con y sin *biofouling*, se

enfrentará cada uno de éstos a la cepa tipo *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, mediante el plaqueo del biosensor en caja con agar LB, seguido del estriado superpuesto de los aislamientos en estudio.

*C. violaceum* ATCC 31532, en un evento controlado por QS, produce un pigmento accesorio llamado Violaceína que tiñe de color violeta a las colonias. En presencia de algún compuesto inhibidor de QS, las colonias de *C. violaceum* ATCC 31532 no producen el pigmento, creciendo de color blanco crema en torno a la fuente de inhibición. Para la evaluación del fenómeno de inhibición de QS la cepa tipo *C. violaceum* ATCC 31532 se extendió sobre agar LB y posteriormente se hicieron estrías de cada aislamiento como se muestra en la Figura 7 (pg.74) Para estos ensayos se usó como control positivo a la cepa bacteriana identificada como *Alcaligenes faecalis* ELB9, reportada como productora de compuestos inhibidores de *Quorum Sensing* sobre la cepa biosensora *C. violaceum* ATCC 31532 (Zorro & Arévalo, 2011).

En este ensayo los aislamientos que produjeron compuestos inhibidores de QS presentaron un halo blanco crema alrededor del estriado, correspondiente al biosensor sin pigmento accesorio, como se muestra en el diagrama con el control positivo y uno de los aislamientos de la Figura 7. (pg.74)



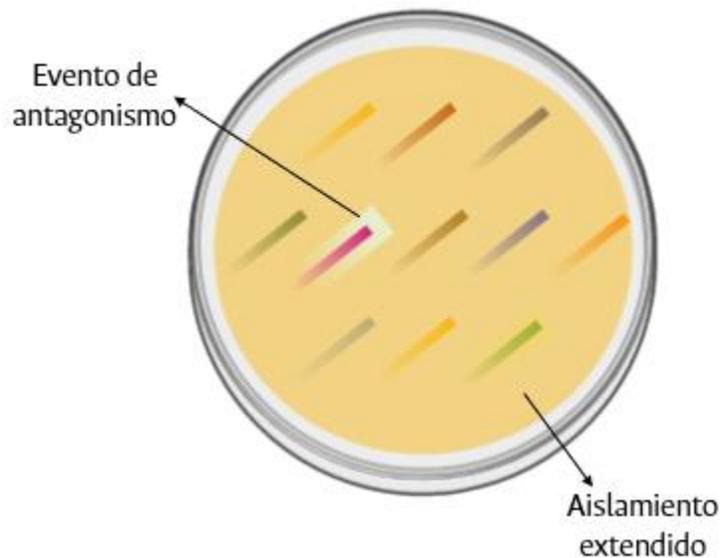
**FIGURA 7. DIAGRAMA DE TÉCNICA USADA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE QS POR PARTE DE LOS AISLAMIENTOS EN ESTUDIO SOBRE *C. VIOLACEUM* ATCC31532**

En amarillo: aislamientos en estudio y en verde: control positivo ELB9 *Alcaligenes faecalis*. Aislamiento 3 y control positivo rodeados de un halo color crema ejemplificando el resultado positivo a la inhibición de QS.

## 6.7 PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO

Para detectar las relaciones antagónicas de crecimiento entre las bacterias pertenecientes a las comunidades asociadas a esponjas marinas con y sin *biofouling*, se enfrentó cada uno de los aislamientos al total de los aislamientos de la comunidad bacteriana cultivable a la que pertenece, en ensayos sobre agar LB, donde se plaqueó un aislamiento y sobre él, se hicieron estrías de los otros aislamientos pertenecientes a su grupo (Figura 8. pg 75). Todos los ensayos se hicieron para cada uno de los aislamientos y por triplicado.

En este ensayo, si un aislamiento en estría produce antagonismo sobre la cepa plaqueada, se observará un halo de inhibición de crecimiento alrededor de la estría, prueba de que existen compuestos que está produciendo ese aislamiento que prohíben el crecimiento de la cepa plaqueada. (Figura 8 pg 75).



**FIGURA 8. DIAGRAMA DE TÉCNICA USADA PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LOS AISLAMIENTOS DE UNA MISMA COMUNIDAD BACTERIANA**

En colores: Todos los aislamientos bacterianos asociados a la comunidad de un tipo de esponja. Al fondo, aislamiento extendido de la misma comunidad. Un evento de antagonismo del aislamiento color rosa sobre el aislamiento extendido se observaría con un halo de inhibición de crecimiento alrededor del aislamiento rosa.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS MARINAS CON Y SIN *BIOFOULING*

#### 7.1.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de los aislamientos bacterianos

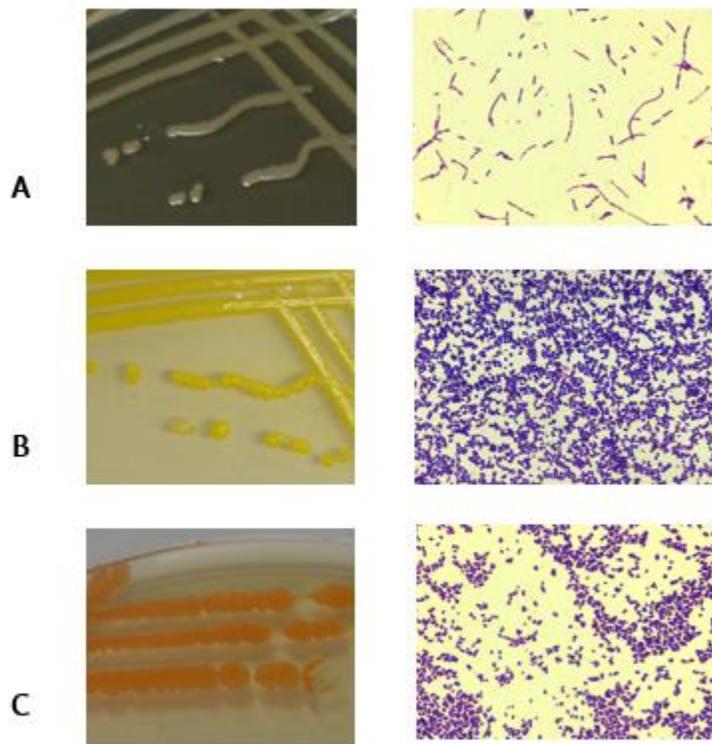
La primera aproximación para conocer a las comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas con y sin *biofouling* se basó en la caracterización de la morfología macroscópica y microscópica de todos los aislamientos obtenidos tras 24h de cultivo (Anexo 3). Las descripciones se realizaron por medio de una observación directa de las colonias bacterianas cultivadas en agar LB, usando estereoscopio (para el caso de la caracterización macroscópica) y usando tinción de Gram y determinación de morfología celular (para la caracterización microscópica). Estos registros permitieron una clasificación provisional para los aislamientos en estudio que sirve no sólo para evaluar modificaciones a los protocolos de caracterización molecular (como se explicará más adelante) sino como una base de datos que permitió comparar las características reportadas con las observadas en los siguientes ensayos, corroborando la identidad de los aislamientos en cada nuevo cultivo, evitando así la pérdida o confusión entre aislamientos trabajados.

Se obtuvo un total de 96 aislamientos bacterianos nombrados de acuerdo con la Tabla 1 (pg.64). En el Anexo 3 “Base de datos de caracterización macro y microscópica de los aislamientos obtenidos para esponjas marinas con y sin *biofouling*”, se encuentran relacionadas las descripciones microscópicas y macroscópicas para cada uno de los aislamientos de los cuatro grupos. De los 93 aislamientos bacterianos, 45 fueron aislados de las esponjas identificadas como *Xestospongia muta* que no poseían *biofouling* y 46 aislamientos se obtuvieron de las esponjas con *biofouling* determinadas como *Applisina insularis* y *Desmapsamma anchorata* (Tabla 6, pg. 77)

**TABLA 6. TOTAL DE AISLAMIENTOS OBTENIDOS PARA CADA GRUPO DE ESPONJAS MARINAS**

<b>Esponja y estado</b>	<b>Número de aislamientos bacterianos totales por grupo</b>
<i>Xestospongia muta</i> (1) sin biofouling	24
<i>Xestospongia muta</i> (2) sin biofouling	23
<i>Aplysina insularis</i> con biofouling	28
<i>Desmapsama anchorata</i> con biofouling	21

Los caracteres morfológicos fueron diversos, pero predominaron las colonias de colores amarillos, crema-amarillo y blancas, con texturas cremosas brillantes y márgenes enteros. La mayoría de los aislamientos presentaron morfología celular tipo bacilo y del total de 98 aislamientos sólo 5 fueron Gram negativos. Algunas morfologías típicas y atípicas se pueden detallar en la Figura 9. (pg.78)



**FIGURA 9. FOTOGRAFÍAS DE COLONIAS Y TINCIÓN DE GRAM DE ALGUNOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS A LAS 24H.**

**A.** Registro fotográfico de CCBXm1-23 (morfología típica); **B.** Registro fotográfico de CCBAiBf-18 (morfología típica) y **C.** Registro fotográfico de CCBAiBf-19 (morfología atípica)

Se logró caracterizar un total de 98 aislamientos bacterianos por sus atributos macro y microscópicos, obteniendo una base de datos descriptiva en formato Excel, usada para el seguimiento de los aislamientos a lo largo de la investigación y la comparación de estas características con las reportadas por bibliografía, lo anterior dando cumplimiento al objetivo específico número uno. De los 98 aislamientos 47 corresponden a comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas sin *biofouling* y 49 corresponden a comunidades bacterianas de esponjas con *biofouling*.

### **7.1.2 Caracterización taxonómica usando el gen ribosomal 16S ARN**

Para realizar la amplificación del gen ribosomal 16S ARN, los aislamientos debieron someterse a extracción de ADN bacteriano, mediante choque térmico. Para la mayoría de los aislamientos, un proceso simple como el paso de 95°C a 0°C fue suficiente para obtener el material genético, sin embargo, algunos aislamientos bacterianos requirieron modificaciones al protocolo de extracción del ADN, probablemente gracias a la naturaleza de su pared celular y producción de enzimas degradadoras (Arslan & Buyser, 2019). Los aislamientos con el protocolo estandarizado para la extracción de ADN se encuentran consignados en la Tabla 2 (pg. 67).

En la Tabla 3 (pg. 69) se registran los aislamientos y las estandarizaciones realizadas sobre el protocolo de PCR que permitieron lograr un óptimo número de fragmentos amplificados con la calidad necesaria para su posterior envío a secuenciación.

Una vez realizada la secuenciación se recibieron electroferogramas con las secuencias obtenidas para los amplificados de cada aislamiento bacteriano. Para algunos aislamientos, donde se realizaron cambios en el protocolo de extracción del ADN y la amplificación de este, el proceso de secuenciación se llevó a cabo hasta tres veces.

Las secuencias recibidas fueron evaluadas para determinar su nivel de resolución y su extensión mínima; además se eliminaron las regiones distales que poseen baja resolución para obtener una secuencia final de alta calidad con una extensión entre 1490bp y 1600bp. Luego de la revisión de la calidad de las secuencias, se realizó una búsqueda comparativa con las secuencias de 16S rADN indexadas en la base de datos BLASTn de NCBI y con las secuencias indexadas en la base de datos curada EZ-TAXON. Los resultados obtenidos mostraron secuencias asociadas a especies bacterianas de las que se eligieron únicamente las que poseían similitud del 97%. Con los nombres de las especies similares sobre ese porcentaje, se procedió a descargar la secuencia tipo para cada especie, para un total de máximo cinco especies bacterianas comparables por cada aislamiento en estudio. Estas secuencias tipo se obtuvieron de las referencias de la base de datos curada LPSN.

El conjunto de secuencias de cepas tipo y la secuencia del aislamiento en estudio se alinearon con el programa MEGA 7.0.

Con esta información se construyeron matrices de distancia usando los modelos evolutivos de “Distancia p” y “Kimura 2-parámetros”, cuyos valores obtenidos y especies similares a los aislamientos en estudio se encuentran registrados en las tablas de la 7 a la 10, para cada grupo de esponjas marinas. Los porcentajes de similitud reportados fueron obtenidos a partir de la Distancia p con la siguiente fórmula  $D=(1-p) * 100$ , donde p es el valor de la distancia presentado en la matriz generada por MEGA 7.0.

**TABLA 7. ESPECIE CON MAYOR SIMILITUD DE ACUERDO CON LOS VALORES DE DISTANCIA P Y KIMURA 2-PARÁMETROS PARA CADA UNO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS PERTENECIENTES AL GRUPO DE *XESTOSPONGIA MUTA* (1) SIN *BIOFOULING***

Código cepario CCB	Código GENBANK	Especie más similar	Distancia p	Kimura 2 parámetros	% Similitud
CCBXm1-1	MK371709	<i>Bacillus haikouensis</i>	0.009	0.009	99.1
CCBXm1-3	MK367612	<i>Micrococcus aloeverae</i>	0.009	0.009	99.1
CCBXm1-4D	MK377089	<i>Micrococcus aloeverae</i>	0.010	0.010	99.0
CCBXm1-5	MK371707	<i>Kocuria flava</i>	0.008	0.008	99.2
CCBXm1-6	SC	<i>Micrococcus sp. *</i>	0.032	0.032	96.8
CCBXm1-6D	SC	<i>Micrococcus sp. *</i>	0.031	0.031	96.9
CCBXm1-8	MK386686	<i>Bacillus paramycoides</i>	0.004	0.004	99.6
CCBXm1-10	MK371668	<i>Bacillus firmus</i>	0.000	0.000	100.0
CCBXm1-11	MK386694	<i>Bacillus qingshengii</i>	0.021	0.021	97.9
CCBXm1-13	MK386696	<i>Rhodococcus ruber</i>	0.008	0.008	99.2
CCBXm1-14	SC	<i>Leifsonia sp.*</i>	0.106	0.106	89.4
CCBXm1-16	MK367570	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	0.009	0.009	99.1
CCBXm1-18	MK386687	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	0.002	0.002	99.8
CCBXm1-19	MK386688	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	0.004	0.004	99.6
CCBXm1-19D	MK386689	<i>Bacillus pumilus</i>	0.006	0.006	99.4
CCBXm1-20	MK386693	<i>Bacillus foraminis</i>	0.012	0.012	98.8
CCBXm1-22	MK386691	<i>Bacillus tequilensis</i>	0.000	0.000	100.0
CCBXm1-23	MK386695	<i>Lysinibacillus composti</i>	0.009	0.009	99.1
CCBXm1-25	MK386697	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	0.008	0.008	99.2
CCBXm1-26	SC	<i>Paracoccus sp.*</i>	0.045	0.045	95.5
CCBXm1-27**	MK371705	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.007	0.007	99.3
CCBXm1-32	MK377090	<i>Bacillus pumilus</i>	0.019	0.019	98.1
CCBXm1-33	SC	<i>Micrococcus sp. *</i>	0.033	0.033	96.7
CCBXm1-35	MK386692	<i>Microbacterium foliorum</i>	0.006	0.006	99.4

Los (\*) en la columna de “Especie más similar” representan aislamientos a los que, tras el alineamiento múltiple, se obtuvo como género similar el reportado, con un porcentaje de similitud menor al 97%. Los (\*\*) en la columna “Código Cepario CCB” representan a los aislamientos con tratamiento bioinformático particular por su extensión

menor a las 1400bp **SC**: Sin código- el nivel taxonómico al que se logró determinar no permite la asignación de código en GENBANK.

**TABLA 8.ESPECIE CON MAYOR SIMILITUD DE ACUERDO CON LOS VALORES DE DISTANCIA P Y KIMURA 2-PARÁMETROS PARA CADA UNO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS PERTENECIENTES AL GRUPO DE XESTOSPONGIA MUTA (2) SIN BIOFOULING.**

Código cepario CCB	Código GENBANK	Especie más similar	Distancia p	Kimura 2 parámetros	% Similitud
CCBXm2-1	SC	<i>Bacillus cereus</i> **	0.033	0.033	96.7
CCBXm2-1C	MK386700	<i>Bacillus cereus</i>	0.003	0.003	99.7
CCBXm2-1D	MK386698	<i>Bacillus cereus</i>	0.004	0.004	99.6
CCBXm2-3*	MK386701	<i>Bacillus flexus</i>	0.006	0.006	99.4
CCBXm2-4	MK386707	<i>Bacillus filamentosus</i>	0.011	0.011	98.9
CCBXm2-6	MK386729	<i>Micrococcus aloeverae</i>	0.010	0.010	99.0
CCBXm2-7	MK386722	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.001	0.001	99.9
CCBXm2-8	MK386708	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.013	0.013	98.7
CCBXm2-9	MK386716	<i>Bacillus praedii</i>	0.007	0.007	99.3
CCBXm2-10	MK386715	<i>Pseudonocardia carboxydovorans</i>	0.000	0.000	100.0
CCBXm2-11	MK386725	<i>Bacillus subterraneus</i>	0.006	0.006	99.4
CCBXm2-12	MK386711	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	0.004	0.004	99.6
CCBXm2-13	MK386726	<i>Bacillus paramycoides</i>	0.018	0.018	98.2
CCBXm2-14	MK386712	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.006	0.006	99.4
CCBXm2-14D	MK386717	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.013	0.013	98.7
CCBXm2-15	MK386713	<i>Micrococcus aloeverae</i>	0.012	0.010	98.8
CCBXm2-17	MK386714	<i>Bacillus cereus</i>	0.021	0.030	97.9
CCBXm2-18	MK386720	<i>Micrococcus aloeverae</i>	0.001	0.001	99.9
CCBXm2-18D	MK386718	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.006	0.006	99.4
CCBXm2-19	MK386719	<i>Bacillus cereus</i>	0.020	0.020	98.0
CCBXm2-21*	MK386723	<i>Bacillus flexus</i>	0.013	0.013	98.7
CCBXm2-22	MK386727	<i>Bacillus filamentosus</i>	0.000	0.000	100.0
CCBXm2-23	MK386724	<i>Bacillus cereus</i>	0.004	0.004	99.6

Los (\*\*) en la columna de "Especie más similar" representan aislamientos a los que, tras el alineamiento múltiple, se propone como especie similar la reportada, con un porcentaje de similitud menor al 97% (Adicional, descripción de la Tabla 7.)

**TABLA 9. ESPECIE CON MAYOR SIMILITUD DE ACUERDO CON LOS VALORES DE DISTANCIA P Y KIMURA 2-PARÁMETROS PARA CADA UNO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS PERTENECIENTES AL GRUPO DE *APLYSINA INSULARIS* CON *BIOFOULING*. (DESCRIPCIÓN TABLA 7.)**

Código cepario CCB	Código GENBANK	Especie más similar	Distancia p	Kimura 2 parámetros	% Similitud
CCBAiBf-1	MK386731	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	0.016	0.016	98.4
CCBAiBf-2	MK386732	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.005	0.005	99.5
CCBAiBf-2D	MK386736	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.010	0.010	99.0
CCBAiBf-3D	MK386738	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.006	0.006	99.4
CCBAiBf-4	MK386740	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	0.002	0.002	99.8
CCBAiBf-5	MK386730	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	0.000	0.000	100.0
CCBAiBf-6	MK386734	<i>Micrococcus aloe verae</i>	0.021	0.021	97.9
CCBAiBf-7	MK386733	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	0.009	0.009	99.1
CCBAiBf-7D	MK386737	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	0.009	0.009	99.1
CCBAiBf-8	MK386750	<i>Agreia pratensis</i>	0.005	0.005	99.5
CCBAiBf-9	MK386739	<i>Microbacterium oryzae</i>	0.000	0.000	100.0
CCBAiBf-9D	MK386743	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0.004	0.004	99.6
CCBAiBf-10	MK386755	<i>Bacillus halosaccharovorans</i>	0.012	0.012	98.8
CCBAiBf-12	MK386756	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	0.008	0.008	99.2
CCBAiBf-12D	MK386741	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	0.001	0.001	99.9
CCBAiBf-13	MK386728	<i>Nocardia corynebacterioides</i>	0.004	0.004	99.6
CCBAiBf-14	MK386746	<i>Bacillus rhizosphaerae</i>	0.003	0.003	99.7
CCBAiBf-17	MK386757	<i>Microbacterium barkeri</i>	0.003	0.003	99.7
CCBAiBf-17D	MK386748	<i>Microbacterium barkeri</i>	0.005	0.005	99.5
CCBAiBf-18	MK386745	<i>Micrococcus luteus</i>	0.008	0.008	99.2
CCBAiBf-19	SC	<i>Exiguobacterium sp. *</i>	0.032	0.032	96.8
CCBAiBf-20	MK386747	<i>Bacillus proteolyticus</i>	0.009	0.009	99.1
CCBAiBf-22	MK386754	<i>Micrococcus flavus</i>	0.004	0.004	99.6
CCBAiBf-23	MK386749	<i>Leucobacter holotrichiae</i>	0.008	0.008	99.2
CCBAiBf-24	SC	<i>Exiguobacterium sp. *</i>	0.035	0.035	96.5
CCBAiBf-26	MK386752	<i>Tessaracoccus oleiagri</i>	0.001	0.001	99.9
CCBAiBf-27	MK386760	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	0.021	0.021	97.9
CCBAiBf-30	MK386753	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	0.007	0.007	99.3

**TABLA 10. ESPECIE CON MAYOR SIMILITUD DE ACUERDO CON LOS VALORES DE DISTANCIA P Y KIMURA 2-PARÁMETROS PARA CADA UNO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS PERTENECIENTES AL GRUPO DE *DESMAPSAMMA ANCHORATA* CON *BIOFOULING***

Código cepario CCB	Códigos GENBANK	Especie más similar	Distancia p	Kimura 2 parámetros	% Similitud
CCBDaBf-1	MK386759	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	0.006	0.006	99.4
CCBDaBf-2	MK386763	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.001	0.001	99.9
CCBDaBf-3	MK386765	<i>Kocuria flava</i>	0.000	0.000	100.0
CCBDaBf-5	MK386764	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.008	0.008	99.2
CCBDaBf-6	MK386767	<i>Bacillus altitudinis</i>	0.008	0.008	99.2
CCBDaBf-9	MK386788	<i>Bacillus mycoides</i>	0.001	0.001	99.9
CCBDaBf-10	MK386787	<i>Bacillus altitudinis</i>	0.001	0.001	99.9
CCBDaBf-11	MK386789	<i>Bacillus altitudinis</i>	0.005	0.005	99.5
CCBDaBf-12	MK386792	<i>Bacillus tequilensis</i>	0.002	0.002	99.8
CCBDaBf-13	MK386791	<i>Lysinibacillus halotolerans</i>	0.012	0.012	98.8
CCBDaBf-13D	SC	<i>Bacillus licheniformis</i> **	0.036	0.036	96.4
CCBDaBf-15	MK386793	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	0.003	0.003	99.7
CCBDaBf-16	MK386795	<i>Pseudomonas oceani</i>	0.009	0.009	99.1
CCBDaBf-17	MK386794	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	0.009	0.009	99.1
CCBDaBf-18	MK386796	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.004	0.004	99.6
CCBDaBf-20	MK386798	<i>Bacillus haikouensis</i>	0.016	0.016	98.4
CCBDaBf-22	MK386797	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.001	0.001	99.9
CCBDaBf-22D	MK386800	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.000	0.000	100.0
CCBDaBf-26	MK386799	<i>Lysinibacillus sinduriensis</i>	0.008	0.008	99.2
CCBDaBf-28	MK386790	<i>Dietzia cinnamomea</i>	0.001	0.001	99.9
CCBDaBf-29	MK386801	<i>Bacillus oryzaecorticis</i>	0.019	0.019	98.1

Los (\*\*) en la columna de "Especie más similar" representan aislamientos a los que, tras el alineamiento múltiple, se propone como especie similar la reportada, con un porcentaje de similitud menor al 97% (Adicional, descripción de la Tabla 7.)

Los aislamientos CCBXm1-6, CCBXm1-6D, CCBXm1-14, CCBXm1-26, CCBXm1-33, CCBAiBf-19 y CCBAiBf-24, marcados con (\*) en la columna "Especie más similar", tuvieron un tratamiento diferente a las otras secuencias ya que, en el proceso de secuenciación, se obtuvieron secuencias parciales de entre 1200bp y 1400bp. Al ser secuencias con una extensión mucho menor a otras secuencias analizadas que eran de aproximadamente 1400 y 1600bp, no se incluyeron en el análisis general. Para ninguno de los aislamientos mencionados se logró asignar especie, pero al compartir una similitud menor al 97% con 3 o más especies del

mismo género, se les pudo asignar ese nivel taxonómico, siguiendo los parámetros del comité de sistemática y taxonomía bacteriológica.

Aislamientos como CCBXm2-1 y CCBDaBf-13D marcados con (\*\*) en la columna “Especie más similar” también presentaron secuencias cortas por debajo de la mayoría de los aislamientos (con extensiones entre 1300 y 1400pb) y porcentajes de similitud entre 95% y 97%. A pesar de que se trató de un porcentaje de similitud bajo para el aceptado para asignar especie, el BLASTn arrojó similitud con 4 o más aislamientos indexados determinados con la especie *Bacillus cereus* para CCBXm2-1 y *Bacillus licheniformis* para CCBDaBf-13. De esta forma se les otorgó la asignación tentativa a estas especies dado que los reportes en la base de datos del NCBI no encontró similitud con otras especies distintas a las mencionadas. Esta clasificación tentativa no responde a los parámetros establecidos por el comité ad hoc, pero se reportan de esta manera dada la similitud de los aislamientos únicamente con las especies mencionadas, con secuencias diferentes a la cepa tipo.

El aislamiento CCBXm1-27, marcado con (\*\*) en “Código de cepario CCB” tuvo un tratamiento diferencial dado que poseía una extensión de 980bp, mucho menor incluso a las reportadas con extensiones menores que llegaron a género. Dada la longitud de su secuencia y para evitar una modificación abrupta a los alineamientos realizados, tuvo un alineamiento múltiple único para ese aislamiento.

Los aislamientos sin ninguna marca poseen secuencias de entre 1400 y 1600bp, y fueron analizadas en conjunto. Todas esas secuencias reportaron porcentajes de similitud superiores al 97%, e incluso con porcentajes superiores al 99% permitiendo concluir con certeza que pertenecen a las especies bacterianas relacionadas en las Tablas 7 a la 10 (pg. 81 a la 84)

El total de los aislamientos antes mencionados (con similitud mayor al 97%) se alinearon usando Clustal W Multiple Aligment (Thompson *et al.*, 2002) con una penalidad de 20 puntos para apertura y extensión de gaps. Usando el método de agrupamiento Neighbor-Joining basado en Distancia-P (Saitou & Nei, 1987), se realizaron dendogramas que representan la relación entre los aislamientos en estudio con las especies bacterianas asignadas, para cada una de las comunidades

bacterianas asociadas a esponjas con y sin *biofouling* (Figuras 10, 13, 15 y 17). Para los aislamientos marcados con uno o dos asteriscos en “Especie más similar” y “Código cepario CCB”, se realizaron alineamientos con las especificaciones antes mencionadas, a fin de demostrar su bajo porcentaje de similitud con una cepa tipo específica y su relación al género asignado (Figuras 11, 12, 14, 16, 18). En todos los casos, el método de agrupación Neighbor-Joining usó Bootstrap de 1000 réplicas como método de validación estadística.

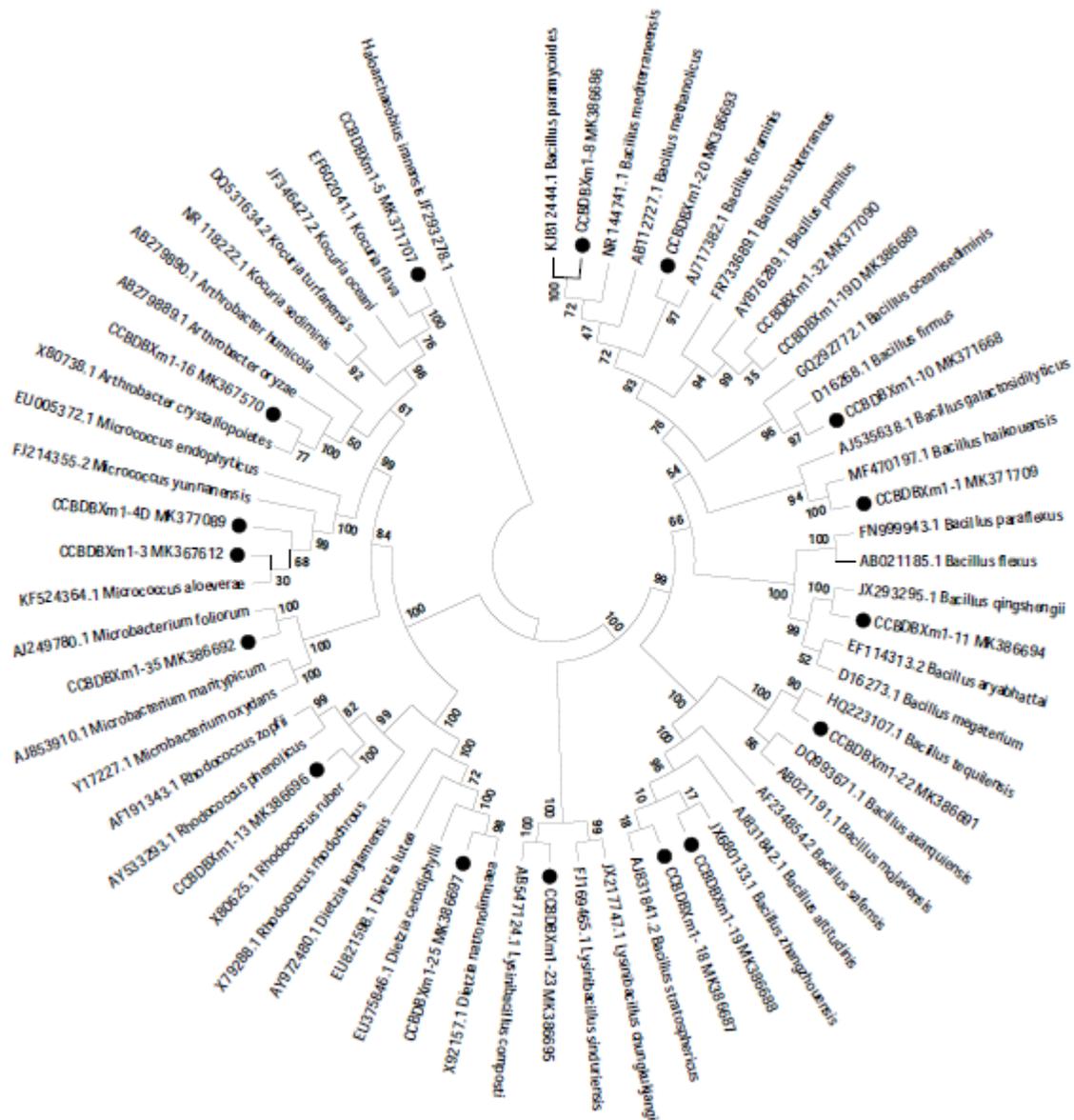
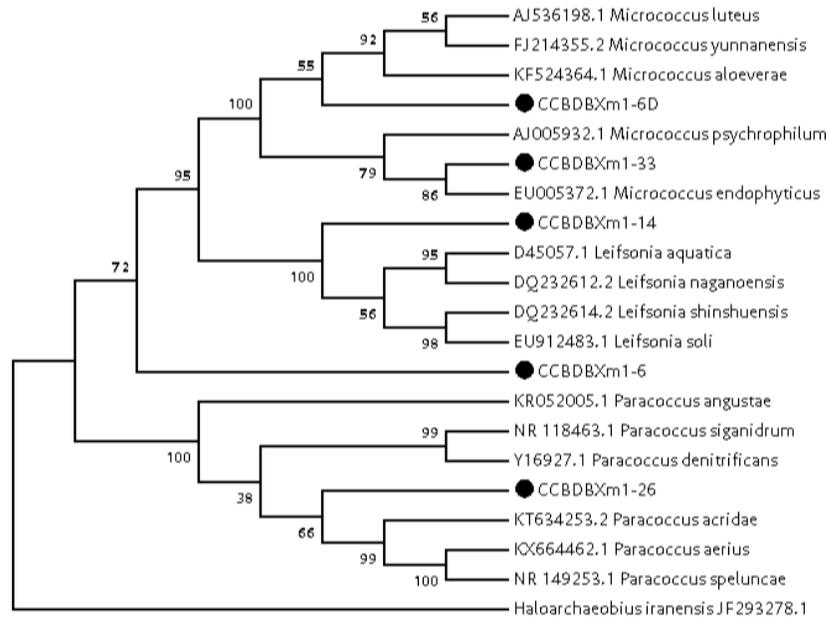


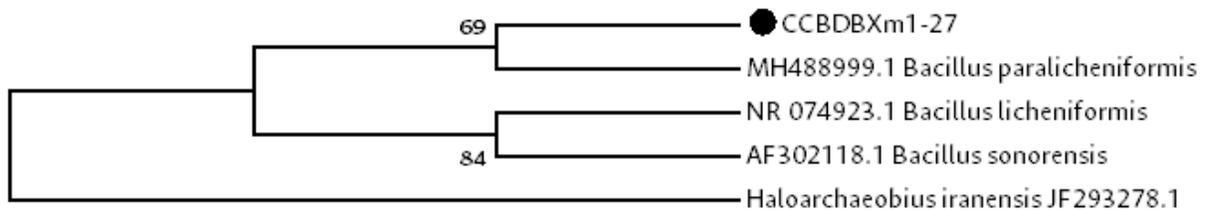
FIGURA 10. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA ESPONJA *XESTOSPONGIA MUTA* XM1 SIN *BIOFOULING*

El dendrograma fue construido a partir de las secuencias del gen 16S rADN de los aislamientos ahí relacionados. Se utilizó como algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining a partir de una matriz de distancias calculada con el modelo de Distancia-P. Los números en los nodos representan los valores de Bootstrap en porcentaje, utilizado para la validación estadística basado en 1000 repeticiones. Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. *Haloarchaeobius iranensis* fue utilizado como grupo externo.



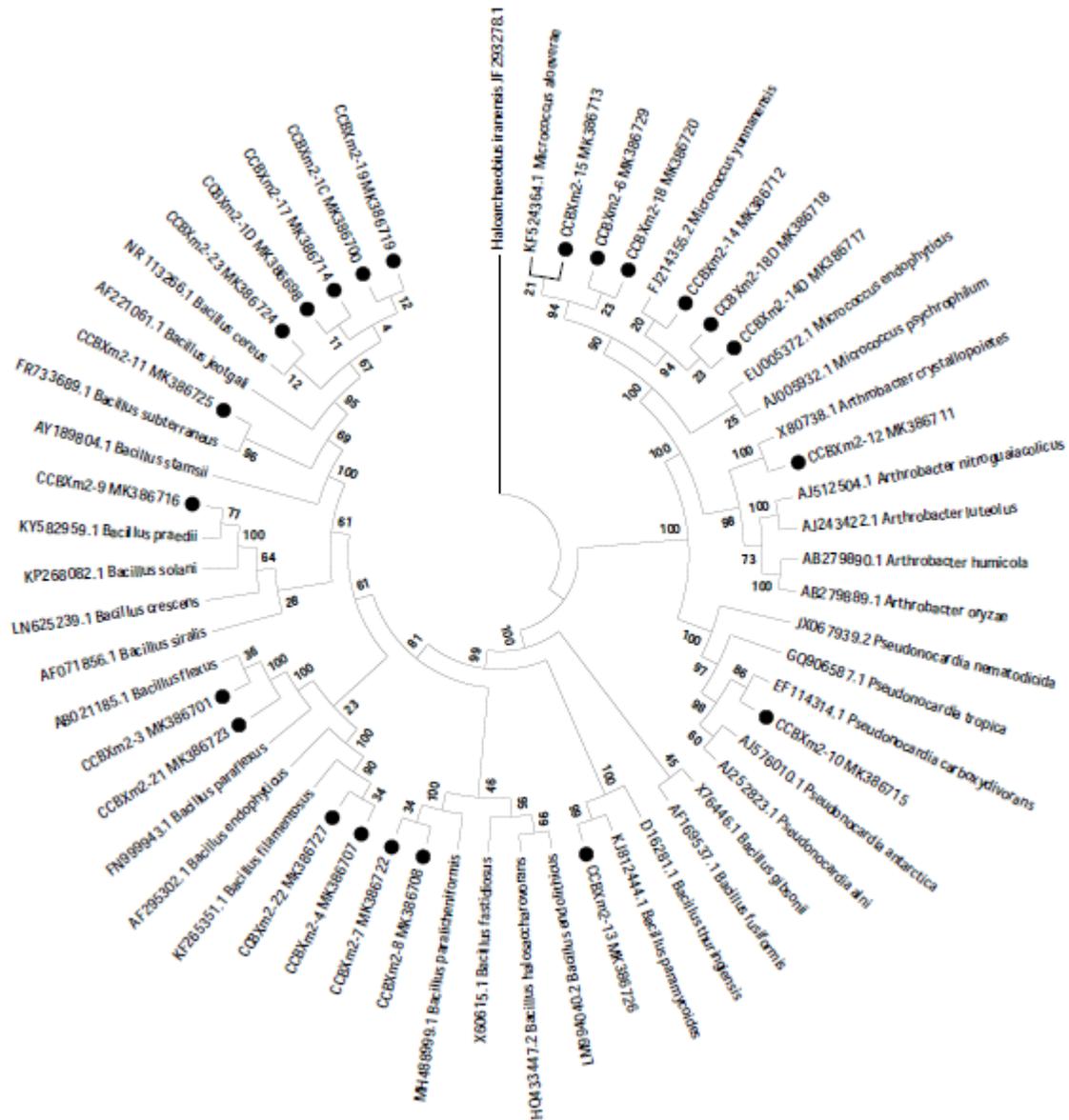
**FIGURA 11. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA ESPONJA *XESTOSPONGIA MUTA* XM1 SIN *BIOFOULING*, CON VARIACIONES EN LA EXTENSIÓN DE LA SECUENCIA (POR DEBAJO DE LAS 1400BP)**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



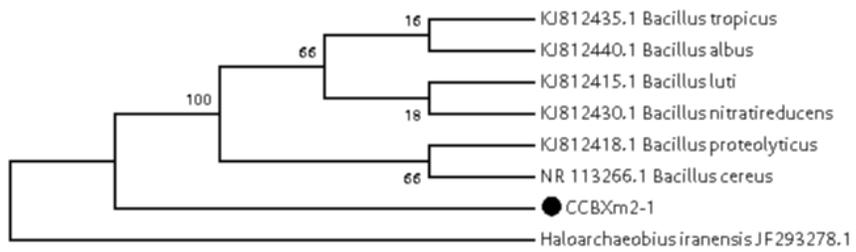
**FIGURA 12. RELACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLAMIENTO CCBXm1-27 PERTENECIENTE A LA COMUNIDAD BACTERIANA DE LA ESPONJA *XESTOSPONGIA MUTA* XM1 SIN *BIOFOULING*.**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



**FIGURA 13. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA ESPONJA *XESTOSPONGIA MUTA* XM2 SIN *BIOFOULING***

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



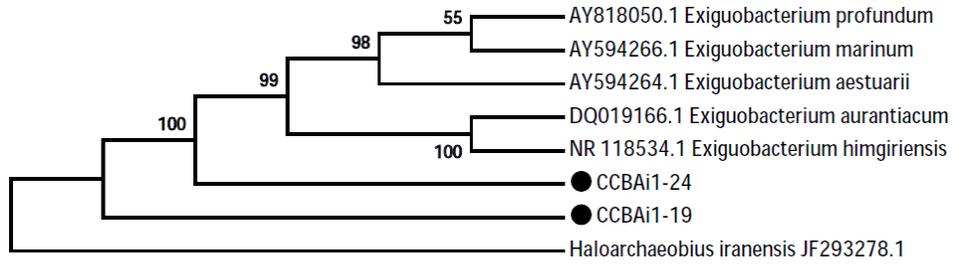
**FIGURA 14. RELACIONES TAXONÓMICAS DEL AISLAMIENTO CCBXm2-1 PERTENECIENTE A LA COMUNIDAD BACTERIANA DE ESPONJA *XESTOSPONGIA MUTA XM2* SIN *BIOFOULING* CON VARIACIONES EN LA EXTENSIÓN DE LA SECUENCIA (POR DEBAJO DE LAS 1400BP)**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



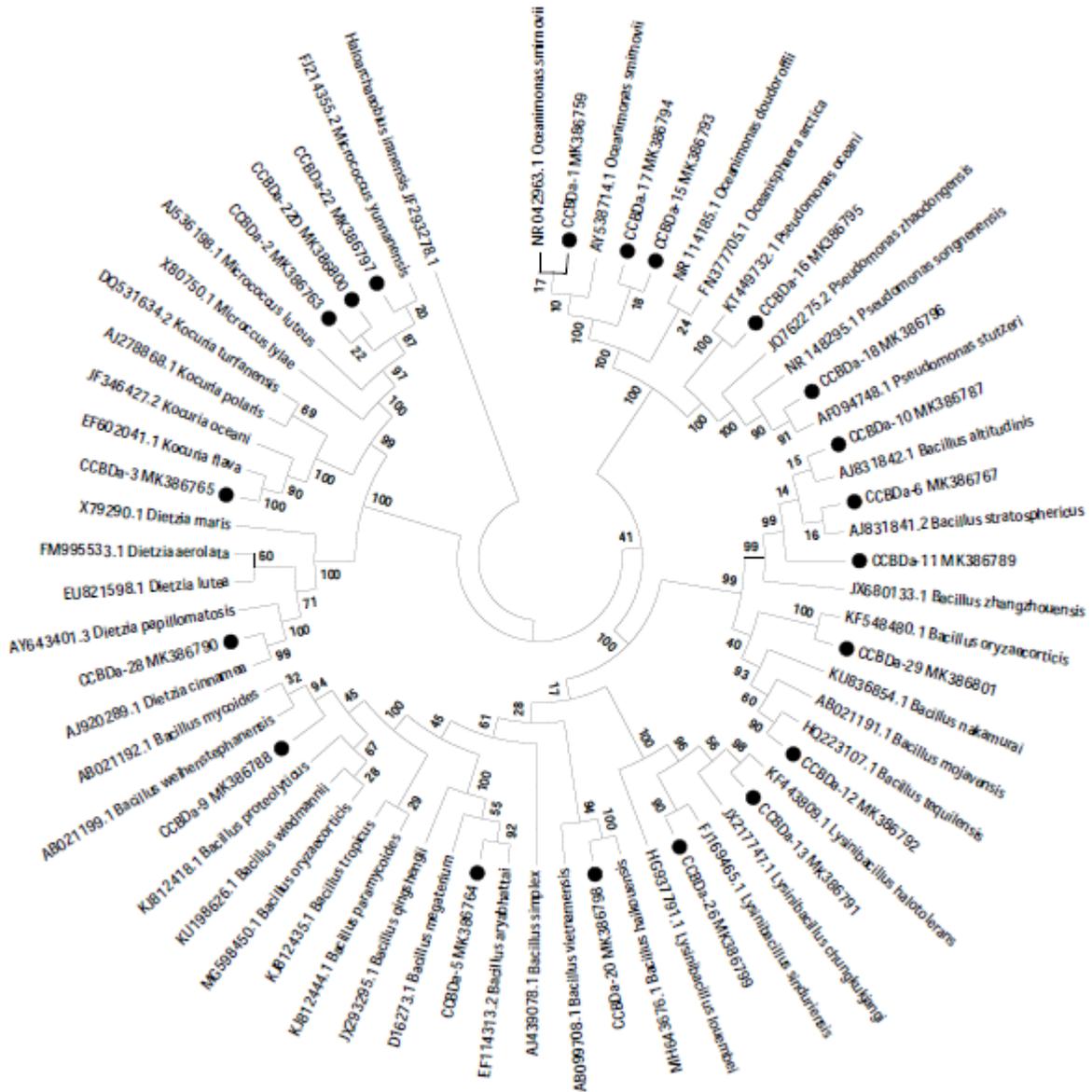
**FIGURA 15. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA ESPONJA *APLYSINA INSULARIS* (AIBf) CON *BIOFOULING***

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



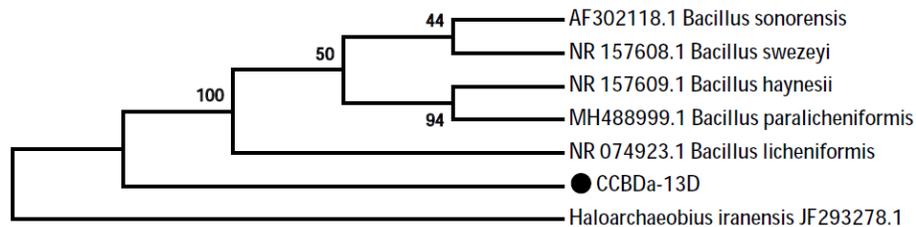
**FIGURA 16. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LA ESPONJA *APLYSINA INSULARIS* (AIBF) CON *BIOFOULING*, CON VARIACIONES EN LA EXTENSIÓN DE LA SECUENCIA (POR DEBAJO DE LAS 1400BP)**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



**FIGURA 17. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN LA ESPONJA *DESMAPSAMMA ANCHORATA* (DABF) CON BIOFOULING**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.



**FIGURA 18. RELACIONES TAXONÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LA ESPONJA *DESMAPSAMMA ANCHORATA* (DABF) CON *BIOFOULING*, CON VARIACIONES EN LA EXTENSIÓN DE LA SECUENCIA (POR DEBAJO DE LAS 1400BP)**

Cada aislamiento en estudio se encuentra marcado con un círculo negro relleno. Este dendrograma fue construido utilizando los mismos parámetros que los descritos en la figura 10.

\*\*Para los aislamientos CCBXm2-3 y CCBXm2-21 identificados como *B. flexus* no se reportan los resultados de ensayos de inhibición, antagonismo y producción de AHLs realizado al resto de aislamientos, pues tras el proceso de caracterización y almacenamiento no fue posible recuperar estas colonias.

### **7.1.3 Consideraciones sobre las modificaciones en los protocolos de extracción y amplificación del gen ribosomal 16S RNA**

Para la caracterización de las comunidades bacterianas cultivables asociadas a esponjas marinas con y sin epibiosis en su superficie, se realizaron dos aproximaciones iniciales a fin de otorgar identidad a cada aislamiento obtenido: de forma preliminar, se realizó una caracterización macro y microscópica partiendo de la descripción de colonias y tinciones de Gram de cada aislamiento. Este paso fue fundamental, para el conocimiento de las características generales como método de inventario de los ceparios obtenidos. Con esta caracterización parcial, los aislamientos fueron divididos en tres grandes grupos: Bacilos Gram positivos; Cocos Gram positivos (incluyendo micrococos) y bacterias Gram negativas. Con una aproximación bibliográfica preliminar se logró establecer que luego de las *Proteobacterias*, los *Firmicutes* y *Actinobacterias* dominan el consorcio bacteriano asociado a esponjas marinas; y que estos filos han sido un gran desafío para la comunidad científica que busca determinarlos taxonómicamente, por sus características fisiológicas y composición química que complejizan los protocolos de extracción de ADN y amplificación del gen ribosomal 16S ARN (Yang, Franco, & Zhang, 2015). De hecho, gracias a la dificultad que presentan estos microorganismos

para ser caracterizados de forma convencional por la amplificación del 16S ARN, se han propuesto nuevos mecanismos de caracterización bacteriana como lo es el uso de espectrometría de masas usando MALDI-TOF, que aún se encuentra en desarrollo, ampliación, curación y consenso de la información obtenida en bases de datos a nivel mundial (Carbonnelle *et al.*, 2011). En este trabajo se estandarizaron los protocolos necesarios para poder usar la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S rADN como mecanismo de identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos en estudio.

Se sabe que con bacterias pertenecientes a los filo *Actinobacteria* y *Firmicutes* se deben realizar pasos adicionales a los convencionales para la óptima extracción del ADN y amplificación del gen ribosomal 16S ARN; esto se traduce en una estandarización a los protocolos de extracción y PCR usados convencionalmente (Carbonnelle *et al.*, 2011; Panek *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2011; Wielinga *et al.*, 2011). Las estandarizaciones de extracción de ADN y modificación de los ciclos de la PCR se realizaron siguiendo como línea base a los protocolos de extracción de ADN especiales usados por el CCB, teniendo en cuenta la bibliografía que reporta que estos organismos de los filo *Actinobacteria* y *Firmicutes* poseen una pared celular con una alta complejidad proteica y poseen una gran batería de enzimas como las ADNasas que pueden activarse fácilmente frente al estrés del choque térmico para la lisis celular, poniendo en riesgo la integridad del material genético (Arslan & Buyser, 2019; Hamedi, Kafshnouchi, & Ranjbaran, 2019). El protocolo sencillo de extracción de ADN usado por el CCB consiste en un choque térmico de 100°C por 10 minutos seguido de un baño de hielo por 10 minutos y fue probado para el total de los aislamientos en estudio. Los aislamientos que resultaran negativos para este proceso, es decir, sin una extracción exitosa de ADN o con un ADN de baja calidad, fueron sometidos al uso de lizosima para romper las paredes bacterianas, seguido del uso de proteinasa K para inactivar tanto la actividad enzimática de la lizosima como de cualquier otra enzima que pudiera poner en riesgo la calidad de la muestra, particularmente ADNasas, como lo formulan los protocolos de extracción de ADN más complejos, usados por el CCB. Los cambios en el tiempo y temperatura de digestión con lizosimas fueron probados en rangos

desde 37°C hasta 45°C, buscando optimizar el tiempo de digestión con la calidad del producto final para once aislamientos clasificados como bacilos y micrococcos Gram positivos. La inactivación DE ADNAsas sólo se realizó para siete aislamientos, a los que tras el uso de lisozimas aún presentaban degradación del material genético. Para estos, la digestión con Proteinasa K fue desarrollada en el tiempo y temperaturas referidos en el manual de usuario (2mg/ml por 15min a 37°C). Las estandarizaciones de extracción fueron consignadas en la Tabla 2 (pg. 67) y son muestra del reto técnico asociado a la obtención de material genético integro suficiente para protocolos como PCR, cuando las muestras analizadas son bacterias atípicas obtenidas de ambientes no convencionales.

Cuando el proceso de extracción de ADN culminó, el siguiente paso fue la amplificación del gen ribosomal 16S ARN mediante el uso de PCR convencional. Se usó el protocolo empleado en el grupo para todas las investigaciones en comunidades bacterianas cultivables, y se realizó el seguimiento a los productos de la amplificación, mediante gel de agarosa, tal como se describe en la metodología (Cárdenas, *et al.*, 2012; Franco, Cadavid & Arévalo-ferro, 2019; Ripe *et al.*, 2016; Zorro & Arévalo, 2011).

Sin embargo, no todos los aislamientos bacterianos lograron una amplificación exitosa, para lo que se realizó una estandarización a los protocolos originales para los ciclos de PCR y a las concentraciones de los elementos de la mezcla maestra (MM) utilizada. En un primer momento se modificaron las concentraciones de los reactivos para PCR, principalmente la concentración de MgSO<sub>4</sub>, *primers* y Taq, encontrando que para los aislamientos problema, la mezcla óptima de la MM se logró aumentando únicamente la concentración de MgSO<sub>4</sub> 50mM de 0,6uL a 0,9uL y de Taq polimerasa 1U de 0,1uL a 0,2uL. El MgSO<sub>4</sub> actúa como cofactor de la Taq polimerasa, así que aumentando su concentración y la concentración de la enzima polimerasa, la probabilidad de formar el enlace cofactor-enzima aumenta y como consecuencia aumenta la unión de la polimerasa al molde y su procesividad (Harder *et al.*, 2012).

Además, se modificó el ciclo al que fue sometida la MM, cambiando las temperaturas de alineamiento y adición de *primers*, y de extensión, pasando de

ciclos de alineamiento de 56°C, a ciclos de 54 a 58°C (según el aislamiento), y cambiando temperaturas de extensión de 72°C a temperaturas de entre 74 y 76°C. Los organismos que recibieron esta modificación del protocolo y las temperaturas exactas donde se logró el óptimo de amplificado por calidad y concentración se encuentran consignados en la Tabla 3. (pg. 69) Los aislamientos que requirieron estas estandarizaciones fueron bacilos y micrococcos Gram positivos. Estos protocolos se encuentran archivados y son de propiedad del grupo de investigación CCB, además, se encuentran a disposición de la comunidad académica interesada. La razón de que estos microorganismos requirieran estas modificaciones puede estar asociada a la complejidad de la pared celular y la composición bioquímica tanto de su citosol como de las sustancias extracelulares que pueden producir. En un primer momento, donde no se obtenía material genético tras el choque térmico, las bacterias pudieron tener resistencia a esta temperatura y soportarla tanto como para no lisarse. El uso de lizosimas permitió desestabilizar la pared celular, degradando las proteínas asociadas a la pared y promoviendo así la lisis celular.

En un segundo evento, aunque las bacterias se lisaron tras el choque térmico, no se obtuvo material genético de calidad, porque se encontraba degradado, dando por resultado un barrido en el gel de agarosa. Muchos bacilos y actinos han sido reportados como productores de ADNasas capaces de degradar material genético foraneo, como un mecanismo de supervivencia. En presencia de estrés como el aumento drástico de temperatura, muchos aislamientos pueden activar la producción de ADNasas que además se mantienen íntegras y activas una vez ocurre lisis, degradando el ADN propio y el de la población celular de la muestra. Con el uso de Proteinasa K nos aseguramos de que las proteínas degradadoras del material genético se degradaran, evitando el corte del material genético.

El ADN genómico bacteriano, aunque no posee proteínas de compactación como las histonas en eucariotas, tiene proteínas accesorias, similares a las histonas y otras proteínas involucradas en procesos de replicación y transcripción que pueden quedar adheridas al material genético, imposibilitando el acceso de la polimerasa para la amplificación del gen de interés. Un aumento en la concentración de Taqpolimerasa, aumenta la probabilidad de que ésta realice las copias del gen a

pesar de la interferencia de las proteínas accesorias, inactivas tras el choque térmico; y si se suma una mayor concentración de la enzima polimerasa, debe aumentar también la concentración de  $MgSO_4$ , cofactor indispensable para el funcionamiento de esa enzima. La anterior fue una de las formas de abordar el desafío de no obtener el amplificado deseado tras el protocolo de PCR convencional. Además de este cambio, si el amplificado aún era poco, se cambiaron las temperaturas de los ciclos, particularmente de alineamiento de *primers* al molde y extensión del amplificado, según es reportado para estandarizaciones de protocolos de PCR para el gen ribosomal 16S ARN. Una baja a la temperatura de alineamiento, reduce la especificidad de unión del primer al molde, haciendo que los *primers* tengan una mayor probabilidad de unión al ADN. Por el contrario, un aumento en la temperatura de alineamiento produce una mayor especificidad de unión, haciendo que los *primers* se agreguen a regiones específicas, pero con una alta concentración de estas moléculas en la MM, la probabilidad de encontrar la región de interés es mayor. Cuando se aumenta la temperatura de extensión se modifica la tasa de procesividad de la Taq polimerasa, que, frente al estado del ADN de la muestra, se puede afinar para obtener un número de amplificados óptimos. Se encontró que para algunos bacilos Gram positivos, las temperaturas de digestión con lizosima y las temperaturas de alineamiento y de extensión para PCR son mayores, mientras que para micrococos Gram positivos, la temperatura de digestión se acerca más a la convencional (descrita por el fabricante) y se requirieron temperaturas de alineamiento de *primers* al molde, menores al protocolo tradicional, con temperaturas de extensión superiores por dos a cuatro grados sobre la temperatura del protocolo tradicional.

Estos resultados son relevantes para el grupo de investigación y en general para la comunidad científica que trabaja con estos microorganismos marinos pues permite tener un punto de partida para la estandarización de los protocolos de extracción de ADN independiente de kits de extracción y de los protocolos de amplificación del gen ribosomal 16S ARN, donde se pueden replicar los protocolos aquí presentados y modificarlos desde los puntos de temperatura y concentración de reactivos obtenidos.

### **7.1.3.1 Consideraciones frente a la caracterización macro y microscópica**

Los aislamientos descritos por sus características macro y microscópicas, que luego fueron determinados taxonómicamente mediante la metodología de “*secuenciación y análisis bioinformático*”, fueron comparados con la bibliografía existente, con el fin de relacionar y corroborar esas características observadas con las reportadas. Todos los aislamientos poseen pigmentación, textura, borde y tamaño de colonia, tanto como tinción de gran, similares a los reportados para cada especie, a las 24 horas de cultivo.

Por ejemplo, todos los aislamientos determinados dentro del género *Micrococcus* poseen colonias con pigmentación crema-amarilla, margen entero, crecimiento cóncavo y superficie brillante y con tinción de Gram positivo de células tipo cocos grandes (más grandes que los cocos Gram positivos promedio).

Los aislamientos determinados como *Bacillus spp.* poseen gran diversidad de formas de colonia, donde predominan los aislamientos con colonias de color crema-blanco, margen entera o irregular, crecimiento cóncavo o plano, superficie brillante u opaca y con tinción de Gram positivo de células tipo bacilos que oscilan entre bacilos cortos y sueltos y bacilos en filamentos, alargados.

**Los aislamientos reportados dentro de *Exiguobacterium spp.* poseen pigmentos naranjas, que corresponden a los primeros reportes del género, con morfologías variables entre bacilos y bacilos redondos casi asemejando cocos Gram positivos.**

### **7.1.3.2 Consideraciones para la caracterización taxonómica usando 16s rADN**

Para la determinación taxonómica se usaron los modelos de distancia evolutiva “*Kimura 2-parámetros*” y “*Distancia p*”, y la razón que se tuvo fue que estos modelos tienen en cuenta la probabilidad de las transversiones y transiciones entre purinas y pirimidinas de las secuencias obtenidas, tanto como la diferencia en número de nucleótidos diferentes entre secuencias comparadas. Dado que el marcador genético usado para esta determinación fue el total de la extensión del gen ribosomal 16S ARN, con una longitud de entre 1400 y 1600bp, estos dos modelos

evolutivos logran un estimado de similitud entre las secuencias tipo y la secuencia en estudio, penalizando desde la composición y secuencia del gen amplificado.

La elección de la especie más similar se hizo sobre la comparación preliminar con cepas tipo con las que existiese una similitud inicial sobre el 97%, dado que según el comité ad hoc de sistemática y taxonomía bacteriana, los aislamientos que tengan este porcentaje de similitud con la cepa tipo, pueden ser determinados con ese género y epíteto (Rosselló-móra & Amann, 2015) Luego de esto, la comparación entre la secuencia en estudio y las cepas tipo asociadas se evaluaron con los modelos de distancia evolutiva antes mencionados. Los valores permitidos para realizar la determinación a nivel de especie fueron de nuevo, sobre el 97% de similitud. De los 98 aislamientos bacterianos en estudio, se logró determinar a nivel de especie un total de 69 aislamientos, con porcentajes de similitud entre el 99% y 100% y con valores de Kimura 2-parámetros y Distancia P, entre 0,019 y 0,000. 18 aislamientos fueron determinados hasta especie con un porcentaje de similitud entre el 97% y el 98.9% con valores de Kimura 2-parámetros y Distancia P, entre 0,030 y 0,011. Los 11 aislamientos restantes fueron determinados hasta género, familia orden y clase (siguiendo los parámetros establecidos por el comité ad hoc) con porcentajes de similitud del 96.9% al 86% con valores de Kimura 2-parámetros y Distancia P, entre 0,031 y 0,140.

Para los aislamientos determinados hasta género, y en general para todos los aislamientos caracterizados, se propone complementar la caracterización taxonómica empleando nuevas metodologías, comparando la totalidad del genoma.

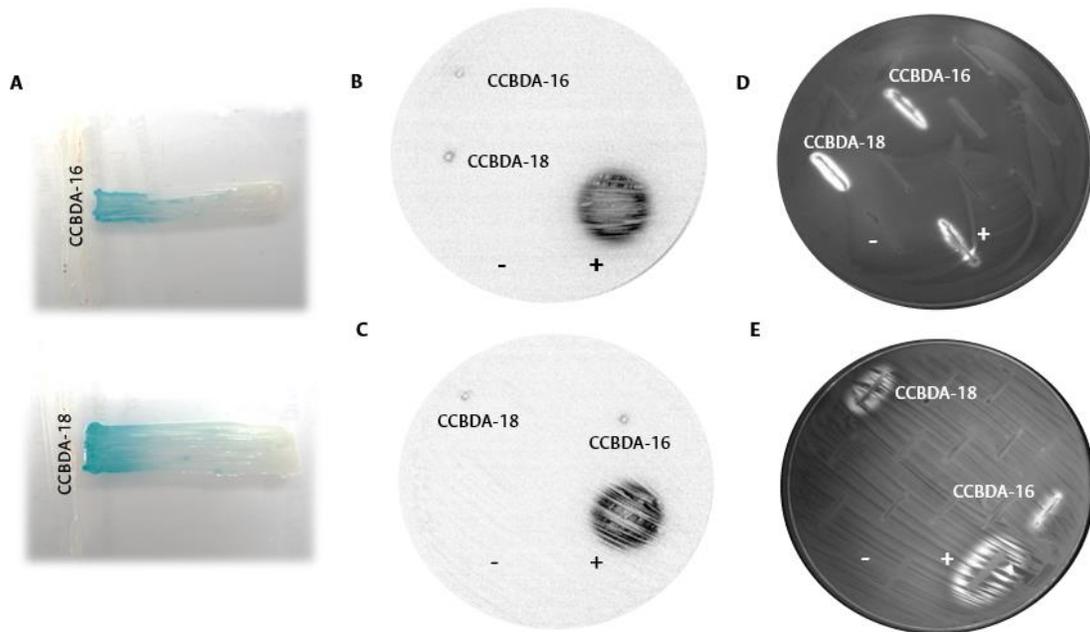
## **7.2 DETECCIÓN DEL FENÓMENO DE *QUORUM SENSING* MEDIADO POR MOLÉCULAS SEÑAL TIPO ACIL HOMOSERÍN LACTONAS (AHLs)**

Las bacterias poseen sistemas de *Quorum Sensing* (QS) que usan moléculas como señales para la activación de expresión de genes en un contexto de comunidad, de una forma regulada. Las Acil Homoserín Lactonas (AHLs) son un grupo de moléculas señal estudiadas ampliamente y la mayoría de sus reportes se ha realizado en bacterias Gram negativas, aunque en la última década se han hecho reportes sobre la producción de estas moléculas por parte de bacterias Gram positivas. Las bacterias asociadas a esponjas marinas con y sin *biofouling* fueron evaluadas para detectar la producción de moléculas señal tipo AHLs, que se unirán a un receptor y este complejo actuará como factor de transcripción para la expresión de algún gen necesario para el desarrollo de la comunidad bacteriana. En estos ensayos, las moléculas señal que produce un aislamiento fueron detectadas por los biosensores de la Tabla 4 (pg. 74) con la especificidad que allí se indica. Los ensayos de siembra en T y de estría sobre biosensor extendido (Figura 6 pg.72) se realizaron por triplicado para todos los aislamientos de las cuatro comunidades bacterianas en estudio usando los seis biosensores reportados.

Del total de los aislamientos de los cuatro grupos, sólo los aislamientos CCBDaBf-16 identificada como *Pseudomonas oceani* y CCBDaBf-18 identificada como *Pseudomonas stutzeri*, dieron positivo a la producción de moléculas tipo AHLs para todos los biosensores excepto CV026 (Figura 20, pg.101), indicando, por la afinidad de los biosensores y la detección específica de las moléculas señal tipo AHLs, estos dos aislamientos pertenecientes a la comunidad de la esponja con *biofouling* *Desmapsamma anchorata* producen moléculas señal del tipo C6-AHL, C8-AHL, C10-AHL y C12-AHL y sus derivados con sustituciones 3-oxo según los rasgos del biosensor (Figura 19, pg.100). Así mismo, la activación de los biosensores por parte de estos dos aislamientos puede ser provocada por la producción de moléculas señal similares a las AHLs como las gamma-butirolactonas (GBLs) que pueden inducir la activación del fenotipo reportero en los biosensores.

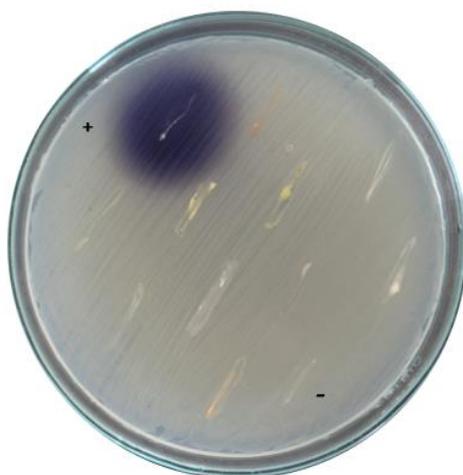
Los otros tres aislamientos identificados como bacterias Gram negativas (CCBDaBf-1, CCBDaBf-15 y CCBDaBf-16) de la especie *Oceanimonas smirnovii*, no indujeron los biosensores usados. En la actualidad no existen reportes de que *O. smirnovii* produzca moléculas de señalización de QS, sin embargo, esta especie puede contar con circuitos que detectan otro tipo de moléculas señal o cuentan con receptores huérfanos para moléculas como las AHLs o GBLs, sin poder expresar la AHL-sintasa responsable de producir este tipo de moléculas señal.

Con estos resultados no se descarta que el resto de los aislamientos en estudio produzcan moléculas de comunicación celular diferentes de las AHLs y las GBLs, como péptidos señal o auto-inductores que no pueden ser detectados por los circuitos mutados de los biosensores usados.



**FIGURA 19. ENSAYOS CON BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS SEÑAL TIPO AHLs POR PARTE DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS CON Y SIN BIOFOULING.**

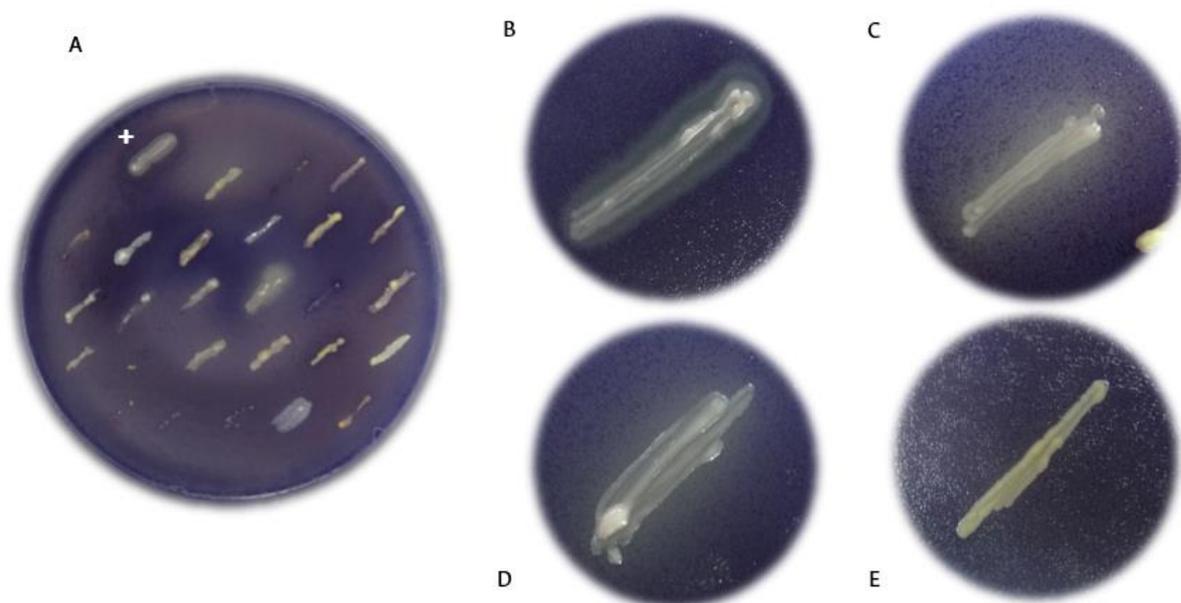
Resultados positivos para CCBDA-16 *Pseudomonas oceani* y CCBDA-18 *Pseudomonas stutzeri* **A.** Resultados positivos de ensayo “en T”. La estría en vertical corresponde al aislamiento en estudio y la horizontal al biosensor pZLR4; **B.** Resultados positivos en ensayo de estría sobre extendido para el biosensor pSB401, con control positivo Pa01; **C.** Resultados positivos en ensayo de estría sobre extendido para el biosensor pSB403, con control positivo Pa01; **D.** Resultados positivos en ensayo de estría sobre extendido para el biosensor w19, con control positivo ISOF; Resultados positivos en ensayo de estría sobre extendido para el biosensor pKRC12, con control positivo ISOF.



**FIGURA 20. ENSAYO DE ESTRÍA SOBRE EXTENDIDO PARA EL BIOSENSOR CV026**

### **7.3 INHIBICIÓN DE LA COMUNICACIÓN BACTERIANA**

En las pruebas de inhibición realizadas para las cuatro comunidades bacterianas cultivables en estudio, se encontraron 25 aislamientos capaces de inhibir la comunicación bacteriana de la cepa ATCC31532 *C. violaceum* evitando que se produzca el pigmento violaceína sin inhibir el crecimiento del biosensor. Los aislamientos positivos para la prueba de inhibición se encuentran registrados en la Tabla 11 (pg.104). En la Figura 21 (pg102) se muestra el montaje general y algunos resultados positivos (fuerte, medio y débil) y negativo obtenidos en este ensayo.



**FIGURA 21. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE QS PARA LOS AISLAMIENTOS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS MARINAS CON Y SIN BIOFOULING.**

**A.** Montaje general de los ensayos de inhibición de QS con la técnica de plaqueo del biosensor ATCC31532 *C. violaceum* y estría de los aislamientos en estudio, control positivo ELB9 *Alcaligenes faecalis* (+); **B.** Resultado positivo (+++) del aislamiento CCBXm2-9; **C.** Resultado positivo (++) del aislamiento CCBXm1-19D; **D.** Resultado positivo (+) del aislamiento CCBXm2-1D; **E.** Resultado negativo (Sin inhibición del QS) del aislamiento CCBXm2-1D.

TABLA 11. AISLAMIENTOS BACTERIANOS QUE MOSTRARON ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL QS PARA LA CEPA BIOSENSORA ATCC31532 *C.VIOLACEUM*

Código aislamiento	Especie más similar	Inhibición de QS
CCBXm1-8	<i>Bacillus paramycoides</i>	++
CCBXm1-18	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	++
CCBXm1-19	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	++
CCBXm1-19D	<i>Bacillus pumilus</i>	++
CCBXm1-22	<i>Bacillus tequilensis</i>	++
CCBXm1-23	<i>Lysinibacillus composti</i>	++
CCBXm1-32	<i>Bacillus pumilus</i>	++
CCBXm2-1	<i>Bacillus cereus</i> **	+
CCBXm2-1C	<i>Bacillus cereus</i>	+
CCBXm2-1D	<i>Bacillus cereus</i>	+
CCBXm2-9	<i>Bacillus praedii</i>	+++
CCBXm2-17	<i>Bacillus cereus</i>	+
CCBXm2-19	<i>Bacillus cereus</i>	+
CCBAiBf-1	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	+
CCBAiBf-5	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	+
CCBAiBf-7	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	+
CCBAiBf-7D	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	+
CCBAiBf-12	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	++
CCBAiBf-12D	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	++
CCBAiBf-14	<i>Bacillus rhizosphaerae</i>	++
CCBAiBf-30	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	++
CCBDaBf-6	<i>Bacillus altitudinis</i>	++
CCBDaBf-10	<i>Bacillus altitudinis</i>	++
CCBDaBf-11	<i>Bacillus altitudinis</i>	+
CCBDaBf-20	<i>Bacillus haikouensis</i>	+++

En la columna "Inhibición del QS", el signo + indica una actividad inhibitoria baja, ++ una actividad inhibitoria media y +++ una actividad inhibidora del QS relevante, con halos de inhibición bien marcados alrededor del aislamiento en estudio. (Reportes visuales de la intensidad de inhibición en la Figura 21, pg. 102)

## 7.4 ANTAGONISMO BACTERIANO

Para evaluar si los aislamientos en estudio producen algún compuesto inhibidor del crecimiento bacteriano sobre otros aislamientos pertenecientes a una misma comunidad, se realizaron ensayos de estría sobre extendido, donde cada aislamiento de la comunidad era extendido en agar LB y sobre este se sembró en estría cada uno de los otros aislamientos de esa misma comunidad. Los aislamientos con capacidad antagónica presentarían un halo alrededor de su estría, mostrando que produce sustancias que bloquean el crecimiento de la bacteria plaqueada. El montaje general de los ensayos de antagonismo se reporta en la Figura 22 (pg.105) y los resultados positivos de distinta intensidad, más el resultado negativo se reportan en la Figura 23 (pg. 105)

En las Tablas de la 12 a la 15 (pg.107 a la 110) se detallan las interacciones antagónicas de cada comunidad bacteriana cultivable, reportando únicamente los aislamientos que realizaron actividad antagónica sobre otros de su comunidad, en la parte superior de cada tabla, aunque los ensayos fueron realizados con el total de la comunidad (Anexo 4). Se realizó un total de 4524 ensayos (cada uno con su triplicado), de los cuales 2162 ensayos correspondieron a los realizados para esponjas sin *biofouling*, donde se reportaron un total de 138 eventos de antagonismo; y, de un total de 2362 ensayos realizados para aislamientos de esponjas con *biofouling*, se reportaron 118 eventos de antagonismo.



**FIGURA 22. MONTAJE GENERAL DE ENSAYOS DE ANTAGONISMO BACTERIANO**

Con técnica de estría sobre extendido usado para todos los ensayos de las cuatro comunidades bacterianas en estudio. (Ensayo para CCBAiBf-1 extendido)



**FIGURA 23. ALGUNOS EJEMPLOS DE RESULTADOS INDIVIDUALES DE ANTAGONISMO BACTERIANO**

A. (en recuadro verde) resultados positivos de diferentes intensidades en actividad antagónica. B. (en recuadro rojo) Resultado negativo, sin halo de inhibición.

**TABLA 12. ENSAYOS DE ANTAGONISMO BACTERIANO DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD DE LA ESPONJA SIN *BIOFOULING XESTOSPONGIA MUTA (Xm1)***

		AISLAMIENTOS QUE PRODUCEN ANTAGONISMO BACTERIANO												
		CCBXm1-1	CCBXm1-8	CCBXm1-10	CCBXm1-18	CCBXm1-19	CCBXm1-19D	CCBXm1-22	CCBXm1-23	CCBXm1-27	CCBXm1-32	CCBXm1-35		
AISLAMIENTOS SUSCEPTIBLES AL ANTAGONISMO BACTERIANO	CCBXm1-1													
	CCBXm1-3													
	CCBXm1-4D													
	CCBXm1-5													
	CCBXm1-6													
	CCBXm1-6D													
	CCBXm1-8													
	CCBXm1-10													
	CCBXm1-11													
	CCBXm1-13													
	CCBXm1-14													
	CCBXm1-16													
	CCBXm1-18													
	CCBXm1-19													
	CCBXm1-19D													
	CCBXm1-20													
CCBXm1-25														
CCBXm1-26														
CCBXm1-27														
CCBXm1-33														

Los aislamientos que producen actividad antagónica sobre los otros de su misma comunidad se encuentran en la parte superior, marcado con el título "Aislamiento que produce antagonismo bacteriano". Los aislamientos que mostraron ser susceptibles a sustancias antagónicas de otros de su comunidad se enlistan en la parte lateral izquierda, marcado con el título "Aislamientos susceptibles al antagonismo bacteriano". En verde, resultado positivo; en azul, enfrentamiento del aislamiento con él mismo (prueba no realizada); en celda vacía, resultado negativo.

**TABLA 13. ENSAYOS DE ANTAGONISMO BACTERIANO DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD DE LA ESPONJA SIN *BIOFOULING XESTOSPONGIA MUTA (XM2)***

		AISLAMIENTOS QUE PRODUCEN ANTAGONISMO BACTERIANO						
		CCBXm2-1C	CCBXm2-1D	CCBXm2-4	CCBXm2-7	CCBXm2-8	CCBXm2-15	CCBXm2-19
AISLAMIENTOS SUSCEPTIBLES AL ANTAGONISMO BAC	CCBXm2-1							
	CCBXm2-1C	■						
	CCBXm2-1D		■					
	CCBXm2-4			■				
	CCBXm2-9							
	CCBXm2-10							
	CCBXm2-11							
	CCBXm2-12							
	CCBXm2-13							
	CCBXm2-14							
	CCBXm2-14D							
	CCBXm2-17							
	CCBXm2-18D							
	CCBXm2-19							■
	CCBXm2-22							
	CCBXm2-23							

La descripción de la tabla corresponde a la realizada en la Tabla 12.

**TABLA 14. ENSAYOS DE ANTAGONISMO BACTERIANO DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD DE LA ESPONJA CON *BIOFOULING APLYSINIA INSULARIS* (AiBf)**

		AISLAMIENTOS QUE PRODUCEN ANTAGONISMO BACTERIANO				
		CCBAiBf-2	CCBAiBf-2D	CCBAiBf-3D	CCBAiBf-10	CCBAiBf-14
AISLAMIENTOS SUSCEPTIBLES AL ANTAGONISMO BACTERIANO	CCBAiBf-1					
	CCBAiBf-6					
	CCBAiBf-7					
	CCBAiBf-7D					
	CCBAiBf-8					
	CCBAiBf-9					
	CCBAiBf-9D					
	CCBAiBf-10					
	CCBAiBf-12					
	CCBAiBf-12D					
	CCBAiBf-17					
	CCBAiBf-17D					
	CCBAiBf-18					
	CCBAiBf-19					
	CCBAiBf-20					
	CCBAiBf-22					
	CCBAiBf-24					
CCBAiBf-27						
CCBAiBf-30						

La descripción de la tabla corresponde a la realizada en la Tabla 12.

**TABLA 15. ENSAYOS DE ANTAGONISMO BACTERIANO DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD DE LA ESPONJA CON *BIOFOULING DESMAPSAMMA ANCHORATA (DABF)***

		AISLAMIENTOS QUE PRODUCEN ANTAGONISMO BACTERIANO							
		CCBDaBf-3	CCBDaBf-5	CCBDaBf-6	CCBDaBf-9	CCBDaBf-10	CCBDaBf-11	CCBDaBf-12	CCBDaBf-20
AISLAMIENTOS SUSCEPTIBLES AL ANTAGONISMO BACTERIANO	CCBDaBf-2								
	CCBDaBf-3								
	CCBDaBf-5								
	CCBDaBf-13								
	CCBDaBf-13D								
	CCBDaBf-15								
	CCBDaBf-22D								
	CCBDaBf-26								
	CCBDaBf-28								
	CCBDaBf-29								

La descripción de la tabla corresponde a la realizada en la Tabla12.

## VIII. DISCUSIÓN

Las esponjas marinas son a la fecha, el animal más antiguo del planeta del que se tiene registro vivo (Li *et al.*, 1998). Estos organismos, simples en su estructura y con poca complejidad tisular, han compensado su simpleza realizando asociaciones mutualistas con microorganismos tales como bacterias y microalgas (Simister *et al.*, 2012; Webster & Taylor, 2012). Con esta microbiota asociada, las esponjas han podido sortear un gran número de dificultades ofrecidas por su entorno, obteniendo nutrientes que no serían asimilables por ella misma. Así mismo, reciben protección contra la radiación solar y adquieren elementos de defensa producidos directamente por el consorcio bacteriano, para evitar la depredación y el asentamiento de organismos patógenos (Webster & Thomas, 2016). Se sabe que, del total del peso seco de la esponja, un 35% corresponde a la microbiota simbiote, estructurada como un *biofilm* bacteriano, que está distribuida a lo largo del organismo entre el mesohilo, las cámaras de coanocitos y la superficie (Webster & Thomas, 2016). En esa biopelícula convergen no sólo las bacterias simbiotes sino un gran número de moléculas que se encuentran involucradas en procesos de comunicación, transporte, señalización y soporte, haciendo que el micronicho bacteriano sea cada vez más complejo, que se regule, se sincronice y module la composición y participación de cada población bacteriana asociada, con el fin último de mantener la homeostasis del holobionte (Pita *et al.*, 2016). Cuando las comunidades bacterianas pierden esa estructura y composición, muchos microorganismos empiezan a dominar el consorcio, agregando al *biofilm* nuevos compuestos producto de su metabolismo, que, sin estar regulados, promueven el asentamiento de otras bacterias, dentro de las cuales podrían colonizar algunas que induzcan un desequilibrio en la homeostasis del holobionte. Este evento de restablecimiento de la composición de la comunidad bacteriana también puede permitir la colonización de organismos de orden superior como algas, moluscos, crustaceos y cnidarios, y puede modular dentro de ellos procesos de nutrición y metamorfosis, otorgando a los nuevos participantes, elementos nutricionales y señales químicas y ecológicas que en otro nicho no podrían conseguir (Dahms & Dobretsov, 2017). El evento anteriormente descrito, donde existe una colonización y establecimiento gradual de

eucariotas superiores ha sido denominado *biofouling* o epibiosis, y sobre este fenómeno existe una discusión dentro de la comunidad académica que evalúa si se trata de un beneficio o un proceso perjudicial para el hospedero: mientras que algunos autores afirman que el *biofouling* se trata de una enfermedad en la que el hospedero pierde superficie y por tanto pierde actividad filtradora, mientras sus bacterias fotosintéticas pierden la capacidad de hacer autotrofia (indispensable para el ciclo del carbono del holobionte); otros autores afirman que la formación de *biofouling* provee al ecosistema arrecifal, además de nutrientes y defensa, un área donde organismos pertenecientes al nicho, pueden madurar y fortalecerse antes de colonizar su sustrato final lejos de la epibiosis. Este evento constituye un factor importante para el mantenimiento del ecosistema arrecifal, cooperando en la manutención de la diversidad marina (Kelly *et al.*, 2003; Kirschner & Brennan, 2012). **Con las dos posturas anteriormente descritas, en este trabajo comprendemos el *biofouling* como un evento importante para el mantenimiento de la ecología de los ecosistemas arrecifales, y que, con un nivel de ocurrencia moderado (que implica la pérdida de algunos individuos sin alterar la estabilidad de la población), puede proveer al ecosistema de ciertos organismos actores que mantienen equilibrada la cadena trófica arrecifal, sin poner en riesgo los servicios ecosistémicos que proveen esponjas y corales.**

La otra postura es la que se tiene a nivel industrial, donde el *biofouling* significa un problema económico y ecológico mayor, pues se convierte en un riesgo para las estructuras sumergidas, al producir corrosión y debilitamiento de los materiales, mientras es el hogar de algas y moluscos, que con una fuente de nutrientes tan alta como la ofrecida por las actividades antropológicas, pueden convertirse en especies invasoras, capaces de desestabilizar el equilibrio de los ecosistemas costeros, bentónicos y arrecifales. Esto justifica en muchos casos la inversión económica para el reconocimiento de los procesos de formación de *biofouling* a fin de desarrollar metodologías que puedan controlarlo (Schultz *et al.*, 2011).

Así, el conocimiento sobre la ecología que modula la formación del *biofouling* y su impacto sobre el ecosistema coralino y sobre estructuras industriales, es trascendente para generar sistemas bio-ecológicos que abarquen todos los

elementos que participan. Particularmente, el conocimiento de las comunidades bacterianas asociadas a corales y esponjas permite realizar aproximaciones a los procesos e interacciones que estos microorganismos llevan a cabo, a fin no solo de maravillarnos con la complejidad que estas comunidades alcanzan y sus relaciones con el resto del ecosistema, sino poder comprender cómo el mantener en equilibrio esos consorcios simbiotes es tan importante para el bienestar del hospedero y del complejo marino. Además, una caracterización a los microorganismos de estos simbiotes y de sus perfiles metabólicos que les permiten relacionarse en comunidad, se convierte en una fuente de información sobre compuestos activos de interés farmacológico e industrial ya que todas estas moléculas pueden llegar a ser una nueva una nueva opción para tratamientos en infecciones bacterianas y como mecanismos preventivos para la formación de estructuras complejas como la epibiosis sobre elementos sumergidos como puertos, navíos y emisarios submarinos.

Esta investigación ofrece información acerca de algunas especies bacterianas cultivables asociadas a esponjas marinas del caribe colombiano de los géneros *Xestospongia*, *Desmapsamma* y *Apysina*, con y sin epibiosis en su superficie, evaluando su capacidad de realizar QS vía moléculas señal tipo AHL, su capacidad de producir inhibición de la comunicación bacteriana y de producir sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano, como fenómenos sobresalientes en el proceso de modulación del consorcio bacteriano. Una aproximación a la composición de la microbiota y de los perfiles metabólicos antes mencionados para cada aislamiento obtenido, expone la complejidad de eventos en los que participan estos microorganismos a nivel de comunidad. Permitiendo, además, tenerlos aislados en laboratorio y catalogados en el cepario del grupo de investigación CCB para futuras investigaciones y caracterizaciones de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico e industrial. La comparación entre las comunidades bacterianas cultivables y el número de eventos de comunicación bacteriana, inhibición del QS y antagonismo bacteriano, puede ofrecer información de la identidad taxonómica de las bacterias con esta capacidad y si cambian en nivel de ocurrencia, explicando así la presencia o ausencia del *biofouling*, que sólo puede

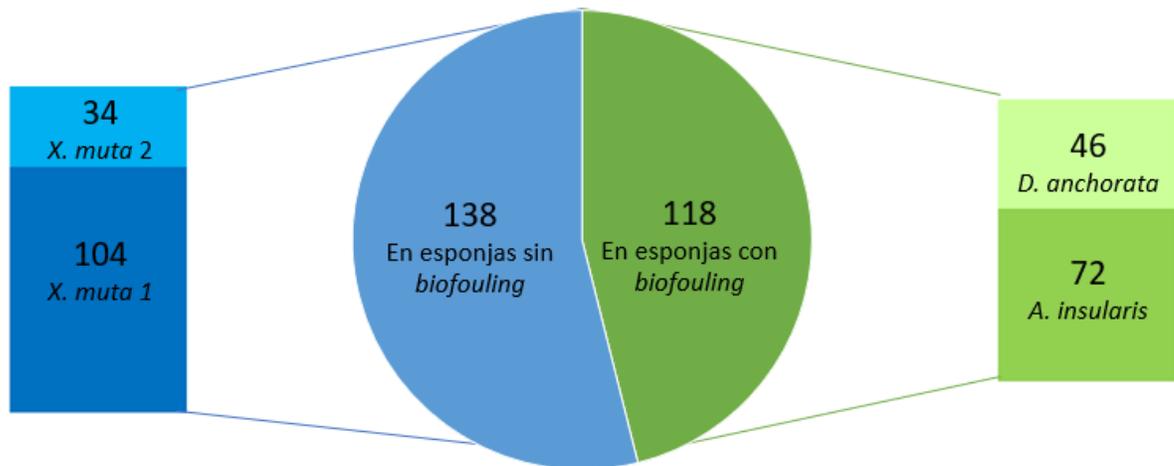
existir en presencia de un *biofilm* maduro y “permisivo” que provea de sustrato para otros organismos eucariotas en la superficie del hospedero.

Con la selección de los fenotipos descritos en este estudio (inhibición de QS, antagonismo bacteriano dentro del mismo consorcio y producción de moléculas señal de QS tipo AHLs), que se consideran relevantes para la estructuración y modulación del consorcio, se podría postular la hipótesis de que estos eventos de selección y de regulación de la comunicación existen en mayor número sobre las esponjas marinas sin *biofouling*, haciendo que no puedan dominar las especies bacterianas necesarias para la maduración del *biofilm* y la consecuente formación de epibiosis. Pero nuestros resultados muestran un número similar de eventos de antagonismo e inhibición de la comunicación bacteriana para las comunidades bacterianas cultivables asociadas a esponjas marinas tanto con epibiosis como con ausencia de ella, resaltando que estas estructuras son el resultado de relaciones dentro de la comunidad en las que están vinculados todos los organismos y los controles de la expresión genética que genera el nicho en el que habitan.

Con un total de 138 eventos de antagonismo por parte de 47 aislamientos asociados a esponjas sin *biofouling* más un total de 12 aislamientos con actividad inhibidora de QS pertenecientes a este grupo; y un total de 118 eventos de antagonismo por parte de 49 aislamientos asociados a esponjas con *biofouling* y 13 aislamientos con actividad inhibidora de QS pertenecientes a este grupo, es claro que no existe una diferencia estadísticamente significativa que determine que existe mayor actividad antagónica y de inhibición del QS para alguno de los dos grandes grupos. Estos hallazgos son importantes porque demuestran que estos fenotipos relevantes para la ecología del holobionte se encuentran en bacterias participantes de ambos nichos (con y sin epibiosis), pero que deben ser regulados por el contexto de comunidad, que modula también la presencia e intensidad con la que estas bacterias se desarrollan y producen sustancias antagónicas y bloqueadoras de la comunicación bacteriana. Cabe anotar que esta comparación entre los dos grandes grupos (con y sin epibiosis), se hace para evidenciar el nivel de ocurrencia de los fenotipos en estudio, sin que esto signifique que se desconoce que cada individuo porífero tenga

su comunidad bacteriana particular, situación que ha sido descrita en numerosos estudios de caracterización de comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas del mundo (Hentschel *et al.*, 2012; Kiran *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2016).

El número total de ensayos de antagonismo realizados y el número total de eventos de inhibición comparadas entre las cuatro comunidades bacterianas en estudio se encuentran descritos en la Figura 24. (pg. 114)



**FIGURA 24. COMPARACIÓN ENTRE EVENTOS DE ANTAGONISMO DE COMUNIDADES BACTERIANAS CON Y SIN BIOFOULING**

A lo largo de esta discusión expondré las especies bacterianas sobresalientes en ambos nichos con capacidades antagónicas e inhibidoras de la comunicación bacteriana, evaluando con los antecedentes bibliográficos, su posible papel dentro del consorcio y la forma en cómo pueden actuar como reguladores del sistema biológico al que pertenecen. Durante la descripción de estas especies bacterianas relevantes, se discutirá también el papel que tienen algunas de ellas al encontrarse en dos nichos diferentes y como frente al contexto de comunidad que afrontan, pueden modificar su comportamiento.

Tras la determinación taxonómica de los 96 aislamientos bacterianos asociados a esponjas marinas con y sin *biofouling*, se observó que los filos más dominantes dentro de las comunidades cultivables estudiadas son *Firmicutes*, *Actinobacteria* y

en muy baja abundancia, el filo *Proteobacteria*. Para la comunidad bacteriana cultivable asociada a los dos individuos sin *biofouling* determinados parcialmente como *Xestospongia muta* Xm1 y Xm2, se obtuvo un total de 45 aislamientos: para Xm1 se tienen 24 aislamientos de los cuales un 50% corresponden al filo *Firmicutes*, un 46% al filo *Actinobacteria* y un 4% al filo *Proteobacteria* (Clase *Alfaproteobacteria*); mientras que para Xm2, de un total de 23 aislamientos, 65% corresponden al filo *Firmicutes*, mientras un 35% al filo *Actinobacteria*.

Con el total de la información colectada tanto por los experimentos desarrollados como por la bibliográfica consultada de las especies bacterianas relevantes dentro del consorcio de cada grupo en estudio, se elaboraron cuatro modelos donde se relacionan los eventos de antagonismo, susceptibilidad a la actividad antagónica, inhibición del QS y perfiles bioquímicos de interés para la formación de *biofilm*, imprescindible para la conformación de *biofouling*. Lo anterior permitió proponer relaciones que permitan explicar cómo pueden estar influyendo, en alguna medida, el antagonismo y el *Quorum Sensing* en la existencia de esponjas con y sin epibiosis en la superficie.

Para la elaboración de estos modelos se correlacionaron los eventos de antagonismo con los eventos de susceptibilidad al antagonismo, dándoles valores entre 0 y 1 a cada especie bacteriana para cada variable, conforme a la frecuencia relativa de ambos eventos dentro del consorcio bacteriano, usando las tablas 12, 13, 14 y 15 (pg. 107 a la 110). Además, se marcaron con color las especies con actividad inhibitoria del QS. La distribución de las especies en la gráfica se correlacionó con el evento de maduración y desestabilización del *biofilm*, permitiendo establecer en qué casos la regulación mediante el antagonismo, la inhibición del QS, y la susceptibilidad a ser inhibido por sustancias antagónicas, podrían ser características responsables de la ausencia o presencia de *biofouling* en el porífero.

## 8.1 COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS SIN BIOFOULING

La evaluación de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas sin *biofouling* o epibiosis se realizó sobre dos individuos del género *Xestospongia muta*, denominados *X. muta* Xm1 y *X. muta* Xm2.

Los estudios realizados sobre comunidades bacterianas asociadas a este género de esponja han usado metodologías independientes de cultivo, permitiendo hacer un conteo de OTUs que revela la abundancia de ciertos organismos cultivables o no, dentro de la muestra de la esponja. **Esta investigación es la primera en el mundo en evaluar la composición de las comunidades bacterianas cultivables asociadas a esponjas del caribe colombiano, que además incluye la descripción de fenotipos importantes para la regulación del consorcio simbiote.** Esta investigación generó evidencia experimental e individualizada de los aislamientos obtenidos con la oportunidad de almacenarlos para futuros propósitos académicos y de investigación en el área industrial.

Los reportes por métodos independientes de cultivo de comunidades bacterianas asociadas a esponjas del género *Xestospongia* revelan una composición donde dominan las *Proteobacterias*. Los reportes que se tienen para otras especies de este género de poríferos no tienen un consenso, que es prueba de que la composición de la comunidad bacteriana asociada varía de acuerdo con condiciones como la especie de porífero, la distribución geográfica y los cambios fisicoquímicos del nicho; modulando la abundancia y riqueza de las poblaciones bacterianas asociadas (de Voogd *et al.*, 2015; Fiore *et al.*, 2015). Particularmente para la especie *Xestospongia muta* se ha estudiado la composición de sus consorcios bacterianos en individuos distribuidos en la Florida y las Bahamas, reportando al filo *Proteobacteria* como grupo dominante, mientras los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria* cambian en abundancia respecto al individuo estudiado (de Voogd *et al.*, 2015)

No existen reportes de comunidades bacterianas cultivables asociadas a este género y por tanto no se puede realizar una comparación entre esos antecedentes y los resultados obtenidos en esta investigación. A continuación, serán descritas las

comunidades asociadas a esponjas marinas sin *biofouling* pertenecientes a la especie *X. muta*:

En *Xestospongia muta* Xm1 sobresalen las siguientes especies por su perfil bioquímico y actividad inhibitoria del QS y antagónica sobre otros aislamientos de su mismo nicho, configurándolas como reguladoras potenciales del consorcio en el que participan:

***Bacillus firmus***, una bacteria aerobia estricta alcalófila, ha sido aislado principalmente de tejidos vegetales (como el Sándalo rojo y el fruto de las plantas del género *Loffa*, conocido popularmente como estropajo) y de suelos francos asociados a cultivos (Aslim, Saglam, & Beyatli, 2002; Pazzetto, *et al.*, 2011; Rajesh & Ravishankar Rai, 2014); pero también se tienen reportes de cepas aisladas de desechos marinos, principalmente plásticos (Annamalai, *et al.*, 2014; Iyer, Mody, & Jha, 2005). De este microorganismo se han descrito numerosas propiedades, por ejemplo, la asimilación de Fipronil, un insecticida de amplio espectro usado principalmente en cultivos de arroz (Mandal *et al.*, 2014). Además, *B. firmus* es capaz de secuestrar iones de hierro y zinc en soluciones acuosas, mediante sideróforos, pigmentos accesorios denominados factores de virulencia (Iyer *et al.*, 2005). De *B. firmus* se conoce además que tiene actividad antagónica contra *Micrococcus flavus*, una especie muy común de las comunidades bacterianas de esponjas y corales (Aslim *et al.*, 2002). El perfil bioquímico que posee *B. firmus* lo hace ser un candidato importante en el papel de la modulación de otras especies bacterianas, regulando la disponibilidad de iones metálicos indispensables para la formación de algunas proteínas asociadas a los procesos de respiración, además de controlar el desarrollo de actinobacterias abundantes en los consorcios bacterianos asociados a poríferos. Aunque se reporta actividad inhibidora del QS por parte de esta especie bacteriana, no detectamos esta actividad frente al biosensor *C. violaceum* ATCC31532. **En este estudio, reportamos por primera vez la actividad antagónica de *B. firmus* frente a dos aislamientos de su misma comunidad determinados como *B. qingshengii* y del género *Leisfonia sp.*** También se encontró que el total de los aislamientos del grupo *X. muta* Xm1 que presentaron actividad antagónica producen sustancias que bloquean el crecimiento

de *B. firmus*, siendo un candidato sobre el que se ejerce una alta regulación dentro del consorcio bacteriano.

***B. qingshengii***, aislada de rocas marinas erosionadas en el borde costero de Jiangxi, China, es una bacteria aerobia que posee un metabolismo multifuncional donde puede usar un gran número de carbohidratos como fuente de carbono, además de ser oxidasa positivo, y tener la capacidad de degradar caseína. De este microorganismo existe un único reporte y es el que define como nueva especie, en el año 2014 (Xi, *et al.*, 2014). Nosotros presentamos a *B. qingshengii* como participante del consorcio bacteriano asociado a *X. muta* sin *biofouling*. Esta bacteria es susceptible a sustancias antagónicas producidas por bacterias de su mismo consorcio, en su mayoría del género *Bacillus* (Tabla 12, pg.107).

***B. zhangzhouensis***, una bacteria aerobia estricta, fue aislada y caracterizada por primera vez de acuacultivos de camarones en Zhangzhou, China (Liu *et al.*, 2018). También existen reportes de esta bacteria en lagos hipersalinos en Rumania (Ruginescu *et al.*, 2018). Esta bacteria esporula y puede usar un amplio rango de carbohidratos como fuente de carbono. De esta bacteria se ha descrito a la fecha únicamente su actividad celulasa. **Nosotros reportamos a *B. zhangzhouensis* como un participante del consorcio bacteriano en *X. muta* sin *biofouling* Xm1, con una altísima actividad antagónica sobre aislamientos de su propio nicho, principalmente del género *Bacillus* y *Micrococcus* (Tabla 12, pg.107). Además, demostramos por primera vez su actividad inhibitoria de QS sobre el biosensor *C. violaceum* ATCC31532. *B. zhangzhouensis* ejerce antagonismo particularmente sobre *B. haikouensis* y *B. paramycoides*, dos especies bacterianas con actividad antagónica media sobre la comunidad de *X. muta* Xm1. Además, esta especie es susceptible a las sustancias antagónicas de *B. tequilensis*, una especie bacteriana que podría estar actuando como súper-regulador, de especies como *B. zhangzhouensis*, modulando su actividad antagónica frente al resto del consorcio.**

***B. pumilus***, una bacteria anaerobia facultativa, ha sido ampliamente reportada en numerosos nichos dentro de los que se encuentran el suelo, la rizósfera de plantas como *Alnus glutinosa*, un árbol distribuido por Europa y Asia, conocido como Aliso, (Abbas & Amran, 2018; Altinyay, *et al.*, 2015; Aslim *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2013;

Ziganshina, *et al.*, 2018). También hay reportes de *B. pumilus* en el mar, principalmente asociado con sedimentos, contenido intestinal de peses y en corales (Y. Liu *et al.*, 2013; Nithya *et al.*, 2010). Esta bacteria cosmopolita posee numerosas sustancias con actividades sobresalientes a nivel industrial y clínico, como la actividad inhibitoria de Aflatoxinas producidas por *Aspergillus parasiticus*, la inhibición del QS asociado a factores de virulencia de bacterias patógenas y la producción de antibióticos, como la Pumilina (Aslim *et al.*, 2002; Nithya *et al.*, 2010; Praveen Rao, Sashidhar, & Subramanyam, 1998; Santhi *et al.*, 2017) . **En esta investigación confirmamos la actividad inhibidora de QS y además reportamos actividad antagónica sobre otras bacterias de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* y *Kocuria*.** El perfil bioquímico que reportan de esta especie bacteriana (junto a la obtenida en nuestra investigación), **la hace una potencial moduladora del consorcio bacteriano**, inhibiendo la comunicación de otras bacterias del consorcio que pueden desestabilizar la homeostasis del holobionte, así como modulando el asentamiento y proliferación de bacterias promotoras de la maduración de biopelículas. *B. pumilus* es susceptible a sustancias inhibitoras del crecimiento sobre bacterias de su consorcio de los géneros *L. composti*, *B. paralicheniformis* y *M. foliorum*, tres especies reportadas como altamente antagónicas sobre el resto de su comunidad. Lo anterior es muestra de la jerarquización en la regulación del aumento en densidad poblacional por parte de algunas especies bacterianas, en presencia de especies súper-reguladoras, como las anteriormente mencionadas y que serán bien descritas a continuación.

***Lysinibacillus composti***, es una bacilo Gram negativo, aerobio con capacidad de metabolizar nitratos hasta nitrógeno molecular, produce esporas y es catalasa positivo (Hayat, Ahmed, & Paek, 2014). Esta especie fue aislada por primera vez de compostaje y se del género se tienen dos reportes de actividad inhibitoria de QS, asociada a la producción de lactonasa (Garge & Nerurkar, 2016; Gómez-Garzón & Dussán, 2017). En este estudio corroboramos la actividad inhibitoria de la comunicación bacteriana sobre el biosensor *C. violaceum* ATCC31532 para nuestra cepa de *L. composti*, convirtiéndose en el primer reporte de esta especie como inhibidora de QS, muy probablemente mediado por lactonasa.

*L. composti* es antagónico sobre especies de antagonismo medio como *B. haikouensis*, *B. firmus*, *B. paramycoides* y sobre *B. pumilus*, que es considerada como fuerte regulador del consorcio, gracias a su actividad antagónica sobre una gran cantidad de aislamientos del consorcio bacteriano de *X. muta* Xm1. **Dentro del consorcio, ningún aislamiento produce sustancias antagónicas sobre *L. composti*.**

Además de los *Bacillus* antes descritos, dentro de la comunidad bacteriana asociada a *X. muta* sin *biofouling* Xm1, sobresalen *Actinobacterias* como *Microbacterium foliorum*, por ser antagonista de un gran número de aislamientos bacterianos pertenecientes a su mismo nicho, de los géneros *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Dietzia* y *Micrococcus*.

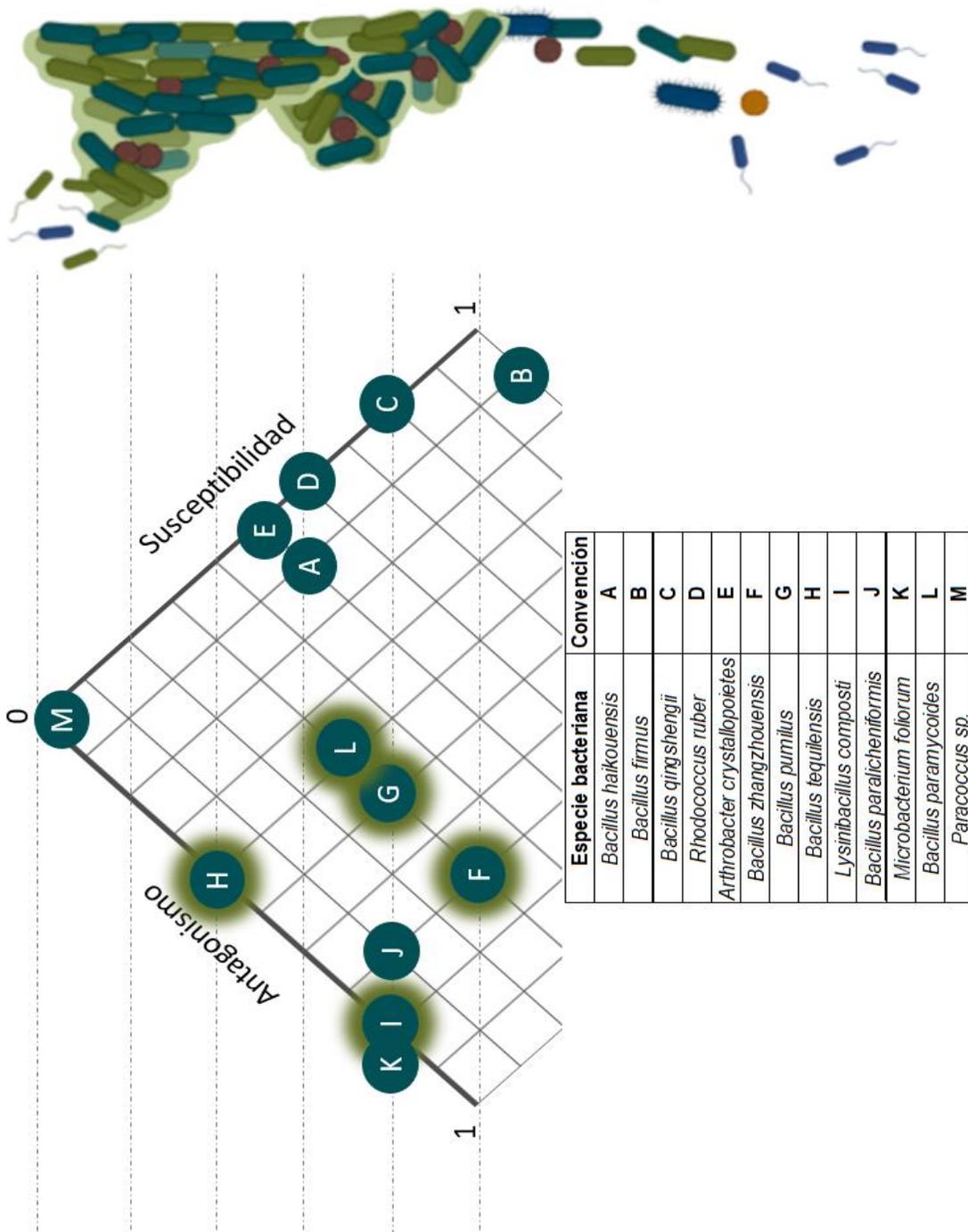
***Microbacterium foliorum*** es una bacteria aerobia estricta, con aislamientos reportados de un glaciar en el Himalaya, India y de la filósfera de pastos de la Universidad de Pittsburg, Estados Unidos. Es motil y puede fermentar una gran variedad de carbohidratos, además de tener actividad amilasa. **En esta investigación se encontró que *M. foliorum* tiene actividad antagónica sobre un gran número de aislamientos pertenecientes a su mismo consorcio, incluso sobre *B. pumilus*, *B. haikouensis*, *B. paramycoides*, *B. paralicheniformis* y *B. firmus***, que también poseen actividad antagónica; **además de esto, ningún aislamiento de su consorcio tiene capacidad antagónica sobre *M. foliorum*** (Tabla 12, pg.107). Lo anterior es muestra de que, dentro de un consorcio bacteriano, las especies que desarrollan antagonismo pueden ser susceptibles a otras sustancias antagónicas de reguladores superiores en un modelo jerárquico que busca equilibrar las interacciones de modulación e inhibición de otras poblaciones bacterianas.

***Rhodococcus ruber***, otra *Actinobacteria* aislada de *X. muta* sin *biofouling* Xm1, reporta capacidades metabólicas y de relaciones sociales, importantes para comprender su actividad dentro del consorcio. Esta especie fue reportada por última vez en 2015, siendo aislada del mar de Bering, en el pacífico ruso. Es ureasa positivo y degrada la gelatina (Hwang *et al.*, 2019). Además, ha sido descrita como una bacteria capaz de formar *biofilm* y producir biosufractantes, que son sustancias

capaces de emulsificar, dispersar y solubilizar compuestos acuosos, y como actividad importante para la industria, *R. ruber* degrada el plástico (Gilan, Hadar, & Sivan, 2004; Dunbar *et al.*, 2002). Con este perfil *R. ruber* puede actuar en la formación del *biofilm*, impidiendo que otras sustancias inhibidoras de este fenotipo, acaben con la formación de la estructura de la biopelícula hecha principalmente de EPS. **Nosotros reportamos que, en este consorcio, *R. ruber* es susceptible a sustancias promotoras de antagonismo bacteriano producidas por *B. zhangzhouensis*** una de las bacterias con mayor actividad antagónica e inhibidora del QS de esta comunidad cultivable. Este es un ejemplo de cómo bacterias con mayor capacidad de regulación, evitan que estructuras tan necesarias para la formación de *biofouling* como las biopelículas, maduren y sean sustrato de nuevos eucariotas colonizadores.

La única *Proteobacteria* encontrada para la comunidad bacteriana asociada a *X. muta* sin *biofouling* Xm1, que fue identificada hasta género como *Paracoccus sp.* CCBXm1-26, tienen varios reportes de producción de moléculas de comunicación celular tipo AHL (Gutierrez *et al.*, 2019; Saurav, *et al.*, 2016). En nuestra investigación, usando toda la batería de biosensores reportados en la metodología, no detectamos producción de estas moléculas señal. Con los resultados obtenidos no se puede aseverar que este aislamiento no sea capaz de producir estas moléculas de QS, porque es probable que las produzca a una concentración tan baja como para no ser detectadas por los biosensores usados.

## Promoción de la formación de *biofilm*



**FIGURA 25. MODELO DE RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, SUSCEPTIBILIDAD E INHIBICIÓN DE QS PARA ESPECIES BACTERIANAS RELEVANTES EN LA COMUNIDAD ASOCIADA A *X. MUTA* Xm1 SIN BIOFOULING (MODIFICADO DEL DIAGRAMA DE CLIMATOLOGÍA DE HOLDRIDGE)**

Los valores asignados a cada aislamiento con respecto al antagonismo y susceptibilidad se obtuvieron a partir de la frecuencia relativa de cada uno de los eventos, así: **Antagonismo:** Número de aislamientos hacia los que dicha especie ejerce antagonismo, sobre el total de los aislamientos susceptibles al antagonismo; **Susceptibilidad:** Número de aislamientos que ejercen antagonismo hacia dicha especie, sobre el total de aislamientos con actividad antagónica. A la derecha de la imagen un dibujo general de la formación del *biofilm*, donde esquematiza la maduración de la biopelícula (superior derecha) y la desestabilización de esta estructura (inferior derecha). **En verde alrededor de los puntos:** actividad inhibidora de QS, comprobada experimentalmente. La distribución de las especies bacterianas relevantes para este consorcio sobre el esquema revela que los perfiles antagónicos y la regulación que se ejerce sobre algunas especies promueven un ambiente altamente regulado que inhibe el desarrollo del *biofilm*, manteniendo desprovisto de *biofouling* la superficie de la esponja.

En la Figura 25, pg.122 se muestra modelo descrito a través de un triángulo de composición en el que se modelaron algunas relaciones entre los aislamientos de esta comunidad, construido con base en los diagramas De Finetti (Fonteneau, *et al.*, 2010; Ineichen & Batschelet, 1975), y siguiendo el mecanismo de clasificación de zonas de vida de Holdridge (Post, Zinke, & Stangenberger, 1982; Tatli & Dalfes, 2015). Para la construcción del modelo se definieron los parámetros de los eventos de la siguiente manera: Por ejemplo, en el caso de *B. paramycoides* (L) el antagonismo corresponde al número de aislamientos sobre los que *B. paramycoides* ejerce antagonismo, sobre el total de los aislamientos susceptibles a cualquier antagonismo de la comunidad ( $8 \text{ aislamientos} / 19 \text{ aislamientos} = 0.4$ ) La susceptibilidad corresponde al número de aislamientos que ejercen antagonismo sobre *B. paramycoides*, sobre el total de aislamientos que ejercen actividad antagónica dentro de la comunidad ( $3 \text{ aislamientos} / 10 \text{ aislamientos} = 0.3$ ). Con los valores obtenidos es posible darle ubicación espacial a cada aislamiento dentro del área del triángulo de composición.

La información antes descrita para la comunidad bacteriana asociada a *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, junto al modelo gráfico propuesto (figura 25 pg.122), mostraron que las especies bacterianas con alta actividad antagónica son las menos reguladas del consorcio, al no ser sensibles a ninguna sustancia inhibidora del crecimiento producida por especies asociadas a su comunidad. Son estas mismas especies

altamente antagónicas las que participan en la no-maduración de las biopelículas, al regular el crecimiento poblacional de muchas especies que son formadoras potenciales de *biofilm*. Además, las especies altamente antagónicas también muestran, en su mayoría, capacidad inhibidora de QS, lo que fortalece la idea de que una altísima regulación dentro del consorcio, ejercida por estas especies bacterianas, no permite que la comunidad se establezca, aumente en densidad poblacional y produzca sustancias indispensables para la formación del *biofilm*, evitando así la formación de *biofouling*.

El fenómeno anterior se coincide con la distribución de las especies con actividad antagónica baja, que están acompañadas de una alta susceptibilidad a especies antagónicas de su consorcio, y que poseen perfiles metabólicos importantes para la formación de las biopelículas como la producción de exopolisacáridos, versatilidad en el uso de carbohidratos y puesta en disposición de compuestos metabólicos de interés para el consorcio. Estas especies, aunque relacionadas con un alto potencial de formación de *biofilm*, se encuentran bajo la regulación de especies altamente antagónicas y con capacidad inhibidora del QS, interfiriendo con el aumento en su población y la posterior manifestación de estos fenotipos promotores del *biofilm*.

Todo lo anterior podría explicar una de las formas en las que las comunidades bacterianas regulan su nicho a fin de inhibir la propagación de especies que podrían fortalecer las biopelículas e incluso promover el asentamiento de organismos eucariotas.

Un caso particular observado en el modelo es el del aislamiento del género *Paracoccus* sp. En la gráfica, este aislamiento no realiza antagonismo ni es susceptible a ser inhibido, pero posee un perfil metabólico descrito en bibliografía que lo hace un actor sobresaliente en la formación de *biofilm*, como lo es la producción de EPS y la comunicación vía AHLs. El modelo permite visualizar que este aislamiento aún con todas sus capacidades para formar biopelícula participa en un consorcio donde no se ha madurado esta estructura, mostrando que deben existir otros actores dentro del consorcio que regulen su actividad, así como deben existir otras vías de regulación diferentes a las descritas, que complejizan la modulación de la comunidad para mantenerla desprovista de *biofouling*

Para *X. muta sin biofouling Xm2*, existe un total de 6 especies bacterianas únicas de esta comunidad cultivable. Cinco de estas corresponden al género *Bacillus* y la especie restante corresponde a *Pseudonocardia carboxydivorans*, del filo *Actinobacteria*. De esta comunidad sobresalen las siguientes especies por su alta actividad antagónica e inhibidora del QS:

*B. cereus*, ha sido una especie bacteriana muy estudiada, hasta considerarse un grupo al que pertenecen varias subespecies, que difieren entre ellas por sus perfiles bioquímicos (Liu, *et al.*, 2019). En el contexto marino, *B. cereus* se ha reportado en desechos plásticos marinos, esponjas, peces, sedimentos y del cuerpo de agua bentónico (Liu *et al.*, 2017; Orsod, Joseph, & Huyop, 2012). De este género se han descrito numerosos compuestos activos como inhibidores de comunicación bacteriana y antibióticos, como Cerexina y Zwittermicina, que actúan como antagónicos sobre bacterias de interés clínico (Kerekes *et al.*, 2013; Santhi *et al.*, 2017). En este estudio reportamos tres aislamientos pertenecientes únicamente al grupo asociado a la esponja *X. muta Xm2*, con actividad antagónica sobre *B. subterraneus*, (del que se tiene reporte de producción de sideróforos secuestradores de hierro) y que pueden inhibir la comunicación bacteriana en el biosensor ATCC31532. Frente a *B. subterraneus*, *B. cereus* puede actuar como un regulador de la producción de sideróforos, inhibiendo la proliferación de esta bacteria en el consorcio, reduciendo la probabilidad de que sincronice la producción de este factor de virulencia, que se sabe, está relacionado directamente con eventos de comunicación bacteriana (Popat *et al.*, 2017). Este evento puede ser reafirmado por la actividad inhibitoria de QS, que bloquea la comunicación entre bacterias del consorcio, lo que concluye con la no activación de fenotipos regulados por el contexto social, que, además, promueven la maduración del consorcio asociado al *biofilm* de la esponja. De forma reiterativa, estos eventos de inhibición en la comunicación celular impiden la maduración del *biofilm*, necesaria para la formación de epibiosis. Así, una forma de evitar la formación de *biofouling* y la degradación de tejido asociado a algún patógeno, puede ser la estricta regulación a nivel antagónico

y de inhibición del QS que no permite que el consorcio se complejice y deje ingresar nuevas especies con efectos perjudiciales para el holobionte.

Es importante incluir que no todos los aislamientos determinados como *B. cereus* tuvieron actividad antagónica sobre otros aislamientos de su comunidad, y actividad inhibidora del QS. Los aislamientos positivos para antagonismo fueron CCBXm2-1C, CCBXm2-1D y CCBXm2-19, mientras los positivos para inhibición de QS fueron además de los anteriores mencionados CCBXm2-1 y CCBXm2-17. El aislamiento restante CCBXm2-23 no presentó resultado positivo para ensayos de antagonismo e inhibición de QS. Esas diferencias en cuanto a capacidades metabólicas pueden ser explicadas por la existencia de subespecies asociadas a *B. cereus*, que como se mencionó anteriormente, difieren dentro de la especie por esas particularidades que pueden ser moduladas por su nicho ecológico a lo largo de la evolución del consorcio. Los aislamientos de *B. cereus* son susceptibles a la actividad antagónica de *B. paralicheniformis*, que es una especie antagónica muy fuerte sobre el consorcio bacteriano de *X. muta* Xm2.

Otro bacilo reportado dentro del consorcio de Xm2 es la especie ***B. praedii***, que fue descrita por primera vez en el año 2017, aislada del suelo de un cultivo de arroz en Sichuan, China (Liu *et al.*, 2018). Esta especie bacteriana con actividad reductora de nitratos a nitritos **es reportada aquí con actividad inhibitoria de QS**, que la hace una potencial participante en la regulación de eventos de comunicación que bloquee la maduración de *biofilm* como se describió para los aislamientos de la especie *B. cereus*. *B. praedii* es susceptible a las sustancias antagónicas producidas por *B. paralicheniformis*, que es una especie que se perfila como altamente reguladora del consorcio de *X. muta* Xm2 sin *biofouling*. En presencia de *B. paralicheniformis*, *B. praedii* no puede alcanzar una densidad poblacional suficiente como para que sus sustancias inhibitoras del QS sean efectivas sobre las rutas de comunicación de otras bacterias del consorcio.

Dentro de los otros bacilos propios de *Xestospongia muta* Xm2 sin epibiosis, se encuentra ***B. flexus***, una bacteria de la cual reportamos su existencia asociada al consorcio de bacterias cultivables de *X. muta*, pero no reportamos ningún ensayo de inhibición de QS, detección de AHL ni antagonismo pues luego de ser

determinada taxonómicamente, y ser almacenada en el cepario del CCB, no pudimos volver a cultivarla. Sin embargo, una búsqueda bibliográfica ofreció información de esta especie, como una productora de celulasas que han sido encontradas únicamente en *Ulva lactuca*, un alga de la que se conocen múltiples sustancias inhibitoras de QS (Holmström, *et al.*, 2002; Trivedi *et al.*, 2011). Con esta potencial actividad, *B. flexus* puede bloquear el asentamiento de micro y macroalgas, participantes de la mayoría de epibiosis reportadas en el mar (Dahms & Dobretsov, 2017).

***Bacillus filamentosus*** es otra especie bacteriana del consorcio de *Xestospongia muta* Xm2; fue aislada y caracterizada por primera vez en el 2015 de sedimentos marinos de la zona costera en Goa, India (Sonalkar *et al.*, 2015). Esta bacteria oxidasa positivo **presentó actividad antagónica sobre *B. subterraneus* y sobre la especie *Micrococcus yunannensis*, con una especificidad relevante** pues estando en el mismo consorcio, *B. filamentosus* no posee actividad antagónica sobre *Micrococcus aloeverae*. Lo anterior es un ejemplo de cómo a pesar de pertenecer al mismo género, dos especies bacterianas pueden tener diferentes perfiles de susceptibilidad a sustancias antagónicas producidas por bacterias como las reportadas del género *Bacillus*, demostrando que la regulación dentro del consorcio puede ser muy específica. Además, *B. filamentosus* es susceptible a la actividad antagónica de *B. cereus*, una especie reguladora de pocas especies de su consorcio y a la actividad de *B. paralicheniformis*, un regulador antagónico muy fuerte del consorcio de *X. muta* Xm2 sin *biofouling*. Lo anterior es una muestra de cómo algunos elementos del consorcio pueden ser regulados por otras especies asociadas que tienen diferentes niveles de antagonismo que pueden manifestarse de acuerdo con la composición de la comunidad.

Existen dos especies bacterianas compartidas únicamente por los dos consorcios bacterianos asociados a *X. muta* Xm1 y Xm2: *Bacillus paramycoides* y *Arthrobacter crystallopoietes*.

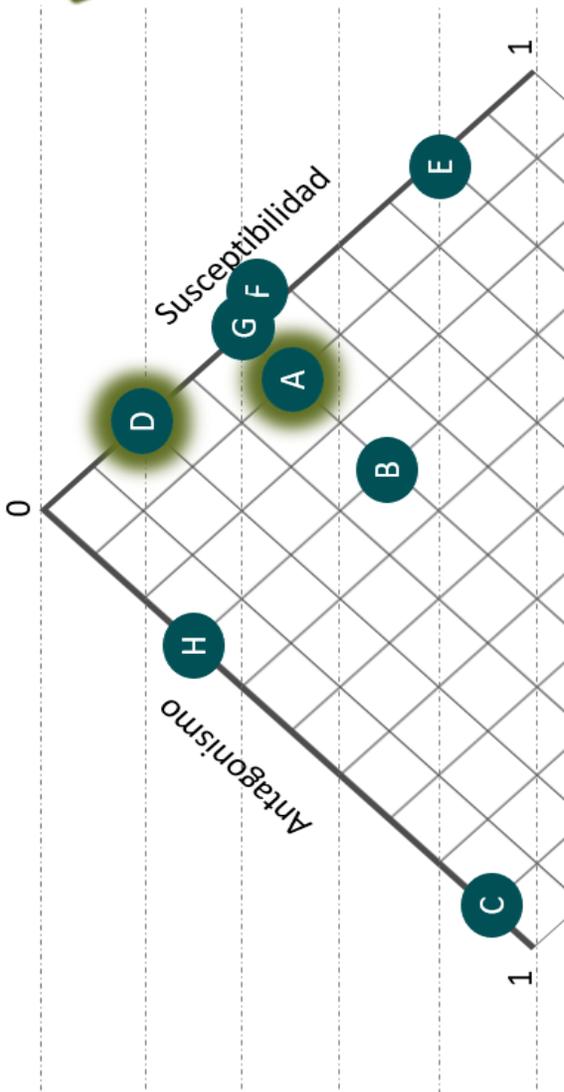
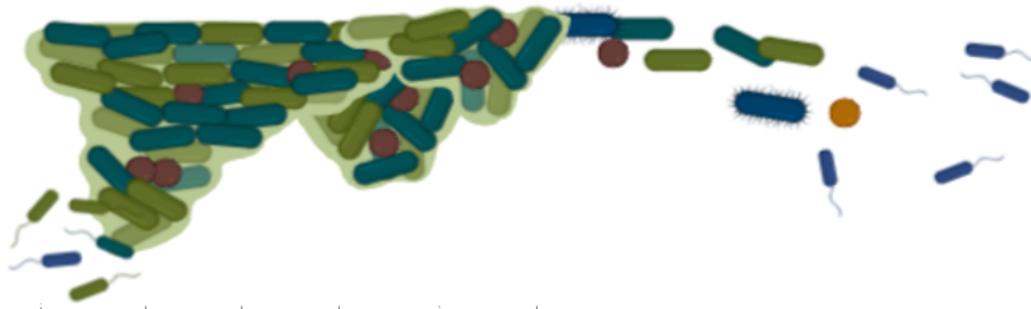
***B. paramycoides*** se encuentra en controversia dentro de la taxonomía bacteriana, pues algunos autores la describen como una especie verdadera mientras otros la encasillan como una subespecie de *B. cereus* (Liu, *et al.*, 2019). Es una bacteria

anaerobia facultativa aislada de sedimentos del mar del sur de China, de la que no existen nuevos reportes asociados con su actividad metabólica o su potencial participación en su nicho ecológico. **En esta investigación reportamos a la cepa CCBXm1-8 determinada como *B. paramycoides*, como inhibidora de la comunicación celular y actividad antagónica sobre otros aislamientos de su consorcio del género *Bacillus* y *Micrococcus*.** El aislamiento CCBXm2-13 catalogado con la misma especie que CCBXm1-8 (*B. paramycoides*) no posee ninguno de estos atributos. En el consorcio asociado a *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, *B. paramycoides* es susceptible al antagonismo de *L. composti*, *B. zhangzhouensis* y *M. foliorum*, que son antagonistas fuertes de esa comunidad; mientras en el contexto de *X. muta* Xm2 sin *biofouling*, *B. paramycoides* es susceptible al antagonismo de *B. paralicheniformis*. La diferencia entre los perfiles de las dos cepas de *B. paramycoides* con diferentes potenciales de inhibición y antagonismo, así como su susceptibilidad a cepas antagónicas fuertes como las antes mencionadas, puede explicarse teniendo en cuenta composición y evolución del consorcio bacteriano sobre el individuo porífero. En un contexto de comunidad donde se requiera producir sustancias que inhiben tanto la comunicación bacteriana como el crecimiento de otras bacterias, los genes asociados a este fenotipo serán expresados constantemente, fijando esa expresión como característica inherente de la bacteria. En un segundo contexto, donde estas actividades no sean requeridas, ya sea porque existen otros microorganismos con un potencial mayor de inhibición QS y antagonismo, o con sustancias mucho más efectivas para evitar eventos de comunicación y proliferación de ciertas bacterias, los genes asociados a estos fenotipos serán silenciados por modificaciones sobre la secuencia genómica o por eventos epigenéticos (Ferenci, 2008; Pfennig *et al.*, 2010; Ryall, Eydallin, & Ferenci, 2012). Estos procesos han sido evaluados con mayor profundidad y rigor en relaciones ecológicas de eucariotas (Pfennig *et al.*, 2010), pero dado que estos eventos son considerados como fuertes moduladores del contexto ecológico microbiano, pueden explicar eventos como el anteriormente descrito, sin desconocer la presencia de otros eventos que modifican los perfiles bioquímicos bacterianos como la pérdida de información genética, la actividad realizada por

transposones, la integración de plásmidos y en general, todos los eventos de transferencia horizontal que pueden suceder en un contexto de *biofilm* maduro (Madsen, *et al.*, 2012).

***Arthrobacter crystallopoietes*** otra bacteria descrita para las comunidades de Xm1 y Xm2, se ha aislado de muestras de suelo y de áreas comunes del Kennedy Space Center (Koch, *et al.*, 2012; Vaishampayan *et al.*, 2019). **A la fecha, no hay ningún reporte de esta especie asociada a ecosistemas marinos**, pero del género, han descubierto especies del género *Arthrobacter* en sedimentos marinos antárticos y del caribe (Cobet, Wirsen, & Jones, 1970; Pindi, *et al.*, 2010). Para *A. crystallopoietes* se ha descrito su capacidad de formar *biofilm* y en ambos consorcios bacterianos, los aislamientos CCBXm1-16 y CCBXm2-12, pueden estar promoviendo la formación de biopelículas, estructuras necesarias para el mantenimiento de la comunidad simbiote. Sin embargo, estos aislamientos pueden estar siendo modulados por bacterias como *Bacillus zhangzhouensis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus paralicheniformis*, que para ambas comunidades bacterianas han sido descritos como potenciales moduladores de múltiples especies dentro del consorcio. **Con estos resultados se propone que existen múltiples actores que modulan directamente la proliferación de bacterias formadoras de *biofilm*, siendo este un fenotipo altamente regulado para evitar la maduración del consorcio.**

## Promoción de la formación de *biofilm*



Especie bacteriana	Convención
<i>Bacillus cereus</i>	A
<i>Bacillus filamentosus</i>	B
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	C
<i>Bacillus praedii</i>	D
<i>Bacillus subterraneus</i>	E
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	F
<i>Bacillus paramycoides</i>	G
<i>Micrococcus alobevarae</i>	H

**FIGURA 26. MODELO DE RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, SUSCEPTIBILIDAD E INHIBICIÓN DE QS PARA ESPECIES BACTERIANAS RELEVANTES EN LA COMUNIDAD ASOCIADA A *X. MUTA* XM2 SIN *BIOFOULING* (MODIFICADO DEL DIAGRAMA DE CLIMATOLOGÍA DE HOLDRIDGE) DESCRIPCIÓN DE FIGURA 25.**

Con los resultados descritos anteriormente y usando el modelo propuesto para graficar las relaciones de especies sobresalientes dentro de la comunidad asociada a *X. muta* Xm2 sin *biofouling* (Figura 26, pg. 130), encontramos que, diferente al comportamiento presentado por las especies de la comunidad Xm1, en esta comunidad la ausencia de un *biofilm* maduro se debe a otras variables descritas a continuación: En este consorcio, diferente a Xm1, no existe un gran grupo de especies altamente antagónicas y al tiempo inhibidoras del QS; en cambio observamos una comunidad donde sobresale una única especie altamente antagónica que puede estar ejerciendo actividad sobre su comunidad impidiendo la diversificación y aumento en la densidad poblacional de especies promotoras de *biofilm*. Posiblemente *B. paralicheniformis* como especie dominante, prohíba el asentamiento y proliferación de especies bacterianas que podrían complejizar al consorcio, generando nuevas rutas para el establecimiento de la biopelícula. Además, las especies con actividad inhibidora del QS, diferente a lo observado en Xm1, no poseen actividad antagónica fuerte y sí poseen una susceptibilidad media, lo que significa que pueden ejercer regulación sobre su consorcio, pero sin postularse como grandes reguladores, de los que necesariamente dependa la comunidad para mantenerse desprovista de *biofouling*. Incluso, algunas especies con actividad inhibidora del QS, también han sido descritas como productoras de EPS, biosurfactantes y asimiladores de carbono y fósforo, atributos importantes para la maduración del *biofilm*, lo que las postula como especies versátiles que, dependiendo el contexto, actuarán como promotoras de la complejización de la comunidad o como inhibidoras de este proceso. Lo anterior es muestra de que las comunidades bacterianas, a pesar de pertenecer a holobiontes de esponjas de la misma especie, dependen no solo del hospedero, sino de las condiciones temporales, espaciales y fisicoquímicas que determinan no sólo la composición de la comunidad bacteriana, sino también la conformación de nuevas redes de regulación que responden a su consorcio.

## 8.2 COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESPONJAS CON BIOFOULING

Los dos individuos de porífero con *biofouling* a los que se les evaluó la composición de su consorcio bacteriano cultivable, fueron determinados como *Desmapsamma anchorata* y *Aplysina insularis*.

Del género *Aplysina* no existen reportes de comunidades bacterianas cultivables, tal como para la especie *X. muta*, haciendo que **este estudio se perfile como el pionero en explorar esas especies cultivables asociadas a los tejidos de poríferos como los antes mencionados.**

En este estudio obtuvimos un total de 28 aislamientos asociados a la esponja *A. insularis* con *biofouling*, de los cuales un 57% corresponden a bacterias del filo *Actinobacteria* y un 43% al filo *Firmicutes*. No reportamos ningún aislamiento perteneciente al filo *Proteobacteria*. Se reportan 6 especies con actividad inhibidora del QS y con potencial antagónico sobre otras especies de su mismo consorcio.

De los reportes existentes sobre el género *Aplysina* sobresalen los que describen su actividad anti-*fouling*, su capacidad de producir tanto sustancias inhibidoras del QS como de compuestos antagónicos, producidos directamente por este organismo (Encarnacion, *et al.*, 2000; Reverter *et al.*, 2016), además del reporte de la fauna exuberante asociada al nicho que proporciona esa esponja (González-Rivero *et al.*, 2011).

Otros reportes de comunidad bacteriana asociada a este género de esponjas han sido realizados con técnicas independientes de cultivo, encontrando que consorcio simbiote está dominado por los filos *Proteobacteria* (particularmente las clases Gamma y Delta *Proteobacteria*) y Cloroflexi (Abdelmohsen *et al.*, 2014; Bell, 2008). Mientras las *Actinobacterias* son un filo con dominancia intermedia y el Filo *Firmicutes*, se constituye como uno de los grupos con menor abundancia (Slaby *et al.*, 2017).

Uno de los reportes con técnicas independientes de cultivo sobre la especie *Aplysina fulva*, describió que esta posee una comunidad en su mayoría compuesta por *Proteobacterias* (de la clase Delta y Gamma), seguido de una participación en

dominancia intermedia por parte del filo *Firmicutes*, mientras el filo *Actinobacteria* se encuentra asociado a los últimos grupos presentes, con muy poca abundancia (Hardoim *et al.*, 2009). Este resultado contrasta con la evaluación de la comunidad bacteriana de *A. cauliformis*, donde luego de las *Proteobacterias*, los más dominantes son los del filo Cloroflexi, seguidos de las *Actinobacterias* (Olson, Thacker, & Gochfeld, 2014). Para esta caracterización, de forma sorpresiva, no hubo reporte de bacterias del filo *Firmicutes*.

Si bien los estudios antes descritos no pueden ser comparados con los resultados obtenidos en esta investigación, configuran el único antecedente existente que ha descrito la comunidad bacteriana asociada a esponjas de este género, permitiendo contextualizar sobre el tipo de investigaciones realizadas a la fecha, además de ser antecedente de algunas especies bacterianas que pudieron ser descritas tanto en esos estudios como en esta investigación.

A continuación, se describen los perfiles bioquímicos y los resultados de ensayos para algunas especies bacterianas relevantes dentro de esta comunidad cultivable: ***Exiguobacterium aurantiacum*** es una bacteria anaerobia facultativa, alcalófila y halotolerante aislada de fermentos de papa, de gasolina contaminada en tanques de realimentación, de cubiertas marinas y hasta de sangre humana (Collins, *et al.*, 1983; Pitt *et al.*, 2007; Taylor & Inbakandan, 2010) . De esta bacteria se han reportado su capacidad de asimilar y degradar compuestos orgánicos asociados a la fermentación de aguas de desecho, reduciendo significativamente la presión del gas provocada por estos compuestos (Jeswani & Mukherji, 2013). Además, estudios de microbiota asociada a la superficie de navíos reportó que tanto *E. aurantiacum* como otras especies del género *Exiguobacterium*, aislados de este sustrato, presentan una alta capacidad formadora de biopelículas, fenotipo relevante en la estructuración y maduración de consorcios bacterianos y epibiosis (Taylor & Inbakandan, 2010).

**En esta investigación reportamos un aislamiento perteneciente a *E. aurantiacum* con capacidad inhibitoria de QS sobre el biosensor *C. violaceum* ATCC31532 y dos aislamientos clasificados únicamente hasta este género, sin actividad relevante en inhibición y antagonismo.** La alta capacidad que tienen

las especies asociadas a este género por generar biopelículas resulta importante en el proceso de establecimiento y aumento en la complejidad de las interacciones de comunidad. Entonces, el género *Exiguobacterium* podría ser un elemento potencial para tenerse en cuenta en la generación de matriz extracelular necesaria para la estratificación de las poblaciones bacterianas en superficies como cascos de navíos y en este caso, de esponjas como *A. insularis*, promoviendo el micronicho necesario para permitir el asentamiento de nuevos colonizadores de orden superior, constituyendo el *biofouling* que poseía el individuo porífera colectado. La inhibición de QS que pueda estar realizando *E. aurantiacum* en su comunidad puede ser relevante sobre la porción correspondiente a las *Proteobacterias*, Gram negativas de las que se tiene el mayor número de reportes de comunicación bacteriana mediada por moléculas tipo AHL. Modular la expresión de factores de virulencia de organismos de este filo, así como la producción de toxinas específicas para eucariotes, permitirá que la epibiosis se desarrolle. Lo anterior aplica para todos los aislamientos en los que se describe su actividad inhibidora de QS. Dentro del contexto de comunidad asociada a *A. insularis* con *biofouling*, *E. aurantiacum* es susceptible a un regulador fuerte del consorcio determinado como *B. paralicheniformis*, que puede reducir su densidad poblacional, afectando directamente la efectividad de su actividad inhibidora de la comunicación bacteriana.

Otra especie bacteriana relevante dentro del consorcio asociado a *A. insularis* con *biofouling* es *Rummeliibacillus stabekisii*, un bacilo aislado por primera vez del centro de instalaciones peligrosas del Kennedy Space Center y luego reportado como aislamiento del suelo de la región Antártica (Faria, Vollú, & Jurelevicius, 2016; Vaishampayan *et al.*, 2018). De este microorganismo no se tienen reportes sobre productos metabólicos sobresalientes, hasta la fecha. **Nosotros hacemos el primer reporte de la actividad inhibitoria de dos de cuatro aislamientos determinados con esta especie, sobre el circuito de producción de violaceína del biosensor ATCC31532.** Además, se reporta que esta especie es susceptible a la actividad antagónica de un potencial regulador del consorcio conocido como *B. paralicheniformis*, que como se mencionó anteriormente, puede alterar la

abundancia de la población de esta especie, reduciendo la efectividad de su actividad inhibitoria de QS.

***Arthrobacter creatinolyticus***, un bacilo anarobio facultativo aislado principalmente de la orina humana, posee una ureasa termoresistente que ha sido propuesta como biosensor de la presencia de urea en procesos de pasteurización de leche (Hou, *et al.*, 1998; Ramesh *et al.*, 2015). Este patógeno de vías urinarias ha sido descrito además como un biorremediador que junto a la planta *Echinodorus cordifolius* pueden remover el arsénico de fuentes de agua contaminadas con este compuesto (Prum, Dolphen, & Thiravetyan, 2018). **En esta investigación obtuvimos resultados positivos para ensayos de inhibición del QS, reportando este evento por primera vez para esta especie.** *Arthrobacter creatinolyticus* es fuertemente regulada por especies como *B. paralicheniformis* y *B. rhizosphorae*, ambas especies pertenecientes al mismo consorcio asociado a la esponja *A. insularis* con epibiosis.

***Microbacterium esteraromaticum*** es otra especie bacteriana reportada como única para el consorcio cultivable asociado a la esponja *A. insularis* con *biofouling*. Esta bacteria, aislada de suelos australianos exhibe la producción de enzimas degradadoras de pesticidas organofosforados fenamifos, usados ampliamente en cultivos de cereales y horticultura (Hou *et al.*, 1998; Panneerselvan, *et al.*, 2018). En este estudio, ***M. esteraromaticum* produjo actividad inhibitoria de QS sobre *C. violaceum*, y es susceptible a sustancias antagónicas de *B. paralicheniformis* y *B. rhizosphorae* que se proponen como candidatos con fuerte actividad antagónica sobre la comunidad cultivable simbiote de *A. insularis* con epibiosis. Ambos eventos son reportados por primera vez.**

Otra bacteria con propiedades antagónicas sobresalientes sobre su consorcio es ***Bacillus halosaccharovorans***, que fue aislado por primera vez de un lago hipersalino en Irán (Mehrshad *et al.*, 2018). Este bacilo motil tiene actividad antagónica sobre *Micrococcus aloeverae*, *Micrococcus flavus* y *Micrococcus luteus*. A diferencia de *Bacillus filamentosus*, ***B. halosaccharovorans* posee actividad inhibitoria sobre todos los micrococcus asociados al consorcio de *A. insularis***, lo que representa un evento de regulación más generalizado que el

expuesto por *B. filamentosus*, actuando sobre todo el género *Micrococcus*, muy común en las comunidades simbiotes de esponjas, corales y agua marina. En el contexto de comunidad asociado a *A. insularis* sin epibiosis, *B. halosaccharovorans* es susceptible a la actividad antagónica de *B. paralicheniformis*, una especie altamente reguladora de este contexto por su gran actividad antagónica sobre muchos aislamientos de su propio grupo.

Una especie bacteriana cultivable que proponemos como una fuerte reguladora del consorcio bacteriano es ***Bacillus rhizosphaerae***, un bacilo propuesto para ser reclasificado como *B. clausii*, fue aislado por primera vez de la rizosfera de plantas de caña de azúcar (Jung-sook Lee, Lee, & Kuppusany, 2011). *B. rhizosphaerae* es un fuerte antagónico sobre casi toda su comunidad bacteriana (Tabla 14, pg.109) y además produce sustancias inhibitoras de la comunicación bacteriana en *C. violaceum* ATCC31532. Según su fuerte actividad antagónica e inhibitora de QS, esta bacteria debería regular a su comunidad tanto como para no promover la formación de biopelícula y por tanto inhibir la epibiosis. **Proponemos que el potencial regulador que tiene *B. rhizosphaerae* dentro de su consorcio, debe estar modulado por poblaciones bacterianas dominantes que no permiten su proliferación**, restringiendo disponibilidad de nutrientes, manteniendo a este microorganismo en baja abundancia lo que no permite una concentración efectiva de estos compuestos requeridos para modular fuertemente la comunidad simbiote.

Un ejemplo de cómo algunos fenotipos contraproducentes para la epibiosis podrían ser controlados por la comunidad, es el que encontramos con ***Micrococcus luteus***. Esta bacteria encontrada únicamente en el consorcio cultivable de *A. insularis* con *biofouling*, es susceptible a potenciales reguladores del consorcio como *B. paralicheniformis*, *B. halosaccharovorans* y *B. rhizosphaerae*. La especie *M. luteus* ha sido descrita como patógena en humanos, involucrada en enfermedades como la meningitis y existen reportes de esta especie como promotora de sepsis en heridas producto de cirugías (Stackebrandt, 2015). Además de lo mencionado, *M. luteus* produce cadaverina, un compuesto que, asociado a los EPS, mantiene la integridad de la estructura de la superficie celular, pero que puede ser tóxico para las larvas que se adhieren al *biofilm* (Bulushi, et al., 2018). **Al tener múltiples**

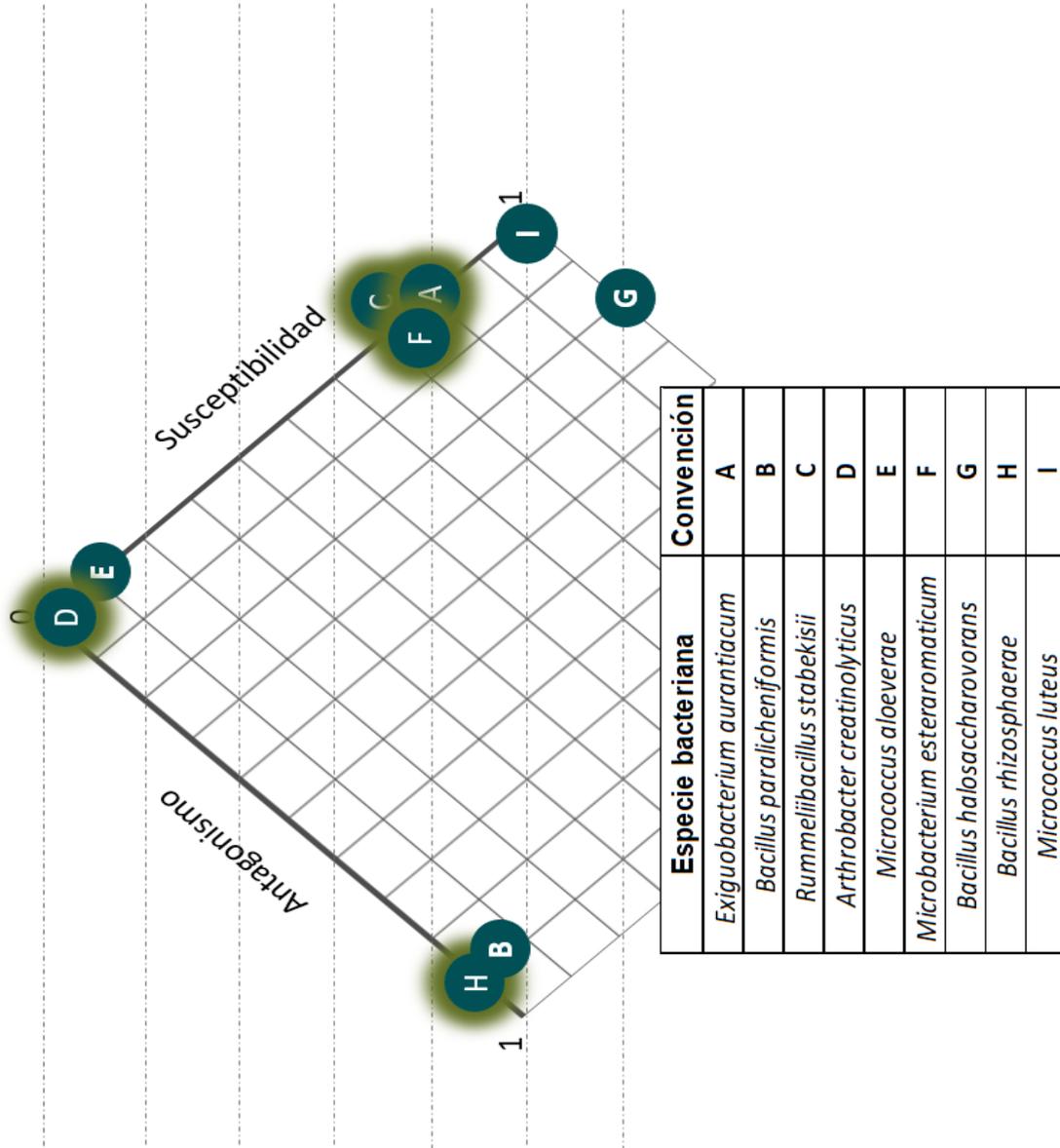
**especies con actividad antagónica sobre *M. luteus* dentro del mismo consorcio, la producción de toxinas como la cadaverina estarían reducidas, evitando el daño sobre colonizadores eucariotas a la epibiosis.**

Tanto dentro del consorcio bacteriano cultivable de *A. insularis* con *biofouling* como el asociado a *X. muta* Xm1 y Xm2 sin *biofouling*, se encontraron dos especies bacterianas: *Micrococcus aloeverae* y *B. paralicheniformis*. ***M. aloeverae*** ha sido descrita como una bacteria común asociada a simbioses marinos como esponjas y corales (Brinkmann, Kearns, & Evans-illidge, 2017). Esta bacteria posee actividad alcalín-proteasa, que ha sido optimizada con intereses industriales, en el uso de curtiembres, por ejemplo (Prakash, *et al.*, 2017). Dentro del cepario obtenido en esta investigación determinamos dos aislamientos en el grupo *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, tres en el grupo *X. muta* Xm2 sin *biofouling*, y uno en el grupo *A. insularis* con *biofouling*, demostrando su poder cosmopolita dentro de comunidades bacterianas asociadas al lecho marino.

***B. paralicheniformis***, un bacilo aislado y caracterizado por primera vez en el 2015 de pasta fermentada a base de Soja, ha sido descrito múltiples veces como productor de sustancias antagónicas de interés industrial (Dunlap, *et al.*, 2019). *B. paralicheniformis* produce Bacitracina, Fengicina, Formicina y Lantipéptidos (Collins *et al.*, 2016; Dunlap *et al.*, 2019). Además, han descrito en la composición de los exopolisacáridos que *B. paralicheniformis* sintetiza, compuestos ricos en selenio que tienen actividad antioxidante y citoprotectora, importantes en la industria farmacéutica (Cheng *et al.*, 2017).

Seis aislamientos bacterianos que pertenecen a los grupos Xm1 sin *biofouling* (1), Xm2 sin *biofouling* (2) y *A. insularis* con *biofouling* (3), fueron determinados como *B. paralicheniformis* y todos cuentan con un perfil antagónico que afecta a un gran número de aislamientos asociados a cada consorcio bacteriano. Las cepas de *B. paralicheniformis* que han sido descritas en la bibliografía poseen una gran capacidad de producir antibióticos a los que pueden ser susceptibles otras especies pertenecientes a la comunidad bacteriana simbiote. En el caso de los consorcios asociados a *X. muta* Xm1 y Xm2 sin *biofouling*, el perfil que presenta *B.*

*paralicheniformis* lo hace un candidato potencial a ser un regulador principal, evitando la proliferación de bacterias promotoras de *biofilm* o bacterias que desestabilicen la homeostasis del holobionte. El papel de *B. paralicheniformis* en el consorcio de *A. insularis* con *biofouling* está mucho más regulado, probablemente por el contexto donde participan bacterias no cultivables que pueden ejercer actividad antagónica sobre esta especie, evitando que regule otras especies necesarias para la formación de la biopelícula y el *biofouling*. Nosotros reportamos que dentro del grupo de *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, *B. paralicheniformis* CCBXm1-27 es susceptible a la actividad antagónica de *Lysinibacillus composti*, lo que es un ejemplo claro de cómo existe una regulación jerárquica, donde hasta los organismos con mayores herramientas de antagonismo bacteriano pueden ser regulados por otros microorganismos presentes en su consorcio. En el contexto de *A. insularis* con *biofouling*, *B. paralicheniformis* no presenta susceptibilidad a ninguno de los actores antagónicos reportados para ese consorcio.



**FIGURA 27. MODELO DE RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, SUSCEPTIBILIDAD E INHIBICIÓN DE QS PARA ESPECIES BACTERIANAS RELEVANTES EN LA COMUNIDAD ASOCIADA A A. INSULARIS CON BIOFOULING (MODIFICADO DEL DIAGRAMA DE CLIMATOLOGÍA DE HOLDRIDGE)**

Los valores asignados a cada aislamiento con respecto al antagonismo y susceptibilidad se obtuvieron a partir de la frecuencia relativa de cada uno de los eventos, así: **Antagonismo:** Número de aislamientos hacia los que dicha especie ejerce antagonismo, sobre el total de los aislamientos susceptibles al antagonismo; **Susceptibilidad:** Número de aislamientos que ejercen antagonismo sobre hacia especie, sobre el total de aislamientos con actividad antagónica. **En verde alrededor de los puntos:** actividad inhibidora de QS, comprobada experimentalmente. La distribución de las especies bacterianas relevantes para este consorcio sobre el esquema revela que los perfiles antagónicos y la regulación que se ejerce sobre algunas especies promueven un ambiente altamente regulado que inhibe el desarrollo del *biofilm*, manteniendo desprovisto de *biofouling* la superficie de la esponja.

Con las descripciones anteriores y el modelo propuesto encontramos también una variación en el comportamiento de las especies bacterianas relevantes, respecto de su actividad antagónica y sensibilidad. Diferente a los dos modelos anteriores, en este modelo no existe una correlación entre los perfiles bioquímicos asociados a la promoción del *biofilm* y su regulación por antagonismo e inhibición del QS. Es por tanto que en la Figura 27 pg.139 no existe el dibujo del *biofilm* en formación.

Lo que encontramos en esta comunidad es la distribución de las especies con actividad inhibidora del QS en tres puntos del área del esquema, donde existe una especie con altísima actividad antagónica que también es inhibidora del QS; seguido de una especie que no es antagónica ni susceptible, y tres especies altamente susceptibles, pero sin actividad antagónica. Esta distribución es ejemplo de cómo existe una complejización de los perfiles de las especies asociadas a la comunidad bacteriana de un micronicho de *biofouling*, donde ya se cuenta con un *biofilm* maduro, especializado y permisivo al ingreso y asentamiento de especies eucariotas que generan nuevas relaciones y, por tanto, abren campo a nuevas rutas de regulación. En este contexto, las especies altamente antagónicas pueden participar en dos eventos: el primero, donde se encuentran súper-reguladas mediante otros mecanismos que no se consideran en esta investigación, por especies que no están contempladas dentro de la comunidad cultivable, o por factores fisicoquímicos, que no permiten que los antagónicos altos aumenten en densidad poblacional y dominen sobre la comunidad. El segundo, donde estas especies existen, no se regulan de forma estricta, pero participan dentro del

consorcio con una baja densidad poblacional sobre especies bacterianas que deben ser altamente reguladas para evitar que la nueva composición del *biofouling* no afecte tanto a los participantes como a la esponja hospedera.

También observamos que tres de las cinco especies con actividad inhibidora del QS, son altamente reguladas, lo que concuerda con la idea de que este tipo de regulación debe existir en menor número de eventos para que no interfiera con la formación y maduración del *biofilm*. Sin embargo, las otras dos especies con esta actividad son, o altamente antagónica (explicada anteriormente), o sin antagonismo ni susceptibilidad al antagonismo, lo que demuestra que también deben existir eventos de inhibición del QS que regulen la producción de factores de virulencia o sustancias tóxicas que puedan atentar directamente contra los participantes del *biofouling*, incluido el hospedero. De nuevo, los resultados demuestran que, según el hospedero, la temporalidad, la ubicación geográfica y los factores fisicoquímicos, modulan al consorcio bacteriano desde su composición hasta la formación de rutas de regulación que responden a las presiones ambientales del momento.

De la especie porífera ***Desmapsamma anchorata*** no hay reportes a la fecha de la composición bacteriana asociada, sino unos pocos reportes de *Actinobacterias* del género *Micromonospora* y *Verrucosispora* aisladas y caracterizadas con actividad citotóxica (Abdelmohsen *et al.*, 2014). Sin embargo, hay estudios de esponjas del Brazil, donde *D. anchorata* produce sustancias inhibidoras de *biofouling*. Los ensayos se realizaron usando macerados y extractos del total del tejido, por lo que puede incluir activos que son producidos por el consorcio bacteriano (Ribeiro *et al.*, 2013).

En el cepario construido con los aislamientos bacterianos cultivables asociados al consorcio de *D. anchorata* con *biofouling*, se tiene un total de 21 aislamientos de los cuales el 52% corresponden al filo *Firmicutes*, el 24% al filo *Actinobacteria* y el 24% restante al filo *Proteobacteria*.

Del total de los aislamientos de *D. anchorata*, se reportan 11 especies únicamente encontradas en este grupo, de los que sobresalen especies del filo *Proteobacteria* como *Oceanimonas smirnovii*, *Pseudomonas oceani* y *Pseudomonas stutzeri*;

*Firmicutes*, como *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus licheniformis* y una única especie del filo *Actinobacteria*, determinado como *Dietzia cinnamea*. A continuación, se realizará una descripción de los perfiles metabólicos y los hallazgos obtenidos en esta investigación sobre especies bacterianas con potencial regulador dentro del consorcio bacteriano de *D. anchorata*:

***Oceanimonas smirnovii***, una bacteria Gram negativa, fue descrita por primera vez en el 2004, luego de ser aislada del mar Negro en Karadag, Reserva Natural del este de Crimea, Ucrania (Ivanova *et al.*, 2005). Se trata de un bacilo aerobio con capacidad de reducir nitratos a nitritos, del que reportamos un aislamiento susceptible a sustancias antagónicas por parte de las especies *B. altitudinis*, *B. mycoides*, *B. tequilensis* y *B. haikouensis*. No existen reportes a la fecha de otras capacidades metabólicas asociadas a este grupo taxonómico, sin embargo, al ser una *Gammaproteobacteria*, se esperaría que, como muchas de las conocidas de su clase, posea circuitos de comunicación celular asociados a moléculas señal tipo AHL y que entre otros fenotipos regulados por este fenómeno, promueva la maduración del *biofilm* (Viswanath *et al.*, 2015). En este estudio no reportamos producción de moléculas señal de este tipo en los tres aislamientos determinados como *O. smirnovii*, pero puede que esta bacteria produzca AHL no detectables para la batería de biosensores usados, o que la produzca en concentraciones tan bajas que no pueden ser detectadas en los ensayos.

***Pseudomonas oceani* y *Pseudomonas stutzeri*** son dos especies asociadas al consorcio de *D. anchorata* con *biofouling*, pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*. Del género *Pseudomonas* existe un gran número de investigaciones asociadas a su capacidad de comunicarse mediante moléculas señal diversas, incluidos los autoinductores y las AHL (Jasmine Lee & Zhang, 2014). Particularmente, se han descrito eventos de inmunidad adaptativa como es CRISPR-Cas, que son mediados por *Quorum Sensing* (Høyland-kroghsbo, *et al.*, 2017). Con esta bacteria modelo se han investigado eventos de relaciones sociales, encontrando que *P. aeruginosa* posee una complejidad muy alta relacionada a su respuesta y la regulación de esta frente a moléculas de señalización (Jasmine Lee

& Zhang, 2014). Incluso, últimos avances en micro-ecología han encontrado que algunas *Proteobacterias* como *P. aeruginosa* poseen comportamientos policivos frente a bacterias “tramposas” donde, al pertenecer a una comunidad, saca provecho de la producción de moléculas señal de las bacterias vecinas y los fenotipos que se expresan sin relacionarse, ni sintetizar moléculas señal ni invertir el gasto energético propio de la activación de una vía metabólica particular (Wang, *et al.*, 2015).

Esta información es relevante para esta investigación por cuanto ofrece pruebas de mecanismos de relación social distintos de los antes descritos, como el QS, la inhibición de este y la producción de sustancias antagónicas como moduladores de la composición y comportamiento del consorcio bacteriano. Tal y como en los fenómenos sociales y económicos humanos, las bacterias desarrollan mecanismos oportunistas para participar y beneficiarse de un servicio público (como lo sería la asimilación y puesta en disposición de algún metabolito o nutriente de importancia) sin contribuir al proceso de activación y síntesis (Wechsler & Kümmerli, 2019) .

Estas bacterias “tramposas” se convierten en un nuevo factor a tener en cuenta dentro de los análisis ecológicos asociados a comunidades bacterianas, donde su comportamiento en principio no significa un riesgo para la comunidad, pero, al paso del tiempo, el beneficiarse sin contribuir mientras se aumenta en densidad poblacional, promueve una desestabilidad de la comunidad que termina en la pérdida de homeostasis de la misma, dando paso a bacterias oportunistas que pueden ser patógenas o que generarán el nicho requerido para el asentamiento de organismos que sí lo son (Sexton & Schuster, 2017).

**En esta investigación reportamos por primera vez que las especies *Pseudomonas oceani* y *Pseudomonas stutzeri* producen moléculas señal tipo AHL, con una longitud probable, según la sensibilidad de los biosensores usados, de C6-AHL C8-AHL, C8-3-oxo-AHL, C10-AHL, C10-3-oxo-AHL, c12-AHL y C12-3-oxo-AHL, y además produce moléculas tipo C6-3-oxo-AHL, que pueden ser detectadas por los biosensores pSB-401, pSB-403 y W19, quienes poseen alta sensibilidad a este compuesto y de los que se obtuvo halos muy intensos de bioluminiscencia y proteína verde fluorescente.**

Además de estar involucrada en la formación de *biofilm* y activación de fenotipos dependientes de un contexto social, *P. stutzeri*, podrían estar participando en el mantenimiento del andamiaje asociado a esta estructura de biopelícula. Se ha reportado que *P. stutzeri* produce biosurfactantes, promoviendo el intercambio de sustancias anfipáticas del ambiente con el *biofilm* (Lalucat, *et al.*, 2006; Sundaramanickam, Meena, & Balasubramanian, 2018). Los biosurfactantes son de gran interés biotecnológico pues se usan en eventos de bioremediación en derrames de petróleo y como pesticidas en cultivos de extensión como los cereales. Dentro de los *Firmicutes* únicamente reportados para la especie *D. anchorata* con *biofouling* se encuentra *B. aryabhatai*, una especie aislada del lecho marino profundo, produce polihidroxicanoatos, compuestos propuestos como alternativa para la generación de plásticos biodegradables (Pillai *et al.*, 2017; Shivaji *et al.*, 2019). **Para esta especie reportamos su actividad antagónica sobre *B. oryzaecorticis*, de la que se sabe, produce una amilasa termorresistente con atributos de interés para la industria de alimentos, particularmente cereales y fermentos** (Tambekar, *et al.*, 2017). A su vez, *B. aryabhatai* es susceptible a sustancias antagónicas producidas por *B. tequilesis*, que puede estar regulando la abundancia de *B. aryabhatai* dentro de la comunidad, modulando directamente la expresión de fenotipos de interés como los compuestos inhibidores de crecimiento de *B. oryzaecorticis*.

Otro bacilo reportado en este estudio con actividad antagónica sobre elementos del consorcio es *B. mycoides*. Este *Firmicute* **bloquea el crecimiento de especies bacterianas de su propio consorcio, de los géneros *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus* y a la especie *D. cinnamea* y ningún aislamiento de su comunidad cultivable produce sustancias que inhiban su crecimiento.** De *B. mycoides* se ha descrito su capacidad de producir quitinasas, una enzima capaz de digerir los exoesqueletos de varios crustáceos (Ramanauskas, *et al.*, 2005). Además, esta especie bacteriana sintetiza bactericinas que han sido probadas sobre aislamientos del género *Leuconostoc*. **Nuestro aislamiento determinado como *B. mycoides* es uno de los aislamientos con más eventos de antagonismo sobre su comunidad.**

***Bacillus licheniformis*** es otra especie descrita únicamente para el consorcio de *D. anchorata* con *biofouling*. De esta especie se ha descrito su actividad antibiofilm, dado que dentro de los EPS que produce, existen compuestos que desestabilizan las propiedades de tensión y viscosidad, necesarios para estratificar al consorcio (Sayem *et al.*, 2011). En nuestra investigación no reportamos ninguna actividad inhibitoria de *biofilm* o productora de sustancias antagónicas, pero, reportamos susceptibilidad a sustancias antagónicas producidas por *B. altitudinis*, *B. mycoides* y *B. haikouensis*. La formación de EPS sucede tras la adhesión de la célula planctónica a una superficie enriquecida con los nutrientes esenciales para el asentamiento y proliferación de la población bacteriana (Dobretsov *et al.*, 2009; Sayem *et al.*, 2011). En presencia de organismos que ejercen actividad antagónica, estos microorganismos no pueden aumentar en densidad poblacional como para generar un impacto sobre la formación del *biofilm* existente, situación que puede explicar por qué, aunque *B. licheniformis* participa del consorcio asociado a *D. anchorata*, no desestabiliza el *biofilm* ya maduro que sostiene la epibiosis encontrada.

***Bacillus altitudinis***, del que reportamos tres cepas determinadas con este nivel taxonómico, fue descrita por primera vez tras su aislamiento de muestras de aire en grandes altitudes desde la NASA, E.E.U.U (Sunar, *et al.*, 2013). Esta especie puede producir sustancias promotoras de crecimiento en plantas y además, produce enzimas capaces de degradar plumaje de aves de corral, que se constituye como un desecho no reciclable a la fecha (Kumar *et al.*, 2011). Todas las cepas de esta especie presentaron actividad inhibitoria de la comunicación bacteriana fuerte y son antagónicas sobre una gran mayoría de los aislamientos obtenidos para el consorcio cultivable al que pertenece. **Con los resultados obtenidos, se propone que la especie *B. altitudinis*, puede ser un fuerte modulador del consorcio bacteriano, regulando un gran número de especies bacterianas**, desde su densidad poblacional dentro del consorcio como sus eventos de QS. Con este perfil se esperaba que *B. altitudinis* participara en la inhibición de la epibiosis, pero como

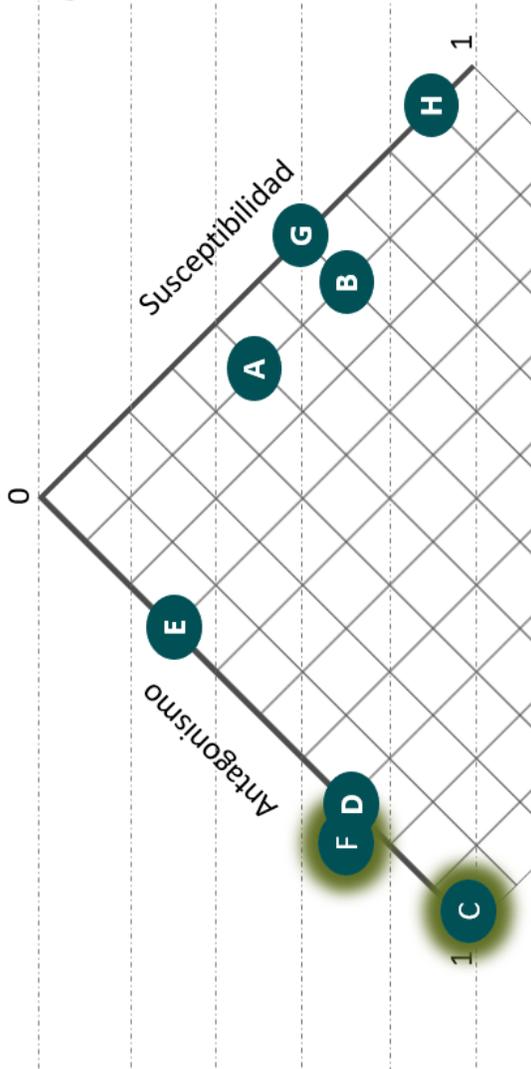
se ha mencionado en múltiples apartados, lo que realmente condiciona el perfil fenotípico expuesto por cada especie bacteriana participante es la comunidad en la que participa y la historia de la formación del nicho que puede mantener en baja densidad poblacional a especies tan importantes como esta, haciendo que sus fenotipos reguladores aquí expuestos no se manifiesten en una concentración suficiente para generar un cambio en el consorcio.

Dentro del consorcio asociado a *D. anchorata* también se encontraron especies que son compartidas por las comunidades cultivables asociadas a *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, que fueron relevantes por poseer actividad inhibidora de QS y antagonismo sobre una gran cantidad de aislamientos en su consorcio. Se describirán las cualidades bioquímicas relevantes en el contexto de cada consorcio bacteriano y cómo esta expresión génica podría ser modulada en estados de ausencia y presencia de *biofouling*:

***B. tequilensis*** ha sido descrito como una bacteria capaz de producir lacasas termorresistentes importantes para la degradación y recirculación de desechos vegetales (Sitarz *et al.*, 2016; Sondhi, *et al.*, 2014). Además, produce un lipopéptido biosurfactante capaz de alterar los EPS de las biopelículas bacterianas, interfiriendo con su maduración (Pradhan & Pradhan, 2013). *B. tequilensis* es reportada en este estudio como antagónica de varios *Bacillus*, y sobre *D. cinnamea* y *O. smirnovii*, especies participantes de su propio consorcio bacteriano, en el contexto de *D. anchorata* con *biofouling*. En el consorcio asociado a esponjas sin *biofouling*, *B. tequilensis* puede mantener activo su arsenal enzimático inhibiendo el asentamiento de algas, mientras en eventos de epibiosis debe encontrarse regulada por otras bacterias que mantienen su población reducida y junto con esto, su capacidad de actuar como toxina de macroalgas que se asienten. Adicionalmente, *B. tequilensis* ejerce actividad antagónica dentro del consorcio de *X. muta* Xm1 sin *biofouling*, sobre *B. haikouensis*, *B. firmus* y *B. zhangzhouensis*, este último siendo un antagónico fuerte sobre su comunidad. Ningún aislamiento del consorcio *X. muta* Xm1 sin *biofouling* ni de *D. anchorata* con *biofouling* puede ejercer antagonismo sobre *B. tequilensis*.

***B. haikouensis*** también es reportada como especie compartida de las comunidades cultivables asociadas a *X. muta* Xm1 sin *biofouling* y *D. anchorata* con *biofouling*. Ha sido aislada principalmente de cultivos de arroz y de ella no existen reportes a la fecha, de productos bioquímicos de relevancia ecológica o industrial. **En esta investigación reportamos la actividad inhibidora de QS en la cepa CCBDaBf-20 y su actividad antagónica sobre un gran número de aislamientos del consorcio asociado a *D. anchorata* con epibiosis, que lo caracteriza como un potencial modulador del consorcio bacteriano. Además, reportamos la actividad antagónica de la cepa CCBXm1-1 sobre *B. firmus* y *Bacillus qingshengii*. Además, *B. haikouensis* es susceptible a la actividad antagónica de *L. composti*, una especie bacteriana asociada a la comunidad de *X. muta* Xm1, una especie que ejerce actividad antagónica fuerte sobre la mayoría de los aislamientos del consorcio. En el consorcio asociado a *D. anchorata* con epibiosis, ningún aislamiento del grupo ejerce antagonismo sobre esta especie. Lo anterior demuestra que dependiendo el contexto de comunidad en que se encuentre, *B. haikouensis* puede considerarse un regulador potencial (en comunidad asociada a epibiosis) o un regulador medio (en comunidad asociada a ausencia de epibiosis). Dentro de los hallazgos, no se registra ninguna especie bacteriana cultivable común a las especies *A. insularis* y *D. anchorata*, ambas con *biofouling* en su superficie.**

Promoción de la formación de *biofilm*



Especie bacteriana	Convención
<i>Kocuria flava</i>	A
<i>Bacillus aryabhatai</i>	B
<i>Bacillus altitudinis</i>	C
<i>Bacillus mycoides</i>	D
<i>Bacillus tequilensis</i>	E
<i>Bacillus haikouensis</i>	F
<i>Bacillus licheniformis</i> **	G
<i>Bacillus oryzaecorticis</i>	H

**FIGURA 28. MODELO DE RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, SUSCEPTIBILIDAD E INHIBICIÓN DE QS PARA ESPECIES BACTERIANAS RELEVANTES EN LA COMUNIDAD ASOCIADA A *D. ANCHORATA* DABf SIN *BIOFOULING* (MODIFICADO DEL DIAGRAMA DE CLIMATOLOGÍA DE HOLDRIDGE) (DESCRIPCIÓN FIGURA 25.)**

Con las descripciones anteriores y sumado al modelo propuesto (Figura 28, pg. 148), encontramos que tal como los modelos de *X. muta* Xm1 y Xm2, existe una correlación entre los eventos de antagonismo, la susceptibilidad a este fenómeno y la producción de sustancias inhibitoras del QS, con la potencial regulación asociada a la no-maduración del *biofilm*; sin embargo, este modelo corresponde a una comunidad asociada a una esponja con *biofouling*. De nuevo se presentan especies con alta capacidad antagónica sin susceptibilidad por la actividad antagónica de otras de su consorcio, acompañadas por actividad inhibitora del QS; y encontramos especies con susceptibilidad media al antagonismo de su consorcio, con un perfil promotor de maduración del *biofilm* al que precisamente pertenecen.

Si este perfil es tan similar al de las comunidades asociadas a esponjas sin *biofouling*, pero este es parte de una comunidad con epibiosis, la explicación puede darse desde la comprensión de la densidad poblacional en la composición total de la comunidad. Todos esos actores antagónicos e inhibidores de QS sólo pueden ejercer su actividad reguladora si existe una densidad poblacional suficiente que permita una concentración de ese metabolito, tal que tenga actividad sobre la comunidad en la que interactúa. Entonces, estos perfiles reguladores están definidos desde su contexto de comunidad, sumado a los actores que lo acompañan, que pueden regular su población, así como la actividad de su metabolito. Entonces, en un contexto de *biofouling*, los antagónicos fuertes deben estar regulados desde su población y los que participan deben modular aislamientos que pongan en riesgo el equilibrio de la epibiosis; los inhibidores de QS, igual que en el modelo de *A. insularis* AiBf, deben estar súper-regulados y en caso de desarrollarse, deben ejercer presión sobre eventos de QS asociado a la producción de sustancias tóxicas para eucariotas o para procariotas de la comunidad.

El perfil de la comunidad asociada a *D. anchorata* es ejemplo de que los eventos de antagonismo, tanto como la susceptibilidad que las especies tengan a este, así como la producción de sustancias de inhibición del QS y la manifestación de perfiles

promotores de *biofilm*, existen, y se encuentran regulados por muchas más variables aún no descritas, junto a la presión del ambiente e incluso del hospedero, que hacen que las relaciones del holobionte sean aún más complejas y jerárquicas.

Un análisis sobre las especies bacterianas con perfiles bioquímicos relevantes a nivel ecológico y de bioprospección como el que se desarrolló anteriormente permite reconocer las características potenciales asociadas a cada microorganismo, diferentes del antagonismo y la inhibición del QS, y cómo pueden estar involucradas en la comunidad bacteriana, modificando su composición y modulando la manifestación de fenotipos que pueden poner en riesgo la homeostasis de la comunidad y del holobionte en general.

Como se mencionó al principio de la discusión, el número de aislamientos con capacidad antagónica y el número de eventos de antagonismo es similar para los dos grandes grupos (comunidades asociadas a esponjas con y sin *biofouling*), reiterando que no se desconoce la composición bacteriana particular de cada holobionte estudiado. Lo anterior es muestra de que el antagonismo, aunque presente en las cuatro comunidades bacterianas, puede estar inhibiendo la formación de *biofouling* por dos vías: En la primera, el consorcio bacteriano posee numerosas especies capaces de generar un mayor número de eventos antagónicos, sumado a pocos aislamientos con una actividad antagónica mayor sobre el resto del consorcio. En la segunda vía, existen pocos eventos de antagonismo realizado por pocos aislamientos bacterianos, pero estos poseen una actividad antagónica dominante sobre el consorcio, haciendo que no se requiera más de una población abundante y dominante con esta capacidad dentro de la comunidad, para regular eventos de maduración del *biofilm* bacteriano y promoción de factores necesarios formación de epibiosis.

El hecho de que exista actividad antagónica por parte de los aislamientos pertenecientes a la comunidad asociada a esponjas con *biofouling*, demuestra que la presencia de esta actividad en el consorcio no es suficiente para explicar la promoción o inhibición del asentamiento de organismos epibiontes sobre la superficie de las esponjas. Los eventos de antagonismo pueden estar involucrados

en el mantenimiento de la composición y densidad poblacional de cada bacteria participante en el consorcio sin que eso signifique la imposibilidad de formar biopelículas que sustenten el *biofouling*.

A pesar de que se reportan sólo dos aislamientos con capacidad de producir moléculas tipo AHL, el evidenciar este fenómeno en bacterias asociadas únicamente a esponjas con *biofouling* revela la importancia del QS dentro de un consorcio que debe complejizarse para madurar al punto de que pueda sostener una comunidad epibionte sobre sí. La comunicación mediada por moléculas tipo AHL ha sido ampliamente estudiada y se relaciona con la capacidad de formar biopelículas y con la promoción de nuevas respuestas de las poblaciones bacterianas con el medio, complejizando al consorcio bacteriano que empezará a producir metabolitos esenciales y moléculas de señalización que incorporarán nuevas especies eucariotas y procariotas participantes del *biofouling*.

Los hallazgos de este estudio permiten reflexionar acerca de las herramientas que puede tener una comunidad bacteriana para modular su riqueza, la abundancia de sus poblaciones y la dominancia de ciertas especies, así como puede regular la manifestación de ciertos fenotipos como la formación de *biofilm*, producción de factores de virulencia y asimilación de nutrientes necesarios para el consorcio. Se logró demostrar que los eventos de comunicación celular vía AHLs, inhibición del QS y antagonismo se encuentra presentes en las cuatro comunidades bacterianas cultivables, y que esto configura un registro importante de los mecanismos que existen dentro de los consorcios bacterianos asociados a organismos marinos como esponjas, para modificar tanto su composición como su comportamiento social. Sin embargo, la simple existencia de estos fenómenos de relaciones sociales en un nicho bacteriano no explica los estados de epibiosis y ausencia de este sobre las esponjas marinas. Se requiere un mayor conocimiento del contexto de la comunidad bacteriana asociada a los poríferos, su composición y el estado de homeostasis del holobionte que implica además de su microbiota simbiote, el estado del individuo hospedero y las condiciones climáticas y fisicoquímicas que puedan relacionarse al estado del holobionte en el momento de su observación.

Este trabajo es importante porque se configura como uno de los primeros estudios de bacterias cultivables aisladas de esponjas marinas con dos estados, con y sin *biofouling*, de las cuales no sólo se reporta su caracterización taxonómica, sino, además, se registran fenómenos de relaciones sociales bacterianas *in vitro* como la inhibición de la comunicación bacteriana frente al biosensor *C. violaceum* ATCC31532, la producción de moléculas de comunicación celular tipo AHLs y la actividad antagónica de aislamientos bacterianos frente a otros de su mismo consorcio. La información obtenida en este estudio es trascendental para el conocimiento de las relaciones ecológicas de las comunidades bacterianas asociadas a organismos marinos como las esponjas y va más allá del reporte de la presencia de algunas bacterias pertenecientes al consorcio, ofreciendo evidencia *in vitro* de cepas bacterianas con perfiles bioquímicos de interés ecológico, industrial y farmacológico que pueden ser investigados con mayor profundidad en futuras investigaciones por la comunidad científica interesada en este campo de la microbiología.

## IX. CONCLUSIONES

Esta investigación es la primera en el mundo en evaluar la composición de las comunidades bacterianas cultivables asociadas a esponjas del caribe colombiano, que además incluye la descripción de fenotipos importantes para la regulación del consorcio simbiote, como lo son la producción de moléculas señal tipo AHL involucradas en QS, la producción de sustancias inhibidoras de QS y las interacciones antagónicas entre aislamientos de un mismo nicho.

A nivel taxonómico, se lograron describir 94 aislamientos bacterianos mediante la amplificación, secuenciación y análisis del gen ribosomal 16S, encontrando que los filos dominantes son Firmicutes (con géneros como *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Exiguobacterium*) y Actinobacteria (con los géneros *Micrococcus*, *Microbacterium* y *Arthrobacter*, entre otros). Del filo Proteobacteria reportamos únicamente 6 aislamientos pertenecientes a los géneros *Paracoccus*, *Pseudomonas* y *Oceanimonas*.

Reportamos por primera vez que las especies *Pseudomonas oceani* y *Pseudomonas stutzeri* producen moléculas señal tipo AHL, con una longitud probable de C6-AHL, C8-AHL, C8-3-oxo-AHL, C10-AHL, C10-3-oxo-AHL, C12-AHL y C12-3-oxo-AHL, y además produce moléculas tipo C6-3-oxo-AHL, que fueron detectadas por los biosensores pSB-401, pSB-403 y W19 con alta sensibilidad a este tipo de moléculas señal. Gracias a su perfil metabólico y su capacidad de realizar QS, estas especies se posicionan como promotoras del *biofouling*, al contribuir con la maduración y aumento de la complejidad del consorcio bacteriano al que pertenecen.

Adicionalmente, describimos que 25 aislamientos poseen actividad inhibidora de QS y para la gran mayoría de las especies con este fenotipo (como las especies *B. zhangzhouensis*, *Rummeliibacillus stabekisii* y *B. haikouensis*, por ejemplo), se trata del primer reporte de este fenómeno en literatura.

Con los ensayos de interacciones antagónicas logramos describir varias especies con actividad inhibidora del crecimiento bacteriano sobre otras de su mismo nicho,

realizando los primeros reportes de antagonismo para un gran número de especies bacterianas, sumado a la caracterización de interacciones antagónicas específicas que tampoco han sido reportadas a la fecha.

Tras la evaluación de la inhibición de QS y la capacidad antagónica de los aislamientos en estudio, encontramos que estos perfiles son diferentes por especie y que existen especies más antagónicas que otras o especies que poseen ambos mecanismos de regulación, e incluso reportamos especies que poseen un alto nivel de antagonismo, pero no son susceptibles a ninguna sustancia inhibidora de los otros aislamientos de su nicho. Esos perfiles disímiles permiten pensar en un modelo biológico donde todas las especies con capacidad antagónica e inhibidora ejercen cierto tipo de regulación jerárquica, en donde especies como *B. paralicheniformis*, *B. zhangzhouensis* y *B. rhizosphaerae* (por mencionar algunas muy relevantes), ejercen mayor modulación poblacional en el consorcio, al producir sustancias a las que son susceptibles un mayor número de especies de su nicho. Otras especies con capacidad antagónica media y capacidad inhibidora del QS (como *B. paramycoides* y *B. cereus*) pueden modular el nicho alterando otros comportamientos de algunas poblaciones y sobre especies específicas, ubicándolos en un nivel medio de la jerarquía de regulación.

La información contenida en esta investigación permitió determinar que los fenómenos de antagonismo e inhibición del QS existen en los consorcios bacterianos estudiados y que estos pueden estar modulando potencialmente la composición y comportamiento de la comunidad a la que pertenecen. La diferencia no fue estadísticamente significativa entre los eventos de inhibición y antagonismo para las comunidades con y sin *biofouling*, demostrando que estos eventos convergen en un modelo mucho más complejo y jerarquizado que debe involucrar involucra otras variables también reguladoras que contribuyen de forma significativa al estado de la comunidad bacteriana, respondiendo a presiones espaciotemporales en cada contexto.

La heterogeneidad en la composición de un *biofilm* o una comunidad bacteriana trae consigo propiedades emergentes que no son explicables por la suma de los perfiles

bioquímicos de cada elemento del consorcio. Estas propiedades se explicarían gracias a la comprensión sistémica que involucra a las especies que componen la microbiota, a su respuesta al ambiente y a las poblaciones bacterianas que colonizan y se desarrollan en la comunidad. Así como a los eventos sinérgicos o restrictivos que se manifiestan frente a un estímulo externo o del hospedero, complejizando el comportamiento del holobionte, que adquirirá nuevas características como resultado de las interacciones antes mencionadas.

## X. RECOMENDACIONES

\* Se recomienda hacer un análisis más detallado de las cepas cuya asignación taxonómica solo pudo llegar a género, usando técnicas de análisis genómico, hibridación DNA-DNA, análisis de %CG, análisis de constitución de ácidos grasos y proteínas en pared celular y análisis AiiA. El uso de estas metodologías es necesario para evaluar si las cepas antes mencionadas corresponden a nuevos registros.

\* Al detectar producción de moléculas tipo AHL por parte de dos cepas de *P. oceanii* y *P. stutzeri*, es necesario realizar una caracterización más profunda con metodologías de mayor sensibilidad como GC-MS o HPLC, que permitan la identificación de la estructura química de estas moléculas señal, lo que alimentaría este primer reporte cualitativo usando biosensores sensibles a este tipo de moléculas.

\* Además de la caracterización de producción de sustancias antagónicas e inhibidoras de la comunicación celular, es importante evaluar otras características metabólicas mediante el uso de pruebas bioquímicas que permitan, junto a los reportes bibliográficos, completar el perfil potencial de cada cepa bacteriana en el modelo biológico del consorcio bacteriano en el que participa.

\*Se propone caracterizar las moléculas responsables de producir antagonismo e inhibición del QS por parte de los aislamientos que dieron resultados positivos para estos ensayos. La información que pueda obtenerse no sólo explicará la sensibilidad específica por parte de los aislamientos susceptibles dentro del mismo consorcio, sino que además permitirá evaluar junto a técnicas independientes de cultivo, qué otras especies bacterianas pueden ser potencialmente reguladas por las especies aquí descritas y de qué manera lo hace.

\*Se recomienda que con la información obtenida en esta investigación y con la suma de nuevos ensayos sobre los aislamientos bacterianos descritos así como caracterizaciones de las esponjas hospederas, se fortalezca el modelo gráfico propuesto en este estudio, buscando una descripción más robusta y consistente de la regulación que realiza el consorcio dentro del él mismo.

\*Recomendamos seguir investigando en el área de la ecología microbiana asociada a organismos marinos, no sólo la composición de la comunidad bacteriana sino los perfiles bioquímicos presentes que puedan ofrecerse como servicios ecosistémicos para el holobionte, el ecosistema en general y para futuros avances tecnológicos, que permita la elaboración de modelos bio-ecológicos más completos para predecir comportamientos a través del tiempo y cambiando factores fisicoquímicos, de cara no sólo al conocimiento académico sino a dar respuesta a problemáticas de interés social, económico y ecológico que le competan.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. A. Y., & Amran, A. M. (2018). *Bacillus pumilus* isolated from healthy honey bees and its effects on some biological aspects in mice. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(10), 50–57.  
<https://doi.org/10.20959/wjpr201810-12327>
- Abdelmohsen, U., Bayer, K., & Hentschel, U. (2014). Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Natural Product Reports*, 31(3), 381–399. <https://doi.org/10.1039/c3np70111e>
- AlAbbas, F., Williamson, C., Bholá, S. M., Spear, J. R., Olson, D. L., Mishra, B., & Kakpovbia, A. E. (2013). Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78, 34–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.10.014>
- 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>
- Altinyay, C., Eryilmaz, M., Yazgan, A., & Yilmaz, B. (2015). Antimicrobial Activity of Some *Alnus* Species. *European Review for Medical and Pharmacological Science*, 19(January), 4671–4674.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Sahu, S. K., & Balasubramanian, T. (2014). Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. *Process Biochemistry*, 8.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.007>
- Arslan, S., & Buyser, D. (2019). Molecular Characterization and Toxin Profiles of *Bacillus* spp. Isolated from Retail Fish and Ground Beef. *Journal of Food Science*, 0(0). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14445>
- Aslim, B., Saglam, N., & Beyatli, Y. (2002). Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. *Turk J Biol*, 26, 41–48.
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>

- Batista, D., Costa, R., Carvalho, A., Batista, W., Rua, C., de Oliveira, L., ... Dobretsov, S. (2018). Environmental conditions affect activity and associated microorganisms of marine sponges. *Marine Environmental Research*, 09(20). <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.020>
- Batista, D., Costa, R., Polycarpa, A., Romão, W., Rua, C. P. J., Oliveira, L. De, ... Dobretsov, S. (2018). Environmental conditions affect activity and associated microorganisms of marine sponges. *Marine Environmental Research*, 142(April), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.020>
- Bay, A., Matobole, R. M., Zyl, L. J. Van, Parker-nance, S., Davies-coleman, M. T., & Trindade, M. (2016). Antibacterial Activities of Bacteria Isolated from the Marine Sponges *Isodictya compressa* and *Higginsia bidentifera* Collected from Algoa Bay, South Africa. *Marine Drugs*, 15(47), 8–10. <https://doi.org/10.3390/md15020047>
- Bell, J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3), 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.05.002>
- Berry, M. A., Davis, T. W., Cory, R. M., Duhaime, M. B., Johengen, T. H., Kling, G. W., ... Deneff, V. J. (2017). Cyanobacterial harmful algal blooms are a biological disturbance to Western Lake Erie bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 19(3), 1149–1162. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13640>
- Biswa, P., & Doble, M. (2013). Production of acylated homoserine lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiology Letters*, 343(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12123>
- Bixler, G. D., & Bhushan, B. (2012). Biofouling: Lessons from nature. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 370(1967), 2381–2417. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0502>
- Bodelón, G., Montes-García, V., López-Puente, V., Hill, E. H., Hamon, C., Sanz-Ortiz, M. N., ... Liz-Marzán, L. M. (2016). Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nature Materials*, 15(11), 1203–1211. <https://doi.org/10.1038/nmat4720>

- Borges, A., & Simoes, M. (2019). Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria. *Marine Drugs*, *17*, 427.
- Bose, U., Ortori, C. A., Sarmad, S., Barrett, D. A., Hewavitharana, A. K., Hodson, M. P., ... Shaw, P. N. (2017). Production of N-acyl homoserine lactones by the sponge-associated marine actinobacteria *Salinispora arenicola* and *Salinispora pacifica*. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(2), 1–7.  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx002>
- 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>
- Boyett, H. V., Bourne, D. G., & Willis, B. L. (2007). Elevated temperature and light enhance progression and spread of black band disease on staghorn corals of the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, *151*(5), 1711–1720.  
<https://doi.org/10.1007/s00227-006-0603-y>
- Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design*, *21*, 5–11.
- Brinkmann, C., Kearns, P., & Evans-illidge, E. (2017). Diversity and Bioactivity of Marine Bacteria Associated with the Sponges *Candidaspongia flabellata* and *Rhopaloeides odorabile* from the Great Barrier Reef. *Diversity*, *9*(39), 2–26.  
<https://doi.org/10.3390/d9030039>
- Bulushi, A., Poole, S., Deeth, H., & Dykes, G. (2018). Evaluation the spoilage and biogenic amines formation potential of marine Gram-positive bacteria. *International Food Research Journal*, *25*(October), 2143–2148.
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. (2011). Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME Journal*, *5*(4), 590–600.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.164>
- Busse, H., Ludwig, W., Ka, P., Tindall, B. J., & Rossello, R. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*, 249–266.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>

- 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*, *91*(February), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.02.007>
- Cao, S., Wang, J., Haosheng, C., & Darong, C. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, *56*(7), 598–612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J., ... Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, *44*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>
- Cárdenas, A., Rodríguez-R, L. M., Pizarro, V., Cadavid, L. F., & Arévalo-Ferro, C. (2011). Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *The ISME Journal*, *6*(3), 502. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.123>
- Cárdenas, A., Rodríguez-R, L., Pizarro, V., Cadavid, L., & Arévalo-Ferro, C. (2012). Shifts in Bacterial Communities of Two Caribbean Reef-Building Coral Species Affected by White Plague Disease. *ISME Journal*, *6*(3), 502–512. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.123>
- Castro, P., Mendoza, L., Vásquez, C., Pereira, P. C., Navarro, F., Lizama, K., ... Cotoras, M. (2019). Antifungal Activity against *Botrytis cinerea* of 2,6-Dimethoxy-4-(phenylimino)cyclohexa-2,5-dienone Derivatives. *Molecules*, *24*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040706>
- Cebrian, E., Uriz, M. J., Garrabou, J., & Ballesteros, E. (2011). Sponge mass mortalities in a warming mediterranean sea: Are cyanobacteria-harboring species worse off? *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020211>
- Cerqueda-García, D., & Falcón, L. (2016). La construcción del nicho y el concepto de holobionte, hacia la reestructuración de un paradigma. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *87*, 239–241. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.11.001>
- Chang, S., Chen, X., Jiang, S., Chen, J., & Shi, L. (2017). Using micro-patterned

- surfaces to inhibit settlement and biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(7), 608–620.  
<https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0463>
- Cheng, Y., Xiao, X., Li, X., Song, D., Lu, Z., Wang, F., & Wang, Y. (2017). Characterization, antioxidant property and cytoprotection of exopolysaccharide-capped elemental selenium particles synthesized by *Bacillus paralicheniformis* SR14. *Carbohydrate Polymers*, 114(8).  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.124>
- Chhabra, S. R., Ca, M., & Williams, P. (2005). N -Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*, 151, 3313–3322. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27961-0>
- Cita, Y., Suhermanto, A., Radjasa, O., & Sudharmono, P. (2017). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.024>
- Cobet, A., Wirsén, C., & Jones, G. (1970). The Effect of Nickel on a Marine Bacterium *Arthrobacter marinus* sp.nov. *Journal of General Microbiology*, 62, 159–169.
- Collins, F. W. J., Connor, P. M. O., Sullivan, O. O., Rea, M. C., Hill, C., Ross, R. P., & Ross, R. P. (2016). Formicin – a novel broad-spectrum two- component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576, 1662–1671.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000340>
- Collins, M. D., Jones, D., Keddie, R. M., Kroppenstedt, R. M., & Schleifer, K. H. (1983). Classification of Some Coryneform Bacteria in a New Genus *Aureobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 252(4), 236–252.  
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80053-8)
- Costantino, V., Sala, G. Della, Saurav, K., Teta, R., Bar-shalom, R., Mangoni, A., & Steindler, L. (2017). Plakofuranolactone as a Quorum Quenching Agent from the Indonesian Sponge *Plakortis* cf. *lita* many. *Marine Drugs*, 15(99), 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/md15030059>

- Dahms, H. U., & Dobretsov, S. (2017). Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/md15090265>
- de Voogd, N. J., Cleary, D. F. R., Polónia, A. R. M., & Gomes, N. C. M. (2015). Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv019>
- Defoirdt, T., Brackman, G., & Coenye, T. (2013). Quorum sensing inhibitors: How strong is the evidence? *Trends in Microbiology*, 21(12), 619–624. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.09.006>
- Deignan, L. K., Pawlik, J. R., & Erwin, P. M. (2018). Agelas Wasting Syndrome Alters Prokaryotic Symbiont Communities of the Caribbean Brown Tube Sponge, *Agelas tubulata*. *Microbial Ecology*, 76(2), 459–466. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1135-3>
- Deignan, L., & Pawlik, J. R. (2016). Demographics of the Caribbean brown tube sponge *Agelas tubulata* on Conch Reef, Florida Keys, and a description of Agelas Wasting Syndrome (AWS). *Proc 13th ICRS, Honolulu*, 4(June), 72.
- Delauney, L., Compare, C., & Lehaitre, M. (2010). Biofouling protection for marine environmental sensors. *Ocean Science*, 6(2), 503–511. <https://doi.org/10.5194/os-6-503-2010>
- Denikina, N. N., Dzyuba, E. V., Bel'kova, N. L., Khanaev, I. V., Feranchuk, S. I., Makarov, M. M., ... Belikov, S. I. (2016). The first case of disease of the sponge *Lubomirskia baicalensis*: Investigation of its microbiome. *Biology Bulletin*, 43(3), 263–270. <https://doi.org/10.1134/S106235901603002X>
- Dickschat, J. S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Product Reports*, 27(3), 343–369. <https://doi.org/10.1039/b804469b>
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., & Paul, V. (2011). Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 7014, 892–905. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.609616>
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., & Paul, V. J.

- (2011). Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(8), 893–905. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.609616>
- Dobretsov, S., Teplitski, M., & Paul, V. (2009). Quorum Sensing in the Marine Environment and Its Relationship to Biofouling. *Biofouling*, 25(5), 413–427. <https://doi.org/10.1080/08927010902853516>
- Dong, Y., Wang, L., Zhang, H., Zhang, X., & Zhang, L. (2001). Quenching quorum-sensing- dependent bacterial infection by an N -acyl homoserine lactonase. *Letters for Nature*, 411(June).
- Dong, Y., Xu, J., Li, X., & Zhang, L. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3526–3531. <https://doi.org/10.1073/pnas.060023897>
- 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)
- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2012). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22, 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Dunbar, I., Philp, J., Kuyukina, M., Ivshina, B., Wray, V., & Lang, S. (2002). Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 318–324. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1018-4>
- Dunlap, C. A., Kwon, S., Rooney, A. P., Kim, S., & Kim, S. (2019). *Bacillus paralicheniformis* sp . nov ., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2015), 3487–3492. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000441>
- Easson, C. G., & Thacker, R. W. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in*

- Microbiology*, 5(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00532>
- Egan, S., James, S., Holmstro, C., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2001). Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(August), 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00789.x>
- Encarnacion, R. D., Sandoval, E., Malmstrøm, J., & Christophersen, C. (2000). Calafianin , a Bromotyrosine Derivative from the Marine Sponge *Aplysina Gerardogreeni*. *Journal of Natural Products*, 63(6), 874–875.
- Faria, F., Vollú, E., & Jurelevicius, D. (2016). Whole-Genome Sequence of *Rummeliibacillus stabekisii* Strain PP9 Isolated from Antarctic Soil. *Genome Announcements*, 4(3), 9–10. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00416-16>. Copyright
- Ferenci, T. (2008). The spread of a beneficial mutation in experimental bacterial populations : the influence of the environment and genotype on the fixation of *rpoS* mutations. *Nature Publishing Group*, 100, 446–452. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801077>
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., & Hentschel, U. (2004). Discovery of the Novel Candidate Phylum “Poribacteria” in Marine Sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3724>
- Fiore, C. L., Labrie, M., Jarett, J. K., & Lesser, M. P. (2015). Transcriptional activity of the giant barrel sponge, *Xestospongia muta* Holobiont: Molecular evidence for metabolic interchange. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00364>
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & de Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling*, 28(7), 649–669. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fonteneau, A., Chatssot, E., Ortega-García, S., Delgado, A., & Bez, N. (2010). On the use of the Finetti ternary diagrams to show the species composition of free

- and fad associated tuna schools in the Atlantic and Indian oceans. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 65(January), 546–555.
- Franco, Á., Arevalo-Ferro, C., & Cadavid, L. F. (2015). *Influencia de moléculas del Quorum Sensing producidas por bacterias simbiotas de las conchas del cangrejo Pagurus longicarpus sobre larvas de Hydractinia symbiolongicarpus*. Universidad Nacional de Colombia.
- Franco, Á., Cadavid, L., & Arévalo-ferro, C. (2019). Biopelículas y extractos de bacterias que producen moléculas de señalización de “Quorum Sensing” promueven comportamientos de quimiotaxis y asentamiento en larvas de *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). *Acta Biológica Colombiana*, 24(1), 150–162.
- Friedrich, A. B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J., & Hentschel, U. (2001). Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(2–3), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00185-4)
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Garge, S. S., & Nerurkar, A. S. (2016). Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLoS ONE*, 11(12), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167344>
- Gil-Agudelo, D. L., Navas-Camacho, R., Rodríguez-Ramírez, A., Reyes- Nivia, M. C., Bejarano, S., Garzón-Ferreira, J., & Smith, G. W. (2009). Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38(1037), 189–224.
- Gilan, O., Hadar, Y., & Sivan, A. (2004). Colonization , biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 64, 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8>

- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. (2010). Chemical Interactions Between Marine Macroalgae and Bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 409(6), 267–300. <https://doi.org/10.3354/meps08607>
- Gómez-Garzón, C., & Dussán, J. (2017). Evidence-based validation of quorum quenching from *Lysinibacillus sphaericus* and *Geobacillus* sp. in bioremediation of oil sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(1), 74–82. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0323>
- González-Rivero, M., Yakob, L., & Mumby, P. J. (2011). The role of sponge competition on coral reef alternative steady states. *Ecological Modelling*, 222(11), 1847–1853. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.03.020>
- Guillonneau, R., Baraquet, C., Bazire, A., & Molmeret, M. (2018). Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01960>
- Gutierrez, J., Paragues, M., Dobson, A., & O’Gara, F. (2019). Genome Sequence of *Paracoccus* sp. JM45, a Bacterial Strain Isolated from a Marine Sponge with a Dual Quorum Sensing Inhibition Activity. *Microbiology Resource Announcements*, (October 2018), 1–3.
- Hadaidi, G., Ziegler, M., Shore-Maggio, A., Jensen, T., Aeby, G., & Voolstra, C. R. (2018a). Ecological and molecular characterization of a coral black band disease outbreak in the Red Sea during a bleaching event. *PeerJ*, 6, e5169. <https://doi.org/10.7717/peerj.5169>
- Hadaidi, G., Ziegler, M., Shore-Maggio, A., Jensen, T., Aeby, G., & Voolstra, C. R. (2018b). Ecological and Molecular Characterization of a Coral Black Band Disease Outbreak in the Red Sea During a Bleaching Event. *PeerJ*, 6(2), 1–27. <https://doi.org/10.7717/peerj.5169>
- Hamedi, J., Kafshnouchi, M., & Ranjbaran, M. (2019). A Study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1587–1595. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.010>
- Hamilton, T. L., Bryant, D. A., & Macalady, J. L. (2016). The role of biology in

- planetary evolution : cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environmental Microbiology*, 18, 325–340.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13118>
- Harder, T., Campbell, A. H., Egan, S., & Steinberg, P. D. (2012). Chemical Mediation of Ternary Interactions Between Marine Holobionts and Their Environment as Exemplified by the Red Alga *Delisea pulchra*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(5), 442–450. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0119-5>
- Hardoim, C., Costa, R., Arau, F. V., Hajdu, E., Peixoto, R., & Lins, U. (2009). Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3331–3343.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02101-08>
- Hayat, R., Ahmed, I., & Paek, J. (2014). *Lysinibacillus composti* sp. nov., isolated from compost. *Annals of Microbiology*, 64, 1081–1088.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0747-1>
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., & Horn, M. (2003). Microbial Diversity of Marine Sponges. *Sponges (Porifera)*, 2003, 59–88. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55519-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55519-0_3)
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S., & Taylor, M. (2012). Genomic Insights Into the Marine Sponge Microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641–654.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2839>
- 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*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 305–312.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00110-6)
- Hoffmann, F., Radax, R., Woebken, D., Holtappels, M., Lavik, G., Rapp, H. T., ... Kuypers, M. M. M. (2009). Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2228–2243.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01944.x>
- Holliday, N. P., Yelland, M. J., Pascal, R., Swail, V. R., Taylor, P. K., Griffiths, C.

- R., & Kent, E. (2006). Were extreme waves in the Rockall trough the largest ever recorded? *Geophysical Research Letters*, *33*(5), 2–5.  
<https://doi.org/10.1029/2005GL025238>
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., & Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology*, *41*(1), 47–58.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00239-8)
- Hou, J., Wang, C., Rozenbaum, R. T., Gusnaniar, N., de Jong, E. D., Woudstra, W., ... van der Mei, H. C. (2019). Bacterial Density and Biofilm Structure Determined by Optical Coherence Tomography. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46196-7>
- Hou, X., Kawamura, Y., Sultana, F., & Shu, S. (1998). Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. nov., isolated from human urine. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*(1 998), 423–429.
- Høyland-kroghsbo, N. M., Paczkowski, J., Mukherjee, S., Broniewski, J., & Westra, E. (2017). Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system, *114*(1), 131–135.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1617415113>
- Huang, R. Y., Chen, W. T., Kurtán, T., Mándi, A., Ding, J., Li, J., ... Guo, Y. W. (2016). Bioactive isoquinolinequinone alkaloids from the South China Sea nudibranch *Jorunna funebris* and its sponge-prey *Xestospongia* sp. *Future Medicinal Chemistry*, *8*(1), 17–27. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.169>
- Hunting, E. R., Franken, O., Knopperts, F., Kraak, M. H. S., Vargas, R., Röling, W. F. M., & Van Der Geest, H. G. (2013). Substrate as a driver of sponge distributions in mangrove ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, *486*, 133–141. <https://doi.org/10.3354/meps10376>
- Hwang, C. Y., Lee, I., Cho, Y., Lee, Y. M., Baek, K., Jung, Y., ... Lee, H. K. (2019). *Rhodococcus aerolatus* sp. nov., isolated from subarctic rainwater, (2015), 465–471. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070086-0>
- Ineichen, R., & Batschelet, E. (1975). Genetic Selection and De Finetti Diagrams. *Journal of Mathematical Biology*, *39*(2), 33–39.

- Ivanova, E. P., Onyshchenko, O. M., Christen, R., Zhukova, N. V., Lysenko, A. M., Shevchenko, L. S., ... Kiprianova, E. A. (2005). *Oceanimonas smirnovii* sp. nov., a novel organism isolated from the Black Sea, 28, 131–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.11.002>
- Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. (2005). Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, 50(3), 340–343.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.012>
- Jeswani, H., & Mukherji, S. (2013). International Biodeterioration & Biodegradation Batch studies with *Exiguobacterium aurantiacum* degrading structurally diverse organic compounds and its potential for treatment of biomass gasification wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 80, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.002>
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., & Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE*, 6(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018514>
- Joint, I., Tait, K., Callow, M. E., Callow, J. A., Milton, D., Williams, P., & Ca, M. (2002). Cell-to-Cell Communication Across the Prokaryote-Eukaryote Boundary. *Science*, 298(November), 1207.  
<https://doi.org/10.1126/science.1077075>
- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors : An overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224–245. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
- Kelly, S. R., Jensen, P. R., Henkel, T. P., Fenical, W., & Pawlik, J. R. (2003). Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquatic Microbial Ecology*, 31(2), 175–182. <https://doi.org/10.3354/ame031175>
- Kerekes, E. B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 933–942.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12289>
- Kim, S., Lee, S., Hong, S., Oh, Y., Seoul, M., Kweon, J., & Kim, T. (2009). Biofouling of reverse osmosis membranes: Microbial quorum sensing and

- fouling propensity. *Desalination*, 247(1–3), 303–315.  
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.12.033>
- Kiran, G. S., Sekar, S., Ramasamy, P., Thinesh, T., Hassan, S., Lipton, A. N., ... Selvin, J. (2018). Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. *Marine Environmental Research*, 140(November 2017), 169–179.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.017>
- Kirschner, C. M., & Brennan, A. B. (2012). Bio-Inspired Antifouling Strategies. *Annual Review of Materials Research*, 42(1), 211–229.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070511-155012>
- Klaus, J. S., Janse, I., & Fouke, B. W. (2011). Coral Black Band Disease Microbial Communities and Genotypic Variability of the Dominant Cyanobacteria (CD1C11). *Bulletin of Marine Science*, 87(4), 795–821.  
<https://doi.org/10.5343/bms.2010.1050>
- Koch, A. L., Busse, H., Wieser, M., & Buczolits, S. (2012). Arthrobacter. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00118>.
- Konstantinidis, K. T., Rosselló-móra, R., & Amann, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *Nature Publishing Group*, 11(11), 2399–2406. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.113>
- 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>
- Kumar, S., Costantino, V., Venturi, V., & Steindler, L. (2017). Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial N-acyl-homoserine lactone-based biosensors. *Marine Drugs*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/md15030053>
- Kumar, V., Srijana, M., Chaitanya, K., Harish, Y., Reddy, K., & Reddy, G. (2011). *Biodegradation of poultry feathers by a novel bacterial isolate Bacillus altitudinis GVC11. Indian Journal of Biotechnology* (Vol. 10).
- Kvennefors, C., Sampayo, E., Kerr, C., Vieira, G., Roff, G., & Barnes, A. C. (2012).

- Regulation of Bacterial Communities Through Antimicrobial Activity by the Coral Holobiont. *Microbial Ecology*, 63(3), 605–618.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-011-9946-0>
- Kvennefors, E. C. E., Sampayo, E., Ridgway, T., Barnes, A. C., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Bacterial Communities of Two Ubiquitous Great Barrier Reef Corals Reveals Both Site-and Species-Specificity of Common Bacterial Associates. *PLoS ONE*, 5(4), 1–14.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010401>
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510–547. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00047-05>
- Lam, C., Cadelis, M., & Copp, B. (2017). Exploration of the influence of spirodienone moiety on biological activity of the cytotoxic marine alkaloid discorhabdin P. *Tetrahedron*, 73(32), 4779–4785.  
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.06.057>
- Lane, D. J. (1991). *16/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons.
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73–111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
- Lee, J., Lee, K., & Kuppasany, H. (2011). *Bacillus rhizosphaerae* sp. nov., an novel diazotrophic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100, 437–444. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9600-3>
- Lee, J., & Zhang, L. (2014). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F., Al-Suwailem, A., & Qian, P. Y. (2011). Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *ISME Journal*, 5(4), 650–664.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.165>
- Lee, Y. M., Cho, K. H., Hwang, K., Kim, E. H., Kim, M., Hong, S. G., & Lee, H. K. (2016). Succession of bacterial community structure during the early stage of

- biofilm development in the Antarctic marine environment. *Korean Journal of Microbiology*, 52(1), 49–58. <https://doi.org/10.7845/kjm.2016.6005>
- Leoni, L., & Rampioni, G. (2018). *Quorum Sensing: Methods and Protocols* (Vol. 1673). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7309-5>
- Leyton, Y., Letelier, A., Mata, M. T., & Riquelme, C. (2017). Bacillus pumilus marinos inhibidores de la fijación de microalgas a sustratos artificiales. *Informacion Tecnologica*, 28(2), 181–190. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200019>
- Li, C. W., Chen, J., & Hua, T. (1998). Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, 279(5352), 879–882. <https://doi.org/10.1126/science.279.5352.879>
- Li, Z. (2019). *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*. *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals* (Marine Bio). <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1>
- Lin, Y., Xu, J., Hu, J., Wang, L., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*, 47, 849–860.
- Liu, B., Liu, G., Sengonca, C., Schumann, P., Wang, J., Zhu, Y., ... Wang, M. (2018). Bacillus praedii sp. nov., isolated from purplish paddy soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 67, 2823–2828. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002030>
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2019). Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 67, 2499–2508. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013). Phylogenetic diversity of the Bacillus pumilus group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE*, 8(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2017). Genetic diversity and population structure of the Bacillus cereus group bacteria from diverse marine environments. *Scientific Reports*, (March), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00817-1>

- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2018). *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2016), 1193–1199. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000856>
- Liu, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2019). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 68, 106–112. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>
- Lowery, C. A., Dickerson, T. J., & Janda, K. D. (2008). Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chemical Society Reviews*, 37(7), 1337–1346. <https://doi.org/10.1039/b702781h>
- Luter, H. M., Bannister, R. J., Whalan, S., Kutti, T., Pineda, M. C., & Webster, N. S. (2017). Microbiome analysis of a disease affecting the deep-sea sponge *Geodia barretti*. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6), 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix074>
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
- Mandal, K., Singh, B., Jariyal, M., & Gupta, V. K. (2014). Chemosphere Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. *Chemosphere*, 101, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.043>
- Mangano, S., Caruso, C., Michaud, L., & Lo Giudice, A. (2018). First evidence of quorum sensing activity in bacteria associated with Antarctic sponges. *Polar Biology*, 41(7), 1435–1445. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2296-3>
- Mangano, S., Michaud, L., Caruso, C., Brilli, M., Bruni, V., Fani, R., & Lo Giudice, A. (2009). Antagonistic interactions between psychrotrophic cultivable bacteria isolated from Antarctic sponges: a preliminary analysis. *Research in Microbiology*, 160(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.013>
- McLean, R. J. C., Pierson, L. S., & Fuqua, C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological*

- Methods*, 58(3), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.016>
- Mehrshad, M., Amoozegar, M. A., Didari, M., Bagheri, M., Abolhassan, S., Fazeli, S., ... Ventosa, A. (2018). *Bacillus halosaccharovorans* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 63(2013), 2776–2781. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.046961-0>
- Melander, R. J., & Melander, C. (2015). *Innovative strategies for combating biofilm-based infections. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 831). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4_6)
- Mieszkin, S., Callow, M. E., & Callow, J. A. (2013). Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: A mini review. *Biofouling*, 29(9), 1097–1113. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.828712>
- Miller, A. W., Blackwelder, P., Al-Sayegh, H., & Richardson, L. L. (2011). Fine-structural analysis of black band disease infected coral reveals boring cyanobacteria and novel bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, 93(3), 179–190. <https://doi.org/10.3354/dao02305>
- Miller, A. W., & Richardson, L. L. (2012). Fine Structure Analysis of Black Band Disease (BBD) Infected Coral and Coral Exposed to the BBD Toxins Microcystin and Sulfide. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.09.007>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). QUORUM SENSING IN BACTERIA. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199.
- Mireille, A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Nevry, R. K., ... Molmeret, M. (2015). Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(10), 2039–2052. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000147>
- Mohamed, N. M., Jinjun, K., Chen, F., Fuqua, C., & Hill, R. T. (2008). Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environmental Microbiology*, 10(1), 75–86.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01431.x>

- 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>
- Monnet, V., Juillard, V., & Gardan, R. (2016). Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 339–351. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.948804>
- Muller, E. M., & van Woesik, R. (2011). Black-Band Disease Dynamics: Prevalence, Incidence, and Acclimatization to Light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.002>
- Muller, W. E. G. (2009). *Sponges (Porifera)*. *Marine Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55519-0>
- Müller, W., Wang, X., Proksch, P., Perry, C., Osinga, R., Gardères, J., & Schröder, H. (2013). Principles of Biofouling Protection in Marine Sponges : A Model for the Design of Novel Biomimetic and Bio-inspired Coatings in the Marine Environment ? *Marine Biotechnology*, 24. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9497-0>
- Naik, D. N., Wahidullah, S., & Meena, R. M. (2012). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by marine invertebrate – derived *Streptomyces* sp ., 2, 197–207. <https://doi.org/10.1111/lam.12034>
- Nishijima, M., Lindsay, D. J., Hata, J., Nakamura, A., Kasai, H., Ise, Y., ... Maruyama, T. (2010). Association of thioautotrophic bacteria with deep-sea sponges. *Marine Biotechnology*, 12(3), 253–260. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9253-7>
- Nithya, C., Aravindraja, C., & Pandian, S. K. (2010). *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Research in Microbiology*, 161(4), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.002>
- Okutsu, N., Morohoshi, T., Xie, X., Kato, N., & Ikeda, T. (2016). Characterization of N-acylhomoserine lactones produced by bacteria isolated from industrial

- cooling water systems. *Sensors (Switzerland)*.  
<https://doi.org/10.3390/s16010044>
- Olson, J. B., Thacker, R. W., & Gochfeld, D. J. (2014). Molecular community profiling reveals impacts of time, space, and disease status on the bacterial community associated with the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *FEMS Microbiology Ecology*, *87*(1), 268–279. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12222>
- Orsod, M., Joseph, M., & Huyop, F. (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. isolated from Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*, *8*(3), 170–174. <https://doi.org/10.21161/mjm.04412>
- Palmer, A. G., Streng, E., & Blackwell, H. E. (2011). Attenuation of Virulence in Pathogenic Bacteria Using Synthetic Quorum-Sensing Modulators under Native Conditions on Plant Hosts. *Chemical Biology*, *6*, 1348–1356.
- Panek, M., Čipčić, H., Barešić, A., Mihaela, P., Matijašić, M., Der, D. V. Ben, ... Verbanac, D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection , storage , DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Scientifi*, (November 2017), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23296-4>
- Panneerselvan, L., Krishnan, K., Subashchandrabose, S. R., & Naidu, R. (2018). Draft Genome Sequence of *Microbacterium esteraromaticum* MM1, a Bacterium That Hydrolyzes the Organophosphorus Pesticide Fenamiphos, Isolated from Golf Course Soil. *Microbiology Resource Announcements*, *7*(4), 4–5.
- Papaleo, M. C., Fondi, M., Maida, I., Perrin, E., Lo Giudice, A., Michaud, L., ... Fani, R. (2012). Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Biotechnology Advances*, *30*(1), 272–293. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.011>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal – response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Publishing Group*, *14*(9), 576–588.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>

- Parray, J., Jan, S., Mir, M., Shameem, N., & Kamili, A. (2018). Quorum Sensing: Melody Beneath the Ground. In *Plant Microbiome: Stress Response* (p. 118).
- Pawlik, J. R. (2011). The Chemical Ecology of Sponges on Caribbean Reefs: Natural Products Shape Natural Systems. *BioScience*, *61*(11), 888–898.  
<https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.11.8>
- Pazzetto, R., De Oliveira Delani, T. C., Fenelon, V. C., & Matioli, G. (2011). Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. *Process Biochemistry*, *46*(1), 46–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.008>
- Peterson, B. J., Chester, C. M., Jochem, F. J., & Fourqurean, J. W. (2006). Potential role of sponge communities in controlling phytoplankton blooms in Florida Bay. *Marine Ecology Progress Series*, *328*, 93–103.  
<https://doi.org/10.3354/meps328093>
- Pfennig, D. W., Wund, M. A., Snell-rod, E. C., Cruickshank, T., Schlichting, C. D., & Moczek, A. P. (2010). Phenotypic plasticity ' s impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(8), 459–467.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.006>
- Pillai, A. B., Kumar, A. J., Thulasi, K., & Kumarapillai, H. (2017). Biotechnology and Industrial Microbiology Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(3), 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005>
- Pimentel-Elardo, S., Wehr, M., Friedrich, A. B., Jensen, P. R., & Hentschel, U. (2003). Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquatic Microbial Ecology*, *33*(3), 239–245. <https://doi.org/10.3354/ame033239>
- Pindi, P. K., Manorama, R., Begum, Z., & Shivaji, S. (2010). *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *60*, 2263–2266.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.012989-0>
- Pita, L., Fraune, S., Hentschel, U., Taylor, M., & Hill, R. T. (2016). Emerging Sponge Models of Animal-Microbe Symbioses, *7*(December), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02102>

- Pitt, T. L., Malnick, H., Shah, J., Chattaway, M. A., Keys, C. J., Cooke, F. J., & Shah, H. N. (2007). Characterisation of *Exiguobacterium aurantiacum* isolates from blood cultures of six patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(9), 946–948. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01779.x>
- Popat, R., Harrison, F., Silva, A. C., Easton, S. A. S., McNally, L., Williams, P., & Diggle, S. P. (2017). Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production.
- Post, W., Zinke, P., & Stangenberger, A. (1982). Soil Carbon Pools and World Life Zones. *Nature*, 8(July), 156–160.
- Pradhan, A. K., & Pradhan, N. (2013). Application of Lipopeptide Biosurfactant Isolated from a Halophile : *Bacillus tequilensis* CH for Inhibition of Biofilm. *Appl Biochemistry Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0428-3>
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Chavadar, M. S., & Bharti, N. (2017). Optimization of Nutrients and Culture Conditions for Alkaline Protease Production Using Two Endophytic Micrococci : *Micrococcus aloeverae* and *Micrococcus yunnanensis*. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0638-4>
- Praveen Rao, J., Sashidhar, R. B., & Subramanyam, C. (1998). Inhibition of aflatoxin production by trifluoperazine in *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(1), 71–75. <https://doi.org/10.1023/A:1008876517450>
- Prum, C., Dolphen, R., & Thiravetyan, P. (2018). Enhancing arsenic removal from arsenic-contaminated water by *Echinodorus cordifolius* & endophytic *Arthrobacter creatinolyticus* interactions. *Journal of Environmental Management*, 213, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.060>
- Quévrain, E., & Domart-coulon, I. (2014). Marine Natural Products – Chemical Defense / Chemical Communication in Sponges and Corals. *Natural Products: Discourse, Diversity, and Design, First Edition*, 39–66. <https://doi.org/10.1002/9781118794623>
- Railkin, A. (2004). *MARINE BIOFOULING: Colonization, Processes and Defenses*

(CRC Press). New York.

- Raina, J. B., Tapiolas, D., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2009). Coral-Associated Bacteria and Their Role in the Biogeochemical Cycling of Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3492–3501.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02567-08>
- Rajesh, P. S., & Ravishankar Rai, V. (2014). Quorum quenching activity in cell-free lysate of endophytic bacteria isolated from *Pterocarpus santalinus* Linn., and its effect on quorum sensing regulated biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiological Research*, 169(7–8), 561–569.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.005>
- Ramanan, R., Kim, B., Cho, D., Oh, H., & Kim, H. (2016). Algae – bacteria interactions : Evolution , ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Ramanauskas, R., Lugauskas, A., Juzeliūnas, E., Samuleviciene, M., & Leinartas, K. (2005). Microbially influenced corrosion acceleration and inhibition . EIS study of Zn and Al subjected for two years to influence of *Penicillium frequentans* , *Aspergillus niger* and *Bacillus mycoides*. *Electrochemistry Communications*, 7, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2005.01.012>
- Ramesh, R., Puhazhendi, P., Kumar, J., Kuppuswami, M., Francis, S., Souza, D., & Ramudu, N. (2015). Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease. *Materials Science & Engineering C*, 49, 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.048>
- Rao, D., Webb, J. S., & Kjelleberg, S. (2005). Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1729–1736.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1729-1736.2005>
- Rao, D., Webb, J. S., & Kjelleberg, S. (2006). Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5547–5555. <https://doi.org/10.1128/AEM.00449-06>
- 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 Journal*, 8(6), 1198–1209.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.227>
- Reverter, M., Perez, T., Ereskovsky, A. V., & Banaigs, B. (2016). Secondary Metabolome Variability and Inducible Chemical Defenses in the Mediterranean Sponge *Aplysina cavernicola*. *Journal of Chemical Ecology*, 42(1), 60–70.  
<https://doi.org/10.1007/s10886-015-0664-9>
- Ribeiro, S., Rogers, R., Rubem, A., Da Gama, B., Muricy, G., & Pereira, R. (2013). Antifouling activity of twelve demosponges from Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 501–506. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842013000300006>
- Ribes, M., & Jimenez, E. (2011). Mediated nitrification as a source of dissolved inorganic nitrogen : Sponges temperate sponges. *Limnology*, 52(3), 948–958.
- Rice, S. A., McDougald, D., & Givskov, M. (2008). Detection and Inhibition of Bacterial Cell-Cell Communication. *Methods in Molecular Biology*, pp. 55–68.
- Ripe, L., Diaz, E., & Arévalo-Ferro, C. (2016). *Caracterización molecular de comunidades bacterianas cultivables de corales sanos y con enfermedad de Banda Negra del Caribe colombiano*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Universidad Nacional de Colombia.
- Ritchie, K. B. (2006). Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322, 1–14.  
<https://doi.org/10.3354/meps322001>
- Robles-Escajeda, E., Das, U., Ortega, N. M., Parra, K., Francia, G., Dimmock, J. R., ... Aguilera, R. J. (2016). A novel curcumin-like dienone induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Cellular Oncology*, 39(3), 265–277.  
<https://doi.org/10.1007/s13402-016-0272-x>
- Roder, C., Arif, C., Bayer, T., Aranda, M., Daniels, C., Shibl, A., ... Voolstra, C. R. (2014). Bacterial Profiling of White Plague Disease in a Comparative Coral Species Framework. *The ISME Journal* *ISME Journal*, 8(1), 31–39.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.127>
- Roder, C., Arif, C., Daniels, C., Weil, E., & Voolstra, C. R. (2014). Bacterial profiling of White Plague Disease across corals and oceans indicates a conserved and distinct disease microbiome. *Molecular Ecology*, 23(4), 965–974.

<https://doi.org/10.1111/mec.12638>

- Romaní, A. M., Guasch, H., & Balaguer, M. D. (2016). *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. United Kingdom: Caister Academic Press.
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A. B., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., & Otero, A. (2011). Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01011.x>
- Rose, H. L., Dewey, C. A., Ely, M. S., Willoughby, S. L., Parsons, T. M., Cox, V., ... Weller, S. A. (2011). Comparison of Eight Methods for the Extraction of *Bacillus atrophaeus* Spore DNA from Eleven Common Interferents and a Common Swab. *PLoS ONE*, 6(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022668>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2014). Variation in Holobionts. In *The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota* (p. 178). sp.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-04241-1>
- Rosselló-móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209–216.  
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.001>
- Ruginescu, R. M., Cojoc, R., Enache, M., & Lazăr, V. (2018). Preliminary Characterization of a Cellulase Producing Bacterial Strain Isolated from a Romanian Hypersaline Lake. *Journal of Environmental Protection*, 9, 1066–1081. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.910066>
- Ryall, B., Eydallin, G., & Ferenci, T. (2012). Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation : the Adaptomics of a Single Environmental Transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 597–625. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
- Sabreen, B., & Paramasivam, N. (2014). Screening and evaluation of marine bacteriocins against aquaculture pathogens. *International Journal of PharmTech Research*, 6(5), 1482–1489.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for

- Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/citeulike-article-id:93683>
- Sandy, M., Carter-Franklin, J. N., Martin, J. D., & Butler, A. (2011). Vanadium bromoperoxidase from *Delisea pulchra*: Enzyme-catalyzed formation of bromofuranone and attendant disruption of quorum sensing. *Chemical Communications*, 47(44), 12086–12088. <https://doi.org/10.1039/c1cc15605e>
- Santhi, S., Talluri, P., Sy, N., & Radha, K. (2017). Bioactive Compounds from Marine Sponge Associates: Antibiotics from *Bacillus* Sp. *Natural Products Chemistry and Research*, 5(4). <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000266>
- Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Kiran, G. S., Yang, Y. H., & Selvin, J. (2017). Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 294–312. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1206060>
- Sato, Y., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2013). Pyrosequencing-Based Profiling of Archaeal and Bacterial 16S rRNA Genes Identifies a Novel Archaeon Associated with Black Band Disease in Corals. *Environmental Microbiology*, 15(11), 2994–3007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12256>
- Saurav, K., Burgsdorf, I., Teta, R., Esposito, G., & Bar-shalom, R. (2016). Isolation of Marine *Paracoccus* sp . Ss63 from the Sponge *Sarcotragus* sp . and Characterization of its Quorum- Sensing Chemical-Signaling Molecules by LC-MS / MS Analysis. *Israel Journal of Chemistry*, 80131, 330–340. <https://doi.org/10.1002/ijch.201600003>
- Sayem, S. M. A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., ... Varcamonti, M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-74>
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., ... Taylor, M. W. (2011). Assessing the complex sponge microbiota : core , variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6(3), 564–576. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.116>
- Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R., & Hertel, W. M. (2011). Economic

- impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27(1), 87–98.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>
- Schweizer, H. P. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase ( FabI ): a Target for the Antimicrobial Triclosan and Its Role in Acylated Homoserine Lactone Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 181(17), 5489–5497.
- Sexton, D. J., & Schuster, M. (2017). Nutrient limitation determines the fitness of cheaters in bacterial siderophore cooperation. *Nature Communications*, 8(230). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00222-2>
- Shaala, L. A., Youssef, D. T. A., Badr, J. M., Sulaiman, M., & Khedr, A. (2015). Bioactive secondary metabolites from the Red Sea marine Verongid sponge *Suberea* species. *Marine Drugs*, 13(4), 1621–1631.  
<https://doi.org/10.3390/md13041621>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D. A., ... Narlikar, J. V. (2019). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 59(2009), 2977–2986. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.002527-0>
- 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>
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14(9), 389–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001>
- Sitarz, A. K., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S., Sitarz, A. K., Mikkelsen, J. D., & Structure, A. S. M. (2016). Critical Reviews in Biotechnology Structure ,

- functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications and other industrial applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.949617>
- Slaby, B. M., Hackl, T., Horn, H., Bayer, K., & Hentschel, U. (2017a). Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. *ISME Journal*, 11(11), 2465–2478. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.101>
- Slaby, B. M., Hackl, T., Horn, H., Bayer, K., & Hentschel, U. (2017b). Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. *ISME Journal*, 11(11), 2465–2478. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.101>
- Snajdr, J., Urbanov, M., & Baldrian, P. (2015). Soil Biology & Biochemistry Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology & Biochemistry Journal*, 1(February), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.011>
- Solano, C., Echeverez, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Sonalkar, V. V., Mawlankar, R., Ramana, V. V., Joseph, N., Shouche, Y. S., & Dastager, S. G. (2015). *Bacillus filamentosus* sp. nov., isolated from sediment sample, 433–441. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0341-y>
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Purification and Characterization of an Extracellular , Thermo-Alkali-Stable , Metal Tolerant Laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PLoS ONE*, 9(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096951>
- Stackebrandt, A. L. (2015). *Micrococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00121>.
- Steindler, L., & Venturi, V. (2007). Detection of Quorum-Sensing N-acyl Homoserine Lactone Signal Molecules by Bacterial Biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>

- Stowe, S. D., Richards, J. J., Tucker, A. T., Thompson, R., Melander, C., & Cavanagh, J. (2011). Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. *Marine Drugs*, 9(10), 2010–2035. <https://doi.org/10.3390/md9102010>
- Stubler, A. D., Furman, B. T., & Peterson, B. J. (2015). Sponge erosion under acidification and warming scenarios: Differential impacts on living and dead coral. *Global Change Biology*, 21(11), 4006–4020. <https://doi.org/10.1111/gcb.13002>
- Su, J., Yang, X., Zhou, Y., & Zheng, T. (2011). Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarensis* (Dinophyceae). *Biological Control*, 56(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.004>
- Sun, B., Li, T., Xiao, J., Liu, L., Zhang, P., Murphy, R. W., ... Huang, D. (2016). Contribution of multiple inter-kingdom horizontal gene transfers to evolution and adaptation of amphibian-killing chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01360>
- Sunar, K., Dey, P., Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (2013). Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 1–14. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300227>
- Sundaramanickam, S. S. A., Meena, K. S. M., & Balasubramanian, S. K. T. (2018). Production and characterization of biosurfactant by marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* (SSASM1). *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1915-4>
- Swift, S., Winson, M. K., Chan, P. F., Bainton, N. J., Birdsall, M., Reeves, P. J., ... Throup, J. P. (1993). A novel strategy for the isolation of luxI homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Molecular Microbiology*, 10(3), 511–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00923.x>
- Tait, K., Joint, I., Daykin, M., Milton, D. L., Williams, P., & Cámara, M. (2005). Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of

- the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, 7(2), 229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00706.x>
- Tambekar, D., Tambekar, S., Jadhav, D., & Bhule, P. (2017). Extraction and Partial characterization of thermostable, alkaline tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus oryzaecorticis*. *BioScience Discovery*, 8(2), 206–210.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tatli, H., & Dalfes, H. N. (2015). Defining Holdridge's life zones over Turkey. *International Journal of Climatology*. <https://doi.org/10.1002/joc.4600>
- 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. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06>
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Baillie, H. J., Charlton, T. S., Nys, R. De, Kjelleberg, S., & Steinberg, P. D. (2004). Evidence for Acyl Homoserine Lactone Signal Production in Bacteria Associated with Marine Sponges Evidence for Acyl Homoserine Lactone Signal Production in Bacteria Associated with Marine Sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4387–4389. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4387>
- Taylor, P., Dobretsov, S., Dahms, H., & Qian, P. (2007). Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites, (May 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/08927010500504784>
- Taylor, P., & Inbakandan, D. (2010). 16S rDNA sequence analysis of culturable marine biofilm forming bacteria from a ship's hull. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 26(8), 37–41. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.530347>
- Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J., & Karutha Pandian, S. (2009). Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology and Medical*

- Microbiology*, 57(3), 284–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00613.x>
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., ... Webster, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, 7(May).  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11870>
- Thompson, J., Gibson, T., & Higgins, D. (2002). Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2(3), 1–22.  
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>
- Thurber, R. V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R. A., Angly, F., ... Rohwer, F. (2009). Metagenomic Analysis of Stressed Coral Holobionts. *Environmental Microbiology*, 11(8), 2148–2163.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01935.x>
- Toole, G. O., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). BIOFILM FORMATION ASMICROBIAL DEVELOPMENT. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
- 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.  
<https://doi.org/10.1111/conl.12638>
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(1), 7–12.  
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., C.R.K.Reddy, & Jha, B. (2011). An Alkali-Halotolerant Cellulase From *Bacillus flexus* Isolated From Green Seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 891–897.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.08.069>
- Urzi, C., De Leo, F., Krakova, L., Pangallo, D., & Bruno, L. (2016). Effects of biocide treatments on the biofilm community in Domitilla's catacombs in Rome. *Science of the Total Environment*, 572, 252–262.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.195>

- Vaishampayan, P., Miyashita, M., Ohnishi, A., Satomi, M., Rooney, A., Duc, M. T. La, & Venkateswaran, K. (2018). Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura *et al.* 2002 as *Rummeliibacillus pycnus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 58(2009), 1094–1099. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006098-0>
- Vaishampayan, P., Moissl-eichinger, C., Schumann, P., Spro, C., Augustus, A., Roberts, A. H., ... Venkateswaran, K. (2019). Description of *Tersicoccus phoenicis* gen. nov., sp. nov. isolated from spacecraft assembly clean room environments, (2013), 2463–2471. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047134-0>
- Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Viswanath, G., Jegan, S., Baskaran, V., Kathiravan, R., & Prabavathy, V. R. (2015). Diversity and N-acyl-homoserine lactone production by Gammaproteobacteria associated with *Avicennia marina* rhizosphere of South Indian mangroves. *Systematic and Applied Microbiology*, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.008>
- Voss, J. D., & Richardson, L. L. (2006). Nutrient Enrichment Enhances Black Band Disease Progression in Corals. *Coral Reefs*, 25(4), 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0131-8>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535–2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., & Weinberger, F. (2012). The second skin: Ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00292>
- Wang, M., Schaefer, A. L., Dandekar, A. A., & Greenberg, E. P. (2015). Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *PNAS*, 112(7), 2187–2191. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500704112>
- Wang, X., Bi, X., Hem, L. J., & Ratnaweera, H. (2018). Microbial community composition of a multi-stage moving bed biofilm reactor and its interaction with

- kinetic model parameters estimation. *Journal of Environmental Management*, 218, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.015>
- Wanick, R., & Cunha, R. (2015). Screening for Cultivable Species of Marine Sponges (porifera) in an Ecologically Inspired ex situ System. *Journal of Fisheires*, 9(October), 11.
- Ward-Paige, C. A., Risk, M. J., Sherwood, O. A., & Jaap, W. C. (2005). Clionid sponge surveys on the Florida Reef Tract suggest land-based nutrient inputs. *Marine Pollution Bulletin*, 51(5–7), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.006>
- 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., ... Wagner, M. (2010). Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environmental Microbiology*, 12(8), 2070–2082. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02065.x>
- Webster, N. S., & Thomas, T. (2016). The sponge hologenome. *MBio*, 7(2), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-16>
- Wechsler, T., & Kümmerli, R. (2019). Understanding policing as a mechanism of cheater control in cooperating bacteria, (October 2018), 412–424. <https://doi.org/10.1111/jeb.13423>
- Wheeler, G. L., Tait, K., Taylor, A., Brownlee, C., & Joint, I. (2006). Acyl-homoserine Lactones Modulate the Settlement Rate of Zoospores of the Marine Alga *Ulva intestinalis* Via a Novel Chemokinetic Mechanism. *Plant, Cell and Environment*, 29(4), 608–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01440.x>
- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of Genes Controlled by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13904–13909. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13904>
- Wielinga, P. R., Heer, L. De, Groot, A. De, Hamidjaja, R. A., Bruggeman, G.,

- Jordan, K., & Rotterdam, B. J. Van. (2011). Evaluation of DNA extraction methods for *Bacillus anthracis* spores spiked to food and feed matrices at biosafety level 3 conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *150*(2–3), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.023>
- Wietz, M., Duncan, K., Patin, N. V., & Jensen, P. R. (2013). Antagonistic Interactions Mediated by Marine Bacteria: The Role of Small Molecules. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 879–891. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0316-x>
- Wolcott, R., Costerton, J. W., Raoult, D., & Cutler, S. J. (2012). The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(2), 107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x>
- Wulff, J. L. (2001). Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how? *Bulletin of Marine Science*, *69*(2), 831–846.
- Xi, J., He, L., Huang, Z., & Sheng, X. (2014). *Bacillus qingshengii* sp. nov., a rock-weathering bacterium isolated from weathered rock surface. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *64*, 2473–2479. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.061929-0>
- Xin, X., Huang, G., Zhou, X., Sun, W., Jin, C., Jiang, W., & Zhao, S. (2017). Potential antifouling compounds with antiadhesion activities from the sponge-associated bacteria, *Bacillus pumilus*. *Journal of Adhesion Science and Technology*, *31*(9), 1028–1043. <https://doi.org/10.1080/01694243.2016.1242219>
- Yang, Q., Franco, C. M. M., & Zhang, W. (2015). Sponge-associated actinobacterial diversity: validation of the methods of actinobacterial DNA extraction and optimization of 16S rRNA gene amplification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(20), 8731–8740. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6875-8>
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., & Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the all-species living tree project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, *33*(6), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.08.001>

- Zhang, Z., Wilson, D. E., Reeder, D. M., Wen, T., Amrine, J. W., Beron, P., ... Adrain, J. M. (2011). *Animal biodiversity : An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* (Vol. 3148). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005502>. Franz
- Zhu, J., Dai, W., Qiu, Q., Dong, C., & Zhang, J. (2016). Contrasting Ecological Processes and Functional Compositions Between Intestinal Bacterial Community in Healthy and Diseased Shrimp. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0831-8>
- Ziganshina, E. E., Mohammed, W. S., Shagimardanova, E. I., Shigapova, L. H., & Ziganshin, A. M. (2018). Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ - C07 isolated from digested agricultural wastes. *BMC Research Notes*, 10–12. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3710-1>
- Zimmer, B. L., May, A. L., Bhedi, C. D., Dearth, S. P., Prevatte, C. W., Pratte, Z., ... Richardson, L. L. (2014). Quorum Sensing Signal Production and Microbial Interactions in a Polymicrobial Disease of Corals and the Coral Surface Mucopolysaccharide Layer. *PLoS ONE*, 9(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108541>
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., ... Ramette, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS ONE*, 6(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024570>
- Zorro, P., & Arévalo, C. (2011). Caracterización de las Comunidades Bacterianas de los Octocorales *Eunicea* sp ., y *Pseudopterogorgia elisabethae*. Universidad Nacional de Colombia.

