

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA ENTRE BACTERIAS EPIBIÓTICAS AISLADAS DE ESPONJAS MARINAS DEL CARIBE COLOMBIANO Y SU RELACIÓN CON LA MACROEPIBIOSIS*

Jennyfer Mora-Cristancho¹, Sven Zea¹ y Diego L. Gil-Agudelo²

1 Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología y Centro de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR. INVEMAR, Cerro Punta de Betín, Santa Marta, Colombia. yinnis_mc@yahoo.com (J.M.C.), szea@invemar.org.co (S.Z.)

2 Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR. Cerro Punta de Betín, A.A. 1016, Santa Marta, Colombia. diego.gil@invemar.org.co

RESUMEN

Las superficies sumergidas en el mar son densamente colonizadas por bacterias y sus interacciones, tales como la inhibición del crecimiento, son importantes para determinar el desarrollo de comunidades bacterianas, como también de posteriores etapas de la macroepibiosis. Para determinar el potencial de interacción entre bacterias de las biopelículas de esponjas, se realizaron ensayos de actividad de inhibición *in vitro* de crecimiento entre cepas bacterianas aisladas de superficies con diferente grado de macroepibiosis, de las esponjas *Aplysina insularis* (limpia), *Aplysina lacunosa* (con macroepibiosis) y de la superficie calcárea de la concha del molusco bivalvo *Donax* sp. El porcentaje total de interacción antagónica entre estas cepas bacterianas fue del 64 %; las cepas bacterianas aisladas de superficies limpias inhibieron el crecimiento de cepas provenientes de superficies muy colonizadas en proporciones cercanas a 1:1. Cepas de superficies no colonizadas tuvieron mayor frecuencia de interacciones antagónicas. Se propone la interacción bacteriana antagónica como posible mecanismo de regulación del crecimiento poblacional y de esta forma del desarrollo de etapas subsecuentes de la macroepibiosis.

PALABRAS CLAVE: Bacterias epibióticas, Interacciones antagónicas, Esponjas marinas, Epibiosis.

*Contribución No. 1031 del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR y No. 326 del Centro de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR, de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe. Parte del trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae en Biología, Línea Biología Marina de la Universidad Nacional de Colombia en convenio con INVEMAR.

ABSTRACT

Antagonistic activity between epibiotic bacteria isolated from marine sponges of the Colombian Caribbean and its relationship with the macrofouling. Surfaces submerged in the sea are densely colonized by bacteria, and inter-specific interactions such as growth inhibition are important determinants of the development of bacterial communities, as well as of later phases of macrofouling. To determine the potential interactions among biofilm bacteria from sponges we carried out *in vitro* growth inhibition tests between bacterial strains isolated from surfaces with various degrees of macrofouling, from the sponges *Aplysina insularis* (clean), *Aplysina lacunosa* (fouled), and from the calcareous surface of the bivalve mollusk *Donax* sp. The total percentage of antagonistic interactions among these strains was 64 %; strains isolated from clean surfaces inhibited the growth of strains from well-colonized surfaces in a 1:1 ratio. Strains from clean surfaces had a higher frequency of antagonistic interactions. We propose bacterial antagonistic interaction as a possible mechanism of population growth regulation and, consequently, of the development of subsequent phases of macrofouling.

KEY WORDS: Epibiotic bacteria, Antagonistic interaction, Marine sponges, Epibiosis.

INTRODUCCIÓN

Toda superficie que se ubique en el mar, desde grandes plataformas submarinas hasta pequeñas partículas detríticas, es colonizada inicialmente por bacterias. Entre las estrategias para aprovechar la materia orgánica adherida a estas superficies, las bacterias generalmente forman agregados de células vivas, microcolonias y células muertas, incluidos en una matriz de polisacáridos, enzimas y otras sustancias, conocidos como biopelículas. En el proceso secuencial de epibiosis, la conformación de biopelículas constituye una de las primeras etapas o “microfouling” (Wahl, 1989; Thurnheer *et al.*, 2004). Entre las diversas especies bacterianas que conforman una biopelícula se presentan interacciones de tipo competitivo, por alimento y espacio, en las que algunas de ellas son inducidas a producir antibióticos en respuesta a señales químicas emitidas por otras potencialmente competidoras y exhiben una respuesta antagónica (Kelly *et al.*, 2003).

El efecto antagónico entre bacterias es una característica muy difundida en el medio marino y presente en varios grupos bacterianos (Brinkhoff *et al.*, 2004; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). Se han identificado interacciones antagónicas entre bacterias pelágicas y entre aquellas aisladas de nieve marina (Long y Azam, 2001). También, entre bacterias asociadas a superficies de macroalgas, estrellas de mar, nudibranchios, superficies duras naturales o artificiales (fouling) y agregados orgánicos, a través de la producción de antibióticos, en algunas de ellas (Lemos *et al.*, 1985; Boyd *et al.*, 1999; Burgess *et al.*, 1999).

En este sentido, se ha propuesto que la competencia por espacio y nutrientes puede ser una poderosa fuerza selectiva que ha generado la evolución de una

variedad de adaptaciones efectivas en el asentamiento bacteriano (Grossart *et al.*, 2004). De hecho, la competencia por recursos limitados dentro de una comunidad se considera una importante fuerza selectiva que promueve la biosíntesis de compuestos antimicrobianos (Slattery *et al.*, 2001). Esta producción involucra factores como disponibilidad de sustrato, estado fisiológico del organismo e interacción con otros organismos o con las sustancias secretadas por éstos (Burgess *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 1999). De otro lado, los procesos de crecimiento y las interacciones célula a célula, mediadas por moléculas de señalización que intervienen en la expresión genética mediada por la densidad poblacional (*quorum-sensing*), juegan un papel importante en la dinámica poblacional de algunas especies bacterianas que viven adheridas a un sustrato, gobernando la expresión de características fenotípicas como la producción de polisacáridos, exoenzimas y antibióticos (Fuqua y Greenberg, 2002; Gram *et al.*, 2002; Grossart *et al.*, 2003).

Sin embargo, las bacterias no colonizan las superficies de manera uniforme ni tampoco colonizan todas las superficies de la misma manera. En particular, los epitelios o la capa de mucus de organismos marinos son susceptibles de ser colonizados por bacterias, que pueden llegar a ser benéficas o perjudiciales para la salud del organismo hospedador (Armstrong *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2004). En las superficies de organismos vivos la colonización bacteriana puede estar afectada, entre otros, por las propiedades físicas de la superficie y por el acondicionamiento bioquímico inicial, que condicionan características como: tensión superficial, polaridad y grado de humectación (Taylor *et al.*, 1997) y por sustancias químicas nocivas producidas por el potencial hospedero (Pawlik, 1993; Wahl *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1998). Estos productos químicos pueden afectar las bacterias en diferentes formas, que incluyen la inducción de una respuesta quimiotáctica, la inhibición del crecimiento e incluso la muerte celular (Wahl *et al.*, 1994), limitando posteriormente el asentamiento de algas e invertebrados que conforman el “macrofouling”.

Las defensas químicas han sido propuestas como mecanismos para evitar o prevenir la epibiosis (Pawlik, 1993; Jenkins *et al.*, 1998), inhibiendo directamente el asentamiento de larvas de invertebrados (Thompson, 1985) o previniéndolo indirectamente a través del control de la microepibiosis (Kelly *et al.*, 2005). De hecho, algunos autores (Becerro *et al.*, 1994; Maximilien *et al.*, 1998) sugieren que puede presentarse una correlación entre la superficie limpia de un organismo, la actividad antimicrobiana de los compuestos químicos producidos por éste y una baja abundancia epibacteriana. Adicionalmente, la interacción entre sustancias nocivas producidas por los organismos y por las bacterias mismas podría estar seleccionando un consorcio estable de bacterias que por sus propiedades antagónicas previenen un desarrollo ulterior de la macroepibiosis (e.g., Kelly *et al.*, 2005).

Las esponjas marinas, por ejemplo, son animales sésiles y están en riesgo constante de ser colonizadas por otros organismos presentes en el medio, incluidas las bacterias y otros microorganismos. Algunas especies, sin embargo, logran mantener una superficie relativamente limpia, libre de macroepibiontes o simplemente no son colonizadas de la misma forma (velocidad y diversidad) que las superficies inorgánicas (Wahl, 1989; Pawlik, 1993; Jenkins *et al.*, 1998). Para la mayoría de esponjas, la inhibición de la epibiosis genera beneficios por cuanto se previene la obstrucción de canales para alimentarse, disminuye la degradación de tejido e incrementa la longevidad de la esponja (Wahl, 1989; Herrera y Sánchez, 1996). En aquellos casos en que las esponjas tienen su superficie fuertemente colonizada, quizás para camuflarse o defenderse, las áreas inhalantes generalmente se encuentran en depresiones localizadas que se mantienen limpias (ver varios ejemplos en De Voss *et al.*, 1991).

Aunque son varios los estudios que se han realizado sobre la actividad antagónica entre bacterias marinas (los mencionados anteriormente), la mayoría de ellos se han enfocado en la búsqueda de compuestos antimicrobianos y son pocos los estudios dedicados a comprender las interacciones interespecíficas entre bacterias marinas en un contexto ecológico. Este tipo de estudio merece particular importancia, ya que la mayoría de trabajos sobre epibiosis en esponjas marinas contemplan las defensas químicas del organismo y son escasos aquellos que tienen en cuenta mecanismos biológicos adicionales que podrían influir en el grado de colonización de un organismo. En este trabajo se exploró el potencial de interacción entre bacterias que componen las biopelículas en pinacodermos de esponjas poco colonizados o sin epibiosis contra bacterioepibiontes potenciales aislados de superficies muy colonizadas, como posible mecanismo biológico para controlar la epibiosis bacteriana por medio de interacciones antagónicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de bacterias

Las cepas bacterianas de superficies menos colonizadas fueron aisladas del pinacodermo externo de la esponja *Aplysina insularis* y del pinacodermo interno de *Aplysina lacunosa*, ambos sin macroepibiosis y los bacterioepibiontes potenciales fueron aislados del pinacodermo externo de *A. lacunosa* y de una superficie calcárea (concha abandonada del bivalvo *Donax* sp.), ambas con una tapete de 1-2 mm de grosor, consistente en algas costrosas y filamentosas, entre las que viven invertebrados y se aglutina sedimento. Las esponjas y la concha del bivalvo *Donax* sp. se encontraban en la ensenada Granate (Parque Nacional Natural Tayrona,

norte del Caribe colombiano) a profundidades entre 5 y 15 m. Las condiciones oceanográficas de la región se encuentran fuertemente influenciadas por la presencia de los vientos Alisios del nororiente entre los meses de diciembre y abril, presentando baja pluviosidad, disminuyendo la temperatura superficial del agua (hasta cerca a 22 °C) y aumentando su salinidad; el resto del año la zona presenta su estación lluviosa, con mayores temperaturas superficiales del agua (cerca a 28 °C), menor salinidad y una mayor concentración de clorofila y nutrientes en el agua (Rodríguez-Ramírez y Garzón-Ferreira, 2003).

Mediante buceo autónomo se hicieron cortes *in situ* del pinacodermo de las esponjas en condiciones lo más asépticas posibles (usando guantes de látex y cuchillas de bisturí estériles). Los cortes fueron empacados en bolsas estériles Whirl-Pack y transportados al laboratorio en neveras con agua para mantener las muestras a temperatura constante y protegidas del sol.

Una vez en el laboratorio, los pinacodermos de las esponjas fueron cortados a un tamaño de 1 cm² de área y lavados tres veces con 10 mL de agua de mar esterilizada (AME) para remover las bacterias no adheridas a la biopelícula y/o provenientes de la columna de agua. Cada trozo de tejido fue agitado fuertemente en vórtex durante 5 minutos en 5 mL de AME para remover las bacterias adheridas a la superficie. Las suspensiones celulares obtenidas fueron diluidas en serie hasta 10⁻⁶ y de cada dilución partiendo de 10⁻¹, se tomaron 100 µL para inocular por duplicado placas Petri de 10 cm con medio agar glicerol agua de mar (GASW, por sus siglas en inglés), que contiene 2 g de Peptona, 1 g de extracto de levadura y 2 mL de glicerol como fuentes de carbono en 1000 mL de agua de mar (modificado de Smith y Hayasaka, 1982). Se aislaron los morfotipos bacterianos mediante repiques sucesivos usando el mismo medio de cultivo. Las incubaciones se realizaron a 25±2 °C en oscuridad.

Para aislar las bacterias de la superficie calcárea (concha abandonada) del bivalvo *Donax* sp., ésta fue igualmente empacada en una bolsa estéril Whirl-Pack y transportada de la misma manera que las demás muestras. En este caso, luego del lavado con AME para remover bacterias no adheridas, la superficie fue raspada con una cuchilla de bisturí estéril y el material obtenido fue resuspendido en 5 mL de AME y se siguió el mismo procedimiento.

Las cepas bacterianas obtenidas en los cultivos fueron aisladas y caracterizadas de acuerdo con la morfología colonial y celular según Gómez *et al.* (2006) sobre el medio GASW y a la reacción de Gram usando microscopio óptico 100X (Koneman *et al.*, 1987). Las cepas fueron nombradas iniciando por un número consecutivo seguidas por las letras SE (cepas aisladas de superficies sin epibiosis) o CE (cepas aisladas de superficies con epibiosis) de acuerdo con el tipo de superficie de la cual provenían.

Ensayos de antagonismo bacteriano *in vitro*

Este tipo de bioensayo fue diseñado de acuerdo con la hipótesis de que los grupos bacterianos aislados de las superficies menos colonizadas del pinacodermo externo de *A. insularis* y del pinacodermo del pseudoatrio de *A. lacunosa* son colonizadas por grupos bacterianos que ejercen un control en el crecimiento de poblaciones de otras bacterias, como las que se encuentran en superficies más colonizadas como el pinacodermo de *A. lacunosa* y en la superficie de la concha del bivalvo *Donax* sp. Adicionalmente, para detectar las interacciones entre grupos bacterianos que habitan la misma superficie, se incluyeron en un segundo ensayo las cepas aisladas de superficies limpias contra ellas mismas. De tal manera, 14 cepas se ensayaron contra nueve cepas de posibles bacterioepibiontes; esas mismas 14 cepas bacterianas, aisladas de superficies menos colonizadas, fueron ensayadas entre ellas para detectar su interacción y los posibles eventos de autoinhibición.

Para los ensayos de efecto antagónico se realizaron cultivos bacterianos en caldo con la misma composición del medio sólido GASW (Smith y Hayasaka, 1982) a 25 ± 2 °C durante 24 h, siguiendo la metodología básica del ensayo de difusión en agar con sensidiscos (Hewitt y Vincent, 1989), inoculando en la placa Petri con medio GASW 100 μ L de un cultivo bacteriano, ajustado al patrón de turbidez No. 0.5 de MacFarland, equivalente a 1×10^8 células/mL (Koneman *et al.*, 1987), pero con la diferencia que en este caso se inocularon en el sensidisco 20 μ L de las diferentes cepas bacterianas, cuya capacidad antagónica se ensayó sin ajuste de la concentración por el patrón de MacFarland (Brinkhoff *et al.*, 2004). Se utilizaron como controles negativos discos estériles limpios (sin bacteria y sin caldo marino). La sola presencia de halos de inhibición alrededor de los discos fue considerada como una respuesta cualitativa antagónica entre cepas. Cada prueba se realizó por triplicado.

RESULTADOS

Las zonas de inhibición producidas por la mayoría de cepas con actividad antagónica fueron mayores a 10 mm de diámetro (incluido el diámetro de disco) y esta zona de inhibición tuvo mayores dimensiones cuando se incrementó el tiempo de cultivo, indicando que efectivamente existen efectos antagónicos cuando ciertas bacterias aisladas de la misma o de diferente biopelícula entran en contacto, como podría suceder *in situ*. De las 14 cepas probadas en estos ensayos (nueve de ellas aisladas de la superficie de *A. insularis* y cinco aisladas de la superficie limpia de *A. lacunosa*), la cepa 11SE aislada de *A. insularis* inhibió el mayor número de cepas, 11 en total, aisladas de diferentes superficies, incluida ella misma, siendo éste el único caso de autoinhibición (Tabla 1). La mayoría de las cepas inhibidas fueron

aisladas del pinacodermo de *A. insularis*. La cepa 8SE inhibió el crecimiento de cuatro cepas, tres de ellas obtenidas del pinacodermo de *A. insularis* y una de la concha del bivalvo *Donax* sp. Las demás presentaron actividad antagonista contra una a tres cepas aisladas de diferentes superficies (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antagonista (por inhibición de crecimiento) de las bacterias aisladas de superficies limpias de *Aplysina insularis* y *Aplysina lacunosa*. Las letras en mayúsculas junto al número de cepa indican el tipo de superficie de donde se aisló. **SE:** sin epibiosis; **CE:** con epibiosis.

Origen	Sensidisco	Gram	Cepas inhibidas	Gram	Origen de la cepa inhibida
<i>A. lacunosa</i> (pinacodermo del pseudoatrio)	Cepa 1SE	-	NINGUNA		
	Cepa 2SE	+	Cepa9 CE	+	Concha <i>Donax</i> sp.
	Cepa 3SE	+	Cepa5 CE	-	<i>A. lacunosa</i>
			Cepa6 CE	-	<i>A. lacunosa</i>
	Cepa 4SE	+	NINGUNA		
	Cepa 5SE	-	Cepa3 CE	-	<i>A. lacunosa</i>
			Cepa 9 SE	-	<i>A. insularis</i>
		Cepa 7 SE	-	<i>A. insularis</i>	
<i>A. insularis</i> (pinacodermo exterior)	Cepa6SE	-	Cepa 13SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 7CE	+	Concha <i>Donax</i> sp.
	Cepa 7SE	-	NINGUNA		
	Cepa 8SE	+	Cepa 6SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 14SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 11SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 7CE	+	Concha <i>Donax</i> sp.
	Cepa 9SE	-	Cepa 13SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 7CE	+	Concha <i>Donax</i> sp.
			Cepa 5CE	-	<i>A. lacunosa</i>
	Cepa 10SE	-	NINGUNA		
	Cepa 11SE	-	Cepa 9SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 7SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 8SE	+	<i>A. insularis</i>
			Cepa 13SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 6SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 14SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 11 SE	-	<i>A. insularis</i>
			Cepa 2CE	-	<i>A. lacunosa</i>
			Cepa 4CE	-	<i>A. lacunosa</i>
		Cepa 4SE	+	<i>A. lacunosa</i>	
		Cepa 5SE	-	<i>A. lacunosa</i>	
Cepa 12SE	-	NINGUNA			
Cepa 13SE	-	Cepa5CE	-	<i>A. lacunosa</i>	
		Cepa 6SE	-	<i>A. insularis</i>	
Cepa 14SE	-	Cepa 7SE	-	<i>A. insularis</i>	
		Cepa 8SE	+	<i>A. insularis</i>	
		Cepa 13SE	-	<i>A. insularis</i>	

Se presentaron varios casos de antagonismo entre bacterias aisladas de superficies menos colonizadas contra las de superficies más colonizadas; en total se inhibieron siete de las nueve cepas aisladas del pinacodermo externo de *A. lacunosa* y de la superficie calcárea de *Donax* sp. por parte de tres cepas aisladas del pinacodermo del pseudoatrio de *A. lacunosa* y tres del pinacodermo de *A. insularis*. Es decir, que seis cepas aisladas de superficies menos colonizadas o sin macroepibiosis, mostraron interacción antagónica con siete cepas aisladas de superficies fuertemente colonizadas (con macroepibiosis). Sin embargo, las bacterias del pinacodermo externo de *A. insularis* tuvieron la mayor frecuencia de interacción antagónica con bacterias aisladas de la misma superficie (Tabla 1).

De las cepas obtenidas del pseudoatrio de *A. lacunosa*, dos mostraron efecto antagónico frente a bacterias aisladas de superficies con epibiosis de la misma esponja y de la superficie calcárea. Estos casos constituyen evidencia para no descartar la idea de que los posibles epibiontes bacterianos del medio e incluso epibiontes bacterianos de su propia superficie, sí pueden ser evitados en ciertas zonas de la esponja por medio de mecanismos biológicos, como el antagonismo. Independientemente de la fuente de la bacteria aislada o de la consecuencia que tenga para la macroepibiosis, los casos de antagonismo observados *in vitro* sugieren la posible regulación bacteriana al interior de las biopelículas muestreadas sobre esponjas marinas. Solamente las cepas 1CE y 8CE, aisladas del pinacodermo exterior de *A. lacunosa* y de la superficie calcárea de *Donax* sp., respectivamente, no fueron inhibidas por ninguna de las 14 cepas bacterianas aisladas de superficies limpias.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontraron evidencias de las relaciones antagónicas entre cepas bacterianas, puesto que el 64 % (9 de 14) de las cepas obtenidas de las superficies menos colonizadas tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas provenientes de otras superficies. Algunos estudios que han examinado la frecuencia de interacciones antagónicas de bacterias marinas han encontrado que se puede llegar a detectar una frecuencia de 53 % de interacciones antagónicas entre bacterias pelágicas (Long y Azam, 2001). Los autores de estos estudios atribuyen su resultado al hecho de usar un mayor número de aislamientos bacterianos muestreados de la columna de agua como organismos diana, mientras que en estudios anteriores se limitaron en este sentido usando pocas especies diana (dos especies) y la frecuencia de interacciones antagónicas fue muy baja (5 %) (Nair y Simidu, 1987). En el presente estudio se usó un mayor número de cepas

bacterianas diana que explicarían parcialmente el alto porcentaje en la frecuencia de interacciones antagonicas. De otro lado, este resultado puede ser también un reflejo del nicho específico que ocupan éstas. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con los estudios de Lemos *et al.* (1985), Boyd *et al.* (1999) y Grossart *et al.* (2004). En el primero, el 20 % de las bacterias aisladas de las superficies de algas marinas mostró producción de antibióticos, mientras que aquellas aisladas de la columna de agua lo hicieron en un porcentaje ligeramente menor (17 % de 224 aislamientos); en el segundo estudio, 21 % (de 280 aislamientos) de la bacterias asociadas a superficies de algas marinas mostraron actividad antibiótica también contra bacterias del macrofouling sobre superficies artificiales; mientras que en el tercer estudio, se aislaron y ensayaron bacterias adheridas a agregados orgánicos y la frecuencia de interacciones antagonicas fue del 54 %.

Todas las bacterias ensayadas en éste y los estudios citados arriba hacían parte de una comunidad adherida a una superficie, interactuando con bacterias de la misma superficie. En este contexto, la frecuencia de la actividad antagonica detectada *in vitro* puede ser asumida como un reflejo de las interacciones *in situ* a las cuales están constantemente sometidas las bacterias en una biopelícula. Estas bacterias viven e interactúan en el mismo ambiente que, para el caso de este estudio, se trata de pinacodermos de esponjas marinas poco o nada colonizados, por lo tanto se presume que están compitiendo por espacio y nutrientes. Adicionalmente, que algunas cepas bacterianas interactúen antagonicamente con un mayor número de otras cepas diferentes, podría ser reflejo de la habilidad individual para interactuar y competir dentro de una comunidad.

La densidad poblacional de ciertas especies bacterianas es la que determina que ocurran procesos de macroepibiosis. Estas poblaciones pueden atraer o repeler larvas de invertebrados y estimular el asentimiento de esporas de algas a través de la producción de señales químicas (Wieczorek y Todd, 1997; Patel *et al.*, 2003). Las interacciones antagonicas que presentan las bacterias de las zonas limpias de las esponjas *A. insularis* y *A. lacunosa* podrían ser en parte responsables del bajo o nulo grado de macroepibiosis al mantener controlado el crecimiento de las poblaciones bacterianas de su pinacodermo, interfiriendo en procesos de comunicación bacteriana y toda la expresión genética que implica la producción de dichas moléculas de señalización. La esponja misma podría, de otro lado, estar actuando en parte del proceso general de control de la macroepibiosis, mediante exudación de compuestos bromados bioactivos, tal como lo han detectado Thompson (1985) y Walker *et al.* (1985) en especies del mismo género; permitiendo sólo la presencia de aquellas bacterias que son relativamente resistentes a los compuestos y que además poseen capacidad antagonica entre ellas y contra otras menos resistentes a éstos y que

colonizan superficies inertes o que no están defendidas químicamente (Mora-Cristancho, 2007).

Sin embargo, para confirmar que esto ocurre de esta manera, serán necesarios ensayos en los cuales también se confronten las bacterias aisladas de superficies más colonizadas entre ellas y comparar la frecuencia de las interacciones antagónicas con respecto a la obtenida en este trabajo. También es necesario evaluar la habilidad de formación de biopelículas y la producción de compuestos químicos que eviten o atraigan epibiontes, como larvas de invertebrados y esporas de algas. Así se avanzará en confirmar si el antagonismo bacteriano es un componente importante para regular el crecimiento de ciertas poblaciones bacterianas sobre las superficies limpias de *Aplysina* y no un evento biológico común entre bacterias aisladas de biopelículas de esponjas.

Entre las características de las cepas estudiadas que pueden dar una aproximación al posible mecanismo de interacción se encuentra el tipo de pared celular de las bacterias. En este trabajo se encontró un caso de antagonismo entre bacterias Gram positivas, 10 entre Gram positivas y Gram negativas y 19 casos entre Gram negativas (Tabla 1). Los posibles mecanismos de acción para estas interacciones podrían ser la producción de antibióticos de la cepa dispuesta en el sensidisco, como parte de la fisiología normal de la misma, caso en el cual la respuesta es unidireccional basada en producción de antibióticos. O también, por mecanismos que involucran una respuesta bidireccional de comunicación bacteriana a través de sistemas de *quorum sensing* (control de la expresión genética en respuesta a la densidad celular). En este segundo caso, para el tipo de interacción más frecuente, es decir, entre bacterias Gram negativas, el mecanismo está mediado por sistemas que se basan en la regulación de la expresión de proteínas reguladoras llamadas LuxI y LuxR y por moléculas señal tipo acilhomoserinlactona (AHL), cuya interacción promueve la transcripción de operones específicos (Arévalo-Ferro, 2004). Dependiendo del tipo de operón transcrito se induce la producción de antibióticos (McGowan *et al.*, 1995), se puede afectar la motilidad (*swarming*) de otras bacterias (Eberl *et al.*, 1996) y la formación de biopelículas (Arévalo-Ferro *et al.*, 2003). Para los otros dos tipos de interacción (entre bacterias Gram positivas solamente y entre éstas y las Gram negativas), los sistemas de *quorum sensing* involucran otras familias de genes y moléculas-señal extracelulares diferentes (conocidas como autoinductores) (Bassler, 1999).

En este estudio sólo se detectó un evento de autoinhibición, en la cepa 11SE. Algunos autores (León y García-Tello, 1998; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005) sugieren que este tipo de eventos están ligados a factores ambientales que determinan la activación o inactivación de procesos de excreción o resistencia a sus

propios productos, debido a la carencia de catalizadores para enzimas específicas bajo determinadas condiciones ambientales o de cultivo. Conociendo de antemano que las interacciones antagonicas son un mecanismo que parece estar bien difundido entre bacterias que conforman una biopelícula y de la importancia que este fenómeno representa en el mantenimiento o eliminación de ciertas poblaciones bacterianas, los resultados obtenidos son evidencia que respaldaría la hipótesis inicial en la cual se plantea la posible regulación de la epibiosis en las superficies sin epibiosis de *A. insularis* y de *A. lacunosa* por medio de mecanismos biológicos, particularmente bacterianos, como igualmente lo han propuesto Jensen y Fenical (1994) para invertebrados marinos en general.

Empero, se requiere de estudios más profundos sobre la complejidad de estas interacciones y sobre el metabolismo de los grupos bacterianos que están siendo inhibidos, como también respecto a la producción de sustancias quimiotácticas para otras bacterias o para larvas de otros invertebrados y esporas de algas. Estos resultados constituyen una primera aproximación a los mecanismos bacterianos que pueden tener lugar en la superficie de una esponja, controlados o no por ésta, para prevenir el crecimiento ilimitado de ciertas poblaciones bacterianas e incluso para evitar infección por posibles patógenos para la esponja y, en últimas, prevenir o controlar la macroepibiosis. Las cepas nativas aisladas en este trabajo pueden ser objeto de estudio de mecanismos de interacción bacteriana a nivel molecular entre bacterias marinas, así mismo, como posibles nuevas fuentes de productos naturales marinos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación de la División de Investigaciones de Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto 20101007467) y de la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (Proyecto 2057). También contó con el apoyo logístico y científico del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andrés”- INVEMAR (Laboratorio de Microbiología). Se agradece especialmente al laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Arévalo-Ferro, C. 2004. A proteomics view of quorum-sensing regulated and surface induced genes in representative *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. Ph. D. Dissertation. Technischen Universität München. Munich, Alemania. 128 p.
- Arévalo-Ferro, C., M. Hentzer, G. Reil, G. Angelika, S. Kjelleberg, M. Givskov, K. Riedel y L. Eberl. 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.*, 5: 1350–1369.
- Armstrong, E., L. Yan, K. G. Boyd, P. C. Wright y J. G. Burgess. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia*, 461 (1-3): 37- 40.
- Avendaño-Herrera, R., M. Lody y C. E. Riquelme. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.*, 40 (2): 117-125.
- Bassler, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation gene expression by quorum sensing. *Curr. Opinion Microbiol.* 2: 582-587.
- Becerro, M. A., N. I. López, X. Turon y M. Uriz. 1994. Chemical ecology of marine organisms: An overview. *J. Chem. Ecol.*, 12: 951-987.
- Boyd, K. G., D. R. Adams y J. G. Burgess. 1999. Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling*, 14 (3): 227-236.
- Brinkhoff, T., G. Bach, T. Heidon, L. Liang, A. Schlingloff y M. Simon. 2004. Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (4): 2560-2565.
- Burgess, J. G., E. M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg y K. G. Boyd. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.*, 70: 27-32.
- Correra, J. A. y P. A. Sánchez. 1996. Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia*, 326-327: 89-96.
- De Voss, L., K. Rützler, N. Boury-Esnault, C. Donadey y J. Vacelet. 1991. Atlas of sponge morphology/ Atlas de morfologie des éponges. Smithsonian Institution Press, Washington y Londres. 117 p.
- Eberl, L., M. K. Winson, C. Sternberg, G. S. Stewart, G. Christiansen, S. R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin y M. Givskov. 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.*, 20: 127–136.
- Fuqua, C. y E. P. Greenberg. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 36: 685–695.
- Gómez, M. L., L. J. Vivas, R. Ruiz, V. Reyes y C. Hurtado. 2006. Bacterias marinas nativas degradadoras de compuestos orgánicos persistentes en Colombia. Grey, Bogotá. 36 p.
- Gram, L., H. P. Grossart, A. Schlingloff y T. Kjørboe. 2002. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (8): 4111–4115.
- Grossart, H. P., T. Kjørboe, K. Tang y H. Ploug. 2003. Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (6): 3500-3509.
- Grossart, H. P., A. Schlingloff, M. Bernhard, M. Simon y T. Brinkhoff. 2004. Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of German Wadden Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47: 387-396.

- Hewitt, W. y S. Vincent. 1989. The agar diffusion assay. 38-79. En: Hewitt, W. y S. Vincent (Eds.). Theory and application of microbiological assay, Academic Press, San Diego. 323 p.
- Jenkins, K., P. Jensen y W. Fenical. 1998. Bioassays with marine microorganisms. 2-32. En: Millar, L. G. y K. F. Haynes (Eds.). Methods in chemical ecology. Bioassays methods. Vol. 2. Nueva York. 432 p.
- Jensen, P. R. y W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. An. Rev. Microbiol., 48: 559-585.
- Kelly, S. R., P. R. Jensen, T. P. Henkel, W. Fenical y J. R. Pawlik. 2003. Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. Aquat. Microb. Ecol., 31: 175-182.
- Kelly, S. R., E. Garo, P. Jensen, W. Fenical y J. Pawlik. 2005. Effects of Caribbean sponge secondary metabolites on bacterial surface colonization. Aquat. Microb. Ecol., 40: 191-203.
- Koneman, E. W., S. Allen, V. Dowell y H. Sommers. 1987. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Médica Panamericana, Buenos Aires. 532 p.
- Lemos, M. L., A. E. Toranzo y L. J. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. Microb. Ecol., 11: 149-163.
- León, J. y P. García-Tello. 1998. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. Rev. Per. Biol., 5: 47-64.
- Long, R. A. y F. Azam. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 67 (11): 4975-4983.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker 1999. Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall, Madrid. 1064 p.
- Maximilien, R., R. de Nys, C. Holmstrom, L. Gram, M. Givskov, K. Crass, S. Kjelberg y P. D. Steinberg. 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonization by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. Aquat. Microb. Ecol., 15: 233-246.
- McGowan, S., M. Sebaihia, S. Jones, B. Yu, N. Bainton, P. F. Chan, B. Bycroft, G. S. Stewart, P. Williams y G. P. Salmond. 1995. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. Microbiology, 141: 541-550.
- Mora-Cristancho, J. 2007. Posibles mecanismos químicos y biológicos para el control de la epiobiosis de las esponjas *Aplysina insularis* y *Aplysina lacunosa* (Demospongiae, Verongida). Tesis Magíster Biología Marina, Línea Biología Marina, Universidad Nacional de Colombia-INVEMAR, Santa Marta. 89 p.
- Nair, S. y U. Simidu. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. Appl. Environ. Microbiol., 53 (12): 2957-2962.
- Patel, P., M. E. Callow, I. Joint y J. A. Callow. 2003. Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. Environ. Microbiol., 5 (5): 338-349.
- Pawlik, J. R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. Chem. Rev., 93: 1911-1922.
- Rodríguez-Ramírez, A. y J. Garzón-Ferreira. 2003. Monitoreo de arrecifes coralinos, pastos marinos y manglares en la bahía de Chengue (Caribe colombiano) 1993-1999. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 8, Santa Marta. 170 p.
- Slattery, M., I. Rajbhandari y K. Wesson. 2001. Competition mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. Microb. Ecol., 41: 90-96.

- Smith, G. W. y S. S. Hayasaka. 1982. Nitrogenase activity associated with *Holodula wrightii* roots. Appl. Environ. Microbiol., 43: 1244-1248.
- Sutherland, K. P., J. W. Porter y C. Torres. 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. Mar. Ecol. Prog. Ser., 266: 273-302.
- Taylor, G. T., D. Zheng, M. Lee, P. J. Troy, G. Gyananath y S. K. Sharma. 1997. Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic water. Biofouling, 11 (1): 31-57.
- Thompson, J. E. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. Mar. Biol., 88: 23-26.
- Thurnheer, T., G. Gmür y B. Guggenheim. 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. J. Microbiol. Meth., 56: 37-47.
- Wahl, M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser., 58: 175-189.
- Wahl, M., P. R. Jensen y W. Fenical. 1994. Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. Mar. Ecol. Prog. Ser., 110: 45-57.
- Walker, R. P., J. E. Thompson y D. J. Faulkner. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. Mar. Biol. 88: 27-32.
- Wieczorek, S. K. y C. D. Todd. 1997. Inhibition and facilitation of bryozoan and ascidian settlement by natural multi-species biofilms: effects of film age and the roles of active and passive larval attachment. Mar. Biol., 128: 463-473.

FECHA DE RECEPCIÓN: 30/09/07

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10/02/09