

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA COMUNIDAD BACTERIANA HETEROTRÓFICA ASOCIADA A LA ESPONJA *Aplysina Archeri* (PORIFERA, DEMOSPONGIAE).

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE HETEROTROPHIC BACTERIAL COMMUNITY IN THE MESOHIL OF *Aplysina Archeri* (PORIFERA, DEMOSPONGIAE).

Marco A. Romero¹, Nora Malaver² y Estrella Villamizar³.

¹Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela elmarcuspe@hotmail.com.

²Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. nmalaver@ciens.ucv.ve.

³Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. evillami@ciens.ucv.ve

RESUMEN

La comunidad de bacterias heterotróficas asociadas a las esponjas puede representar un elevado porcentaje de la biomasa total de estos organismos y jugar un rol importante en su funcionamiento. Sin embargo, son pocas las investigaciones realizadas con el objetivo de caracterizar bioquímicamente estas comunidades. En este trabajo se estudió la comunidad bacteriana heterotrófica asociada a un ejemplar de *Aplysina archeri* proveniente de Cayo Sombrero, Parque Nacional Morrocoy, Venezuela. Se tomaron muestras del tejido de la esponja así como del agua circundante y se mantuvieron a una temperatura aproximada de 4°C hasta su traslado al laboratorio, donde fueron homogeneizadas y diluidas hasta 10⁻⁴ para su siembra en Agar Zobell Marino Modificado. Una vez aisladas las cepas, se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas (Fermentación de azúcares simples, degradación de almidón, reducción de nitratos a nitritos, utilización de urea como fuente de nitrógeno, actividad proteolítica, actividad lipolítica, utilización de pectina como única fuente de carbono y requerimientos de oxígeno) con el fin de caracterizar funcionalmente las comunidades bacterianas. Los resultados fueron tratados mediante análisis de cluster, usando el programa estadístico PRIMER 5. Este reflejó la existencia de diferencias de agrupamiento entre la comunidad bacteriana de la esponja y la del agua; caracterizándose el tejido fundamentalmente por presentar cepas con metabolismo aeróbico facultativo y capacidad para degradar azúcares simples a diferencia de la comunidad del agua, donde además de aerobios facultativos se observaron aerobios estrictos y poca capacidad para degradar azúcares simples.

SUMMARY

The bacterial community associated to sponges represents a high percentage of overall sponge biomass and plays an important role in its living functions. Little research has been carried out to characterize the biochemistry of these bacterial communities. We studied the heterotrophic bacterial community associated to tissue samples of *Aplysina archeri* from Cayo Sombrero, Morrocoy National Park, Venezuela. We analyzed samples of the sponge tissue and the surrounding water. These samples were kept at 4 °C, homogenized, diluted until 10⁻⁴ and microbial cultures were prepared in Zobell Modified Marine Agar. A series of tests were applied to the isolated strains (fermentation of simple sugars, degradation of starch, reduction of nitrate to nitrite, use of urea like a source of nitrogen, proteolytic and lipolytic activity, use of pectin like a unique source of carbon and oxygen requirements) to achieve a functional characterization of the bacterial community. A cluster analysis was done with the results, using a PRIMER 5 statistic program. We found differences between bacterial communities of the sponge and the surrounding water. The isolated microbial component of the community associated to the sponge was facultative aerobic and capable degrading simple sugars. In the water samples we found both, strict and facultative aerobics, and low capability of degrading simple sugars.

Palabras clave: Porifera, *Aplysina archeri*, comunidad bacteriana, caracterización funcional
Key Words: Porifera, *Aplysina archeri*, Bacterial community, functional characterization

INTRODUCCIÓN

La asociación física y fisiológica entre microorganismos y esponjas es un fenómeno ampliamente descrito en la literatura científica, habiéndose determinado en algunos casos su naturaleza simbiótica (Wilkinson 1978, Osinga *et al.* 2001, Hentschel *et al.* 2001, Althoff *et al.* 1998). En el caso de la familia Aplysinidae los microorganismos pueden llegar representar hasta un 40 % de la biomasa del animal y superar al título bacteriano del agua de mar por dos órdenes de magnitud (Fiedrich y Hentschel, no

publicado, citado por Hentschel *et al.* 2001). Estas asociaciones son de vital importancia para la esponja, pues las bacterias aportan muchos metabolitos secundarios, entre ellos antifungicos y antibióticos, así como otros compuestos que protegen a la esponja de la depredación o el sobrecrecimiento por otros organismos (Osinga *et al.* 2001). En el caso de las asociaciones con microorganismos simbiotes fotosintéticos (cianobacterias o zooxantelas) la nutrición de la esponja se ve complementada por productos metabólicos, como azúcares simples, que los

microorganismos producen a través de la fotosíntesis (Osinga *et al.* 2001).

En este estudio se pretende realizar de manera preliminar, una caracterización funcional de la comunidad bacteriana heterotrófica presente en el tejido de un ejemplar de *Aplysina archeri* (Fig. 1), una esponja muy común en las aguas del Caribe (Alcolado

1999, Álvarez y Díaz 1985, Villamizar 1985, Romero 2004). Esta comunidad bacteriana deberá ser notablemente distinta a la del agua circundante, lo cual nos indicaría que efectivamente es una comunidad fuertemente asociada a la esponja, adaptada a las condiciones de refugio, alta disponibilidad de nutrientes y demás condiciones que representa el tejido como nicho ecológico.



Figura 1. *Aplysina archeri*

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo para este trabajo se realizó en Cayo Sombrero, Parque Nacional Morrocoy. Con la ayuda de un nucleador previamente esterilizado en autoclave (15 lb. Durante 15 min.), se tomó una muestra del tejido de la esponja, mientras que la muestra del agua circundante se tomó usando un frasco de vidrio estéril. Las muestras se mantuvieron en frío (4° C) para su traslado al laboratorio, donde fueron homogeneizadas durante 10 min. usando un vortex mixer modelo VM 2000 hasta que el tejido estuvo parcialmente desintegrado. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en agua de mar estéril (10^{-1} - 10^{-4}) y se sembraron por inclusión en Agar Zobell Marino Modificado (Agar Nutriente preparado con $\frac{3}{4}$ de agua de mar, 0,5 % de peptona y 0,01 % de extracto de levadura, según Hentschel *et al.* 2001). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas, procediendo luego a seleccionar aleatoriamente un total de 25 cepas provenientes del tejido de la esponja y 25 cepas del agua circundante. Una vez hecho

esto se procedió a la caracterización micromorfológica de las cepas tomando como criterio las formas celulares y los resultados de la tinción de Gram. Así mismo se les practicaron ocho pruebas bioquímicas: Fermentación de azúcares simples (glucosa, lactosa y sacarosa), degradación de azúcar complejo (almidón), reducción de nitratos a nitritos, utilización de la urea como fuente de nitrógeno, actividad proteolítica, actividad lipolítica, utilización de la pectina como única fuente de carbono y requerimientos de oxígeno (determinación de organismos aerobios estrictos, facultativos y microaerófilos). Esto permitió estudiar la estructura funcional de la comunidad bacteriana heterotrófica sin la necesidad de llegar a la identificación taxonómica de las cepas (Malaver 1996, García 2000).

Con los resultados de dichas pruebas, se realizó un análisis de cluster jerárquico empleando el programa estadístico PRIMER 5; con el objetivo de establecer similitudes entre las cepas bacterianas heterotróficas procedentes de la esponja y el agua circundante. El proceso de agrupamiento de las cepas es aglomerativo y

jerárquico, utilizándose como medida de similitud entre las mismas la distancia euclídea media y como criterio de agrupamiento, la distancia entre los centroides de los grupos. Para ello se calculó la matriz inicial de similitud (distancia entre cepas), ubicando cada cepa en un hiperespacio (S) dado por el número de pruebas bioquímicas aplicadas, estableciéndose las distancias entre todos los pares posibles de cepas. Dicha ubicación está determinada por el valor correspondiente a cada cepa en cada una de las pruebas, es decir, si dos cepas presentaron los mismos valores en todas las pruebas, fueron ubicadas en un mismo punto, siendo la distancia entre ellas cero, asumiéndose que dichas cepas son funcionalmente equivalentes y forman un Grupo de Identidad Funcional (GIF). Por el contrario, si las cepas presentaron diferencias en algunos resultados, la distancia entre ellas es diferente de cero y estará determinada por el grado de diferencias presentado (García 2000). Tomando en cuenta las distancias a las cuales se formaron los grupos, se estimaron los siguientes parámetros: Grupos de Identidad Funcional dentro de la comunidad (GIF), aquellos grupos conformados por 2 o más cepas con características bioquímicas similares; índice de

importancia de los diferentes GIF (P_i), dado por la relación entre el número de cepas que forman un GIF dado y el total de cepas de la muestra.

RESULTADOS

La totalidad de las cepas analizadas, tanto en el tejido de la esponja como en el agua circundante resultaron Gram negativas. La comunidad bacteriana heterotrófica asociada a la esponja estuvo conformada por cocobastones (64 %), cocos (32 %) y bastones (4 %), mientras que en la comunidad correspondiente al agua circundante predominaron los bastones (75 %) seguidos por los cocobastones (25 %) (Fig.2). Los resultados del análisis de cluster de las comunidades bacterianas heterotróficas asociadas a *A. archeri* y al agua circundante (Tabla 1, Fig.3) constituyeron un total de 5 GIF. De ellos el GIF 1 es el más importante ($\pi = 0,55$) y agrupa la totalidad de las cepas de la esponja, mientras que los GIF 2, 5, 3 y 4 resultaron los más importantes en ese orden y estuvieron integrados sólo por cepas provenientes del agua circundante. Según este análisis existe una separación clara entre las comunidades bacterianas de la esponja y del agua circundante.

Tabla 1. Grupos de Identidad Funcional (GIF) correspondientes a la comunidad de bacterias heterotróficas presentes en el tejido de *A. archeri* y en el agua circundante. La importancia de los GIF se representa a través de su valor de P_i . e= esponja; a= agua circundante.

N° de GIF	Cepas integrantes del GIF.	Semejanzas bioquímicas	P_i
GIF 1	*	Glu, lac, sac, NO ₃ , fac, pecti, lipid, alm, prot	0.55
GIF 2	a1,a4,a5,a6,a7,a10, a11,a13	Aerob, pecti, lipid, alm, prot	0.19
GIF 3	a2, a14	Pepto, fac, pecti	0.05
GIF 4	a3, a12	Glu, pepto, H ₂ S, NO ₃ , fac, pecti	0.05
GIF 5	a19,a20,a21,a22,a23, a24,a25	Fac, pecti, lipid, alm, prot	0.16

* e1, e2, e3, e4, e5, e6, e7, e8, e9, e10, e11, e12, e13, e14, e15, e16, e18, e19, e20, e21, e22, e23, e24, e25.

Glu: Fermenta la glucosa; **Sac:** Fermenta la sacarosa; **Lac:** Fermenta la lactosa; **H₂S:** Produce sulfuro de hidrógeno en el proceso fermentativo; **Gas:** Produce gas en el proceso fermentativo; **Alm:** Hidroliza el almidón; **NO₃:** Reduce nitratos a nitritos; **Prot:** Manifiesta actividad proteolítica; **Lipid:** Manifiesta actividad lipolítica; **Pecti:** Utiliza la pectina como única fuente de carbono; **Aerob:** Aerobio estricto; **Fac:** Aerobio facultativo.

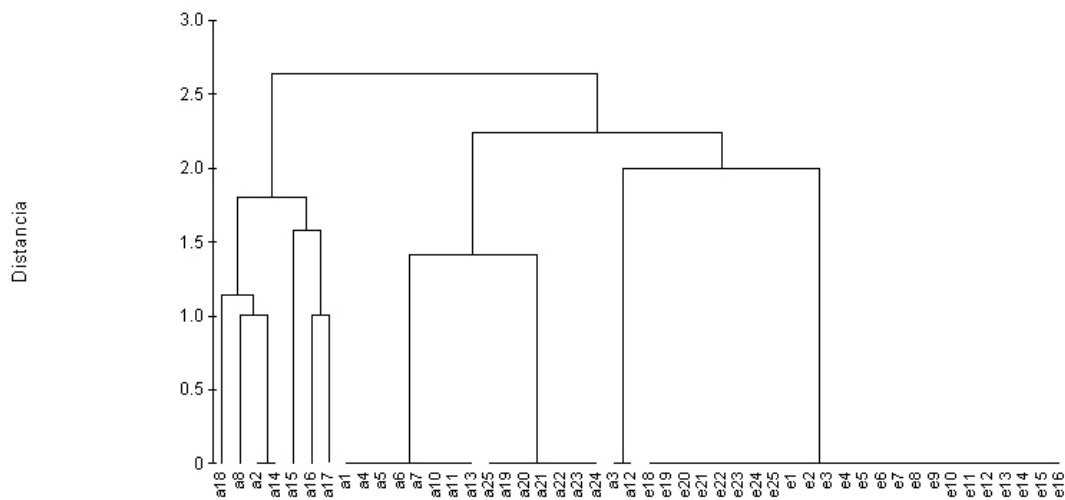


Figura 3. Análisis de cluster para cepas provenientes de la esponja *A. archeri* y del agua circundante (e= esponja, a= agua).

DISCUSIÓN

La totalidad de las cepas aisladas en este estudio fueron Gram negativas, resultado similar al reportado por Wilkinson (1978) para cuatro esponjas de la Gran Barrera Australiana, donde la gran mayoría de las cepas aisladas resultaron igualmente Gram negativas. Igual resultado obtuvieron Santavy y Colwell (1990) para la especie *Ceratoporella nicholsoni*. Las formas celulares aisladas de la esponja estuvieron representadas mayormente por cocobastones, seguidos por cocos y finalmente, en menor número por bastones. Sin embargo, en el agua circundante estos últimos fueron predominantes, seguidos por los cocobastones, mientras que no se observaron cocos. Esto constituye la primera evidencia de diferencias entre las comunidades bacterianas de ambos compartimientos. Wilkinson (1978) y Santavy y Colwell (1990) observaron predominio de bastones y cocobastones de pequeño tamaño sobre los cocos en varias especies de esponjas, en nuestro caso los cocos estuvieron más representados que los bastones, aunque los más abundantes fueron los cocobastones pequeños.

En general las comunidades bacterianas heterotrofas asociadas a las esponjas se caracterizan por presentar abundancia de cepas aerobias facultativas (Wilkinson 1978; Santavy y Colwell 1990, Osinga *et al.* 2001). Las bacterias aerobias facultativas son capaces de degradar diferentes fuentes de carbono a través de distintas rutas metabólicas a altas o bajas presiones parciales de oxígeno, cualidad que les brinda una gran capacidad de adaptación, siempre y cuando dispongan de los nutrientes necesarios para sus actividades metabólicas

principales (García 2000).

El tejido de las esponjas por lo general constituye un ambiente rico en oxígeno gracias al efectivo bombeo de agua que se produce a través del sistema acuífero de estos organismos, por lo que la presencia de organismos anaerobios estrictos no es común (Osinga *et al.* 2001). Sin embargo, se conoce que en ciertos momentos las esponjas dejan de bombear agua y sobre todo en los ejemplares de gran tamaño, el tejido puede pasar a ser un ambiente pobre en oxígeno (Wilkinson 1978; Santavy Colwell 1990 y Osinga *et al.* 2001). En ese momento las cepas con un metabolismo aerobio facultativo se ven indudablemente favorecidas respecto a aquellas que poseen un metabolismo aerobio estricto. Esto explica que la totalidad de las cepas aisladas del tejido de *A. archeri* fueran aeróbicas facultativas, a diferencia de las cepas aisladas del agua circundante, donde se observaron tanto aeróbicos estrictos como facultativos, respondiendo a la presencia constante de oxígeno disuelto en el agua (Atlas y Bartha 1993).

Es llamativo también que comunidad bacteriana aislada de la esponja es capaz de reducir nitratos a nitritos. Se sabe que este es un proceso facultativo, en el cual el oxígeno reprime la síntesis de las enzimas nitrato y nitrito reductasa, por lo que son necesarias condiciones de anaerobiosis para la síntesis de dichas enzimas. Una vez que estas enzimas están presentes, el nitrato compete con el oxígeno para ser reducido, siendo el rendimiento energético de ambos procesos más o menos similar (Martínez *et al.* 1992). Esta tendencia también fue reportada por Santavi y Colwell (1990), para las cepas provenientes de los tejidos de *C.*

nicholsoni, las cuales fueron capaces de reducir nitratos a nitritos a diferencia de las cepas aisladas del agua circundante. Es necesario señalar que en muchas esponjas, los microorganismos también pueden realizar el proceso contrario, la nitrificación, alcanzando en algunos casos tasas de nitrificación superiores a las que tienen lugar en los sedimentos marinos (Díaz y Rützler 2001).

En términos generales la comunidad proveniente de los tejidos expresó un mayor potencial funcional que la proveniente del agua circundante. Las esponjas proveen un ambiente relativamente rico en nutrientes (productos nitrogenados de desecho, etc) para la comunidad bacteriana, como producto de la degradación de la materia orgánica particulada que es filtrada de la columna de agua. Esto promueve el desarrollo de gran variedad de relaciones simbióticas. Todo lo contrario ocurre en la columna de agua adyacente a la esponja. Los arrecifes coralinos son ambientes oligotróficos, donde los nutrientes disponibles son rápidamente asimilados por todos los organismos o los consorcios de organismos (corales hermatípicos y zooxantelas) que requieren de los mismos para las altas tasa de producción primaria (Santavy y Colwell 1990). El incremento en las capacidades metabólicas encontrado por Santavy y Colwell (1990) en las bacterias simbiotas a la esponja *C. nicholsoni*, estuvo correlacionado con el incremento de la disponibilidad de nutrientes en el tejido de la esponja. Esta situación fue distinta a la observada en las cepas aisladas del agua, las cuales presentaron capacidades metabólicas más limitadas al estar restringidas a concentraciones reducidas de nutrientes en el agua. Un resultado similar al descrito por los autores antes mencionados, fue observado en este trabajo para la comunidad bacteriana del tejido de *A. archeri*.

El análisis de clúster agrupa a la totalidad de las cepas provenientes del tejido de *A. archeri*, separándolas de

las aisladas del agua circundante en función de sus capacidades metabólicas. Esto demuestra que efectivamente, la comunidad bacteriana asociada al tejido de la esponja es distinta a la del agua circundante a la misma. Se trata de una comunidad evolutivamente adaptada a las condiciones propias del microambiente del tejido.

Probar las capacidades metabólicas de las cepas aisladas ante un mayor número de fuentes de carbono tales como aminoácidos (alanina, glicina, arginina), azúcares (maltosa, fructosa, galactosa, Xilosa), etanol, benzoato, etc., nos permitiría ampliar el espectro bioquímico y capacidad metabólica de la comunidad bacteriana (Wilkinson 1978). También sería de mucha utilidad la realización de pruebas moleculares como la secuenciación del ADN ribosomal de las subunidades 16S, con el objetivo de detectar las cepas viables más no cultivables que pudieran estar presentes en los tejidos de la esponja y representar un porcentaje importante del total de la comunidad bacteriana asociada a este organismo (Rohwer *et al.* 2001).

CONCLUSIONES

La comunidad bacteriana heterotrófica asociada al tejido de *A. archeri*, se caracterizó por tener un mayor espectro bioquímico que la comunidad bacteriana heterotrófica aislada del agua circundante. Así mismo, la totalidad de las cepas aisladas de la esponja presentaron un metabolismo aeróbico facultativo como adaptación fundamental para explotar este microambiente, dicho metabolismo estuvo presente, así como el aeróbico estricto entre los microbios aislados del agua circundante. Las diferencias encontradas nos hacen pensar que posiblemente la comunidad bacteriana proveniente del tejido tiene un origen distinto a la del agua circundante y su evolución pudiera estar fuertemente ligada a las condiciones imperantes en los tejidos de la esponja.

LITERATURA CITADA

- Alcolado P.M.*
1999. Comunidades de esponjas de los arrecifes del Archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. *Boletín de Investigaciones Marino Costeras* 28: 95-124.
- Althoff, K., C. Schütt, y R. Batel.*
1998. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Marine Biology* 130: 529-536.
- Álvarez, B., y M.C. Díaz.*
1985. Las esponjas de un arrecife coralino en el Parque Nacional Archipiélago de Los Roques: Taxonomía y ecología. Tesis de grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 149 pp.
- Atlas, R.M. y R. Bartha.*
1993. *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*. 677 pp.
- Díaz, M.C. y Rützler, K.*
2001. Sponges an essential component of Caribbean Coral Reefs. *Bulletin of Marine Sciences* 69(2): 535-546.
- García, A. E.*
2000. Enfermedades y otras anomalías que afectan a los corales escleractíneos en algunas localidades del Parque Nacional Archipiélago de Los Roques. Tesis de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 168 pp.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert y J. Hacker.*
2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Microbiology Ecology* 35: 305-312.
- Malaver, N.*
1996. Aspectos ecológicos de la asociación microorganismos raíz *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solm Laub (Pontederiaceae) expuesta a un afluyente modificado. Tesis Doctoral. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 287 pp.
- Martínez, J., A.I. Sánchez, M. Quintana, V. Pasos y G. del Barrio.*
1992. *Microbiología General*. Primera Reimpresión. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 302 pp.
- Osinga, O., E. Armstrong, J.G. Burgess, F. Hoffmann, J. Reitner y G. Schumann Kindel.*
2001. Sponge microbe association and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461: 55-62.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam y N. Knowlton.*
2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reef* 20: 85-91.
- Romero, M.A.*
2004. Evaluación de las comunidades de esponjas en tres localidades del Parque Nacional Morrocoy, haciendo énfasis en la prevalencia de síndromes/enfermedades. Tesis de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 161 pp.
- Santavy, D.L. y R.R. Colwell.*
1990. Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Marine Ecology Progress Series* 67: 73-82.
- Villamizar, E.*
1985. Fauna asociada a las esponjas *Aplysina archeri* y *Aplysina lacunosa* a lo largo de un gradiente de profundidad en el Parque Nacional Archipiélago de Los Roques. Tesis de grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 195 pp.
- Wilkinson, C.R.*
1978. Microbial Associations in Sponges. II Numerical Analysis of Sponge and Water Bacterial Populations. *Marine Biology* 49: 169-176.