

PROYECTO PILOTO DE PROSPECCIÓN DE BIOACTIVIDAD EN ORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS

Código 2105-09-12456

Contrato 378-02



INVAMAR



Santa Marta, Colombia, mayo de 2005

CITese COMO:

Newmark, F., M. Santos-Acevedo, A. Chaves, J. Mora, J. Arias, S. Zea. 2005. Manual de métodos de bioactividad. www.invemar.org.co 28 p.

TABLA DE CONTENIDO

MANUAL DE MÉTODOS DE BIOACTIVIDAD	4
1 COLECTA Y CONSERVACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	5
2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	5
3 CONCENTRACIÓN NATURAL DE EXTRACTO EN LA ESPONJA	7
4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS CRUDOS DE LAS ESPONJAS	8
4.1 MÉTODOS.....	9
4.1.1 Método Kirby-Bauer	9
4.1.2 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	10
4.1.3 Medio agar Mueller - Hinton.....	10
4.2 PROCEDIMIENTO	10
4.2.1 Preparación del medio	10
4.3 CONSERVACIÓN DE LOS SENSIDISCOS.....	11
4.4 ESTÁNDAR DE TURBIDEZ PARA PREPARACIÓN DEL INÓCULO	12
4.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	12
4.6 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS	13
4.7 APLICACIÓN DE LOS DISCOS A LAS PLACAS INOCULADAS	13
4.8 LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	14
4.8.1 Controles.....	14
4.9 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO	15
4.10 LIMITANTES DE MÉTODO.....	15
5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN HUEVOS FERTILIZADOS DE <i>Lytechinus</i> <i>variegatus</i>	16
5.1 Acondicionamiento para mantener <i>Lytechinus variegatus</i> en laboratorio	16
5.2 Prueba de citotoxicidad y antimitosicidad.....	17
5.2.1 Desove y fecundación.....	17
5.2.2 Bioensayo	18
6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIEPIBIÓTICA.....	20
7 EVALUACIÓN DE LA DISUASIÓN ALIMENTARIA EN PECES GENERALISTAS.....	23
8 TOXICIDAD SOBRE CORALES.....	25
BIBLIOGRAFÍA	27

MANUAL DE MÉTODOS DE BIOACTIVIDAD

El manual de métodos de bioactividad es una guía práctica para el trabajo de laboratorio que requieren los bioensayos para pruebas de bioactividad en organismos marinos, tomando como modelo de referencia nuestra experiencia de trabajo en esponjas marinas.

Este documento se basa en una amplia revisión bibliográfica, que incluye consulta con los autores de algunos de los métodos, pero lo mas importante es que contiene la información generada durante el desarrollo de los ensayos en los cuales se introdujo información adicional o modificaciones que facilitan el trabajo y que en general no están especificadas en los artículos o libros puestos a consideración de la comunidad científica.

En la parte inicial se incluye la metodología para la colecta y conservación del material biológico, y la preparación de los extractos orgánicos crudos de esponjas marinas.

La segunda parte contiene la metodología de los bioensayos:

- ✓ Determinación de la concentración natural, la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos crudos
- ✓ El ensayo de citotoxicidad en huevos fertilizados de erizo de mar *Lytechinus variegatus*.
- ✓ La determinación de la capacidad antiepibiótica de los extractos orgánicos crudos
- ✓ La evaluación de la disuasión alimentaria en peces generalistas
- ✓ La evaluación de la toxicidad sobre corales.

Con este manual se pretende además proponer metodologías que permitan estandarizar los ensayos con el fin hacer posible la comparación entre los diversos trabajos desarrollados, evitando la duplicidad de esfuerzos y de recursos.

El Manual de Métodos de Bioactividad se realizó dentro del “proyecto piloto de bioactividad en organismos marinos colombianos”, desarrollado por el INVEMAR con la financiación de COLCIENCIAS-SENA código 2105-09-12456, Contrato 378-02.

1 COLECTA Y CONSERVACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

La colecta del material biológico se realiza mediante buceo autónomo y esta incluye tomar las fotografías *in situ* y la toma de información relevante en campo. También se registran características de los organismos que pueden ser útiles en la determinación del material o en el análisis de los resultados, tales como forma, coloración, consistencia, características de superficie y oscuros. Para el caso de las esponjas la colecta se realiza principalmente sobre parches de arrecifes, en fondos arenosos o rocosos; la muestra se colecta manualmente, usando cuchillo o cincel y martillo, según la consistencia, y se introduce en bolsas plásticas de cierre hermético, se marca con fecha, localidad y hora; en el laboratorio se toma una porción de la muestra que debe preservarse en alcohol al 70% como ejemplar testigo para el trabajo taxonómico, y que será depositada en una colección de referencia. El resto del material se congela a -15°C para la extracción.

2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Para obtener los extractos orgánicos crudos, las esponjas se descongelan, se pesan en húmedo y se mide su volumen en una probeta mediante desplazamiento de agua marina filtrada. Con el peso o el volumen se puede posteriormente calcular la concentración natural del extracto en la esponja. Luego se lavan con agua destilada. Posteriormente se cortan en trozos, eliminando organismos y detritos, se introducen en botellas graduadas oscurecidas (según el tipo de liofilizador) con capacidad volumétrica de 1 l, hasta el nivel de 800 ml (valor de referencia, no es equivalente al volumen de la muestra).

Con el fin de eliminar el agua de la muestra, a continuación se someten a un proceso de liofilización durante 15 horas, al cabo de las cuales, se pesan de nuevo. Luego se les agregan 900 ml de metanol grado analítico (solvente polar de amplio espectro que disuelve especialmente compuestos orgánicos entre los que se encuentran muchos metabolitos bioactivos de interés, ver revisión en Chaves, 2003) y se dejan en agitación durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, la solución resultante se filtra con ayuda de un Kitasato (embudo + papel de filtro + erlenmeyer con desprendimiento lateral + bomba de vacío) y el tejido de las esponjas nuevamente se introduce en las botellas oscurecidas, se les agrega el mismo volumen de una solución de metanol:diclorometano (2:1) (el diclorometano es considerado un solvente no polar, usado para fortalecer el espectro de polaridad, ayudando a extraer más compuestos no polares, ver revisión en Chaves, 2003) y se dejan nuevamente en agitación durante 24 horas, después de las cuales se repite el proceso de filtración.

Después de filtrar, el extracto metanólico y el extracto metanol:diclorometano se concentran empleando un rotavapor, lo que dura aproximadamente, manteniendo la temperatura del baño maría en 35°C y 600 psi de presión de vacío, obteniendo así la eliminación de los solventes.

Una vez finalizado este proceso, el extracto obtenido de cada esponja se recupera mediante dispersión en pequeñas cantidades de éter dietílico grado analítico en caso de que no se disuelva se puede usar diclorometano, se almacena en una botella oscurecida y se deja en cámara de extracción entre tres y ocho horas para garantizar la completa evaporación del éter. El extracto se almacena en el congelador (-15°C) hasta el momento de usarlo (Figura 1).

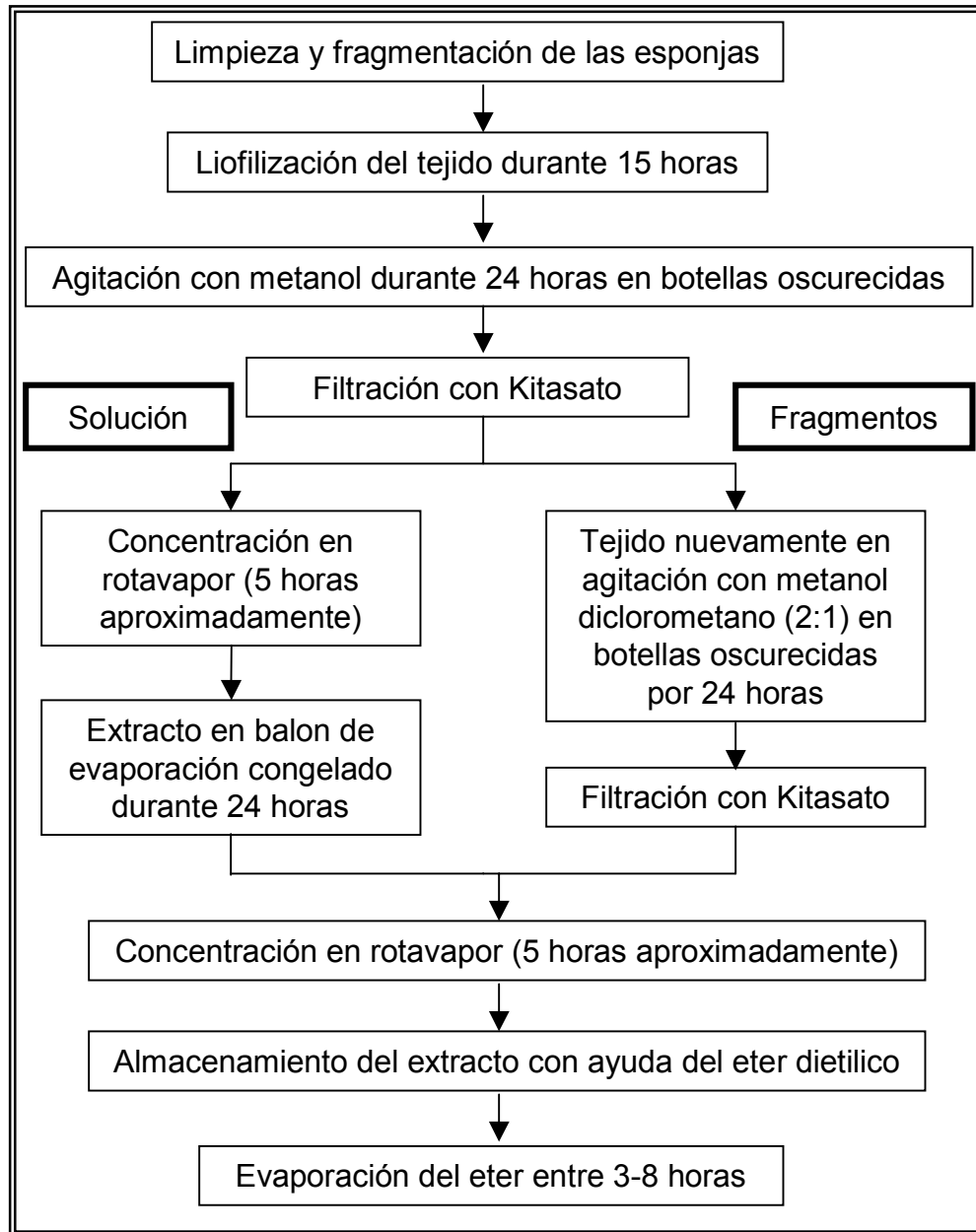


Figura 1. Proceso de obtención de los extractos orgánicos crudos

Para emplear los extractos, se retiran del congelador y se les agrega metanol:diclorometano (2:1) en una cantidad que permita disolver el extracto seco con ayuda de un baño de ultrasonido.

IMPORTANTE

Al realizar cada uno de los ensayos se debe tener en cuenta la concentración natural de extracto en la esponja; es decir que el factor de dilución del extracto en los medios y preparaciones a las que se añada el extracto, sea igual al Factor de Concentración.

3 CONCENTRACIÓN NATURAL DE EXTRACTO EN LA ESPONJA

Para determinar la concentración de extracto en las esponjas, se realizan mediciones volumétricas individuales de los fragmentos de esponja húmeda que son sometidos a liofilización y extracción, en una probeta con agua de mar filtrada. El volumen de agua desplazado se toma como el equivalente al volumen de la esponja, que se asocia con el peso del extracto seco (Figura 2).

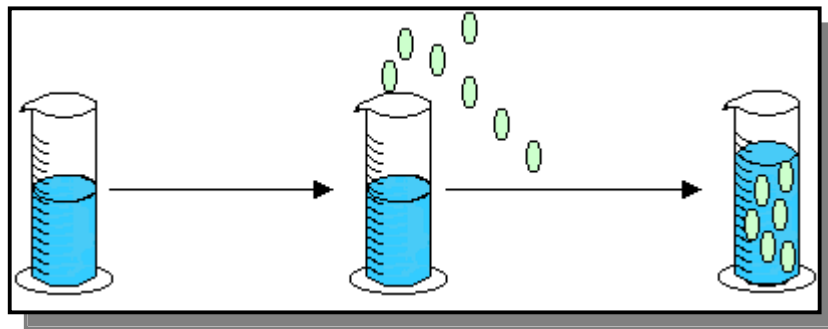


Figura 2. Medición volumétrica de los fragmentos de esponja

El factor de concentración natural (FC) de extracto se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{FC} = \text{g de extracto seco/ml de esponja (Chaves, 2003).}$$

4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS CRUDOS DE LAS ESPONJAS

Las pruebas de susceptibilidad están indicadas para cualquier organismo que contribuya a un proceso infeccioso garantizando una terapia química antimicrobiana y frecuentemente se emplean cuando se presume que un organismo pertenece a una especie capaz de exhibir resistencia a los agentes antimicrobianos comunes. Son variados los métodos que pueden ser usados para medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos frente a agentes antimicrobianos; sin embargo, en muchos laboratorios de microbiología clínica el método de difusión de discos de papel (sensidiscos) en agar es usado rutinariamente por ser el más común, rápido y acertado para el control de bacterias patógenas.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las esponjas, las cepas bacterianas se mantienen conservadas a 4°C, tanto en caldo nutritivo como en agar nutritivo y el hongo *Candida albicans* en agar glucosa de Sabouraud 4%.

Para el ensayo se usan cultivos de 18-24 horas en caldo nutritivo (pH 6.5±0.2 a 25°C) de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y el hongo *Candida albicans*. La concentración del caldo a sembrar se determina según metodología de Kirby-Bauer, por comparación de la turbidez del tubo con el estándar No. 0.5 de McFarland, que equivale a una concentración de aproximadamente 10⁸ UFC/ml (Koneman *et al.*, 1987; NCCLS, 2003). Más adelante se describe el ensayo.

Para evaluar el espectro de la actividad antimicrobiana se utiliza el método de difusión en agar usando agar Mueller-Hinton, según metodología de Hewitt y Vincent (1989) y los criterios de la NCCLS (2003), pero con las cantidades propuestas por Zea y colaboradores (1986); se toman alícuotas de 0,2 ml de cada cultivo bacteriano para inocular en 15 ml de agar Mueller-Hinton (pH 7.4± 0.2 a 25°C). Asimismo, alícuotas de 0,5 ml del cultivo de *Candida albicans* se inoculan en 15 ml del mismo agar, permitiendo una fase de adaptación y crecimiento de los microorganismos en el medio líquido a una temperatura de 45°C durante dos horas con agitación periódica (cada 30 minutos); luego se dispensa el agar en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, dejando una capa de 3 mm de grosor aproximadamente, para garantizar la difusión horizontal de las sustancias al interior del medio (Hewitt y Vincet, 1989). Luego de la solidificación del agar, se colocan sobre la superficie los discos secos impregnados de diferentes sustancias y se da un periodo de difusión de las sustancias en el agar de una hora a 4°C antes de llevar las placas a incubación.

Para los sensidiscos con extracto se emplea como punto de partida la concentración volumétrica natural del extracto en la esponja y luego, se puede variar la concentración

IMPORTANTE

Para cada concentración se utiliza un disco impregnado de extracto en una caja de Petri, con sus respectivos controles positivos y negativos en la misma caja.

Para las diferentes concentraciones de extracto se aplican alícuotas de 20 µl a cada uno de los discos esterilizados de papel filtro WHATMAN® GF-C de 6 mm de diámetro (Muricy *et al.*, 1993) y las cajas se incuban a 37°C durante 24 horas, para bacterias (Monks *et al.*, 2002) y a 25°C por 24 horas, para el hongo.

Se utilizan como controles negativos discos limpios (sin extracto y sin solvente) y con solo solvente en las proporciones y cantidades usadas según determinación previa. Como control positivo para bacterias, se usan sensidiscos comerciales de Cefoperazona OXOID® (75 µg), cefalosporina de tercera generación utilizada para el control eficaz de las bacterias mencionadas inicialmente, aunque con menor reactividad contra las bacterias Gram positivas (Walker, 2000); y de Nistatina comercial en suspensión LA SANTÉ® (2,273 g/ml), por ser ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de candidiasis (Walker, 2000).

Luego de la incubación, se miden los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano que se generan alrededor de los discos impregnados con los extractos y el de los sensidiscos comerciales.

Precaución

Cuando se obtienen muestras nativas aisladas de humanos con frecuencia es muy difícil determinar si son o no infecciosas, por eso todas las muestras y especímenes con este origen deben ser tratadas como infecciosas y manejarse bajo ese criterio. Las guías de precauciones estándar y universales fueron creadas por U.S. Center for Disease Control and Prevention están disponibles en [www. cdc.gov /ncidod/hip/isolat/isolat.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/hip/isolat/isolat.htm)

A continuación se incluyen aspectos relacionados con la conservación y tratamiento de las cepas microbianas, preparación y aplicación de discos con extracto, condiciones de esterilización, tiempo de incubación, preparación de inóculos, procedimientos de control, manejo de temperaturas durante el ensayo y algunas limitantes del método de difusión con discos.

4.1 MÉTODOS

4.1.1 Método Kirby-Bauer

En este método se coloca de manera uniforme un inóculo estándar del microorganismo en una caja de Petri que contenga agar Mueller-Hinton. Se permite que la sustancia activa difunda a partir de una solución acuosa desde una fuente hasta el agar. Se puede realizar en tubo de ensayo, en placas de Petri o en platos cuadrados (30 cm de lado). Cuando se usan placas de Petri, las diluciones de antibióticos o soluciones de prueba se aplican de diferentes formas dependiendo del tipo de fuente usada; así, la solución es adicionada a pozos o cilindros hechos sobre el agar por medio de una pipeta, o puede aplicarse en discos de papel, los cuales después son colocados sobre las placas con agar. Así, sobre la superficie de agar previamente inoculada con el organismo por estudiar, se colocan estos discos de papel de filtro impregnados con el antibiótico. El antibiótico difunde del disco hacia el agar, produciéndose zonas nítidas de inhibición de desarrollo alrededor de aquellos

discos que contienen antibióticos a los cuales los organismos estudiados son susceptibles (Koneman *et al.*, 1987).

4.1.2 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Método de clasificación basado en la respuesta *in vitro* de un organismo frente a un agente antimicrobiano a los niveles en los cuales dicho agente puede encontrarse en los tejidos o en la sangre con dosis prescritas de este agente (NCCLS, 2003). En este caso particular se define como el método basado en la respuesta *in vitro* de un organismo patógeno o no patógeno frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen marino con potencial antimicrobiano.

4.1.3 Medio agar Mueller - Hinton

De los medios disponibles, se considera el agar Mueller-Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones:

- Reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad.
- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim, y tetraciclina.
- Crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Aunque el agar Mueller-Hinton es confiable generalmente para pruebas de susceptibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, varían significativamente. Si el lote del medio no soporta un adecuado crecimiento de organismos de prueba, las zonas obtenidas en un disco de difusión usualmente son más grandes que lo esperado y pueden exceder los límites de control de calidad aceptable. Sólo las formulaciones del medio Mueller-Hinton que han sido controladas con la cepa de referencia de acuerdo al NCCLS pueden ser usados. En las pruebas se usó el Medio Agar Mueller-Hinton MERCK® con la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 Oxoid® (cepario Laboratorio de Microbiología - INVEMAR).

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 Preparación del medio

- (1) El agar Mueller - Hinton debe ser preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- (2) Inmediatamente después de esterilizar dejar enfriar en un baño de agua a 45 – 50°C, si no dispone de uno, dejar en el autoclave para que se enfríe a temperatura ambiente y con agitación periódica (cada 30 minutos en una plancha de agitación magnética a 90 °C y 560 RPM).
- (3) El medio debe permanecer líquido pero con temperatura que no supere los 45 °C.

2.1.1 pH

El pH de cada lote de agar Mueller - Hinton debería ser chequeado cuando el medio es preparado. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente. Si el pH es muy bajo, ciertas drogas parecería que pierden potencia (aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos), mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad (tetraciclinas). Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos. El pH puede ser controlado por ejemplo macerando una cantidad

suficiente de agar para sumergir la punta del electrodo o antes de esterilizar el medio cuando este se encuentra a temperatura ambiente (25°C) con indicadores de pH en varillas Merck® (escala 6.5-10.0).

2.1.2 Humedad

Un exceso de humedad después de servir el agar se presenta en la tapa de la placa y/o en la superficie del agar, las placas deben ponerse tangencialmente al fuego durante algunos segundos (10 aproximadamente) y las tapas más inclinadas hacia la llama hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente 10 a 30 segundos). La superficie debe ser húmeda, pero sin gotas de humedad en la superficie del medio o en la tapa de la placa antes de ser incubada.

Nota

Prueba en bacterias fastidiosas: El agar Mueller-Hinton sin suplemento sólo deberá usarse para bacterias aeróbicas o facultativas que crezcan bien en él. Especies fastidiosas tales como *Haemophilus* spp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *S. viridans* y *Streptococcus* β -hemolítico requieren suplementos o medios diferentes para crecer y ellos deberán ser probados en los medios específicos.

4.3 CONSERVACIÓN DE LOS SENSIDISCOS

3.1 Los discos de antibiótico comercial deben ser almacenados como sigue:

- Viales de discos sellados que contienen drogas de la clase β -lactámicos deben ser almacenados congelados, excepto pequeñas cantidades para trabajo inmediato, las que pueden ser refrigeradas sólo para una semana.
- Los viales de discos que no han sido abiertos deben ser sacados del refrigerador, 1 o 2 horas antes de usar para que igualen su temperatura a la del ambiente antes de abrir. Este procedimiento minimiza la cantidad de condensado que se forma cuando aire caliente toca los discos fríos.
- Una vez que un vial de discos se ha sacado de su paquete sellado, debe ser puesto con una cubierta ajustada y con un adecuado agente desecante. El dispensador debe alcanzar la temperatura ambiente antes de abrir. La excesiva humedad se debe evitar remplazando el desecante cuando el indicador cambia de color.
- Es importante revisar la fecha de vencimiento.

3.2 Los discos de extracto orgánico crudo tienen un tratamiento diferente:

- Se usan discos de papel filtro WHATMAN® GF-C de 6 mm (Muricy *et al.*, 1993) dispuestos en una caja de Petri separados unos de otros aproximadamente 5 mm. En esta caja se dispone el número de discos que se usaran en la prueba.
- Esterilizar los discos durante 15 minutos a 121°C y 15 psi. Simultáneamente, esterilizar viales de vidrio de 5 ml, destinados para preparar las soluciones de extracto orgánico crudo.
- Antes de usar los discos, estos deben estar a temperatura ambiente y asegurarse que estén completamente secos.
- En la cámara de flujo laminar, dispensar sobre cada disco 20 μ l de extracto y dejar que estos se sequen a temperatura ambiente con la caja de Petri cerrada.
- Para ser aplicados sobre el agar estos deben estar secos y a temperatura ambiente.

Importante

El extracto orgánico crudo debe ser probado a diferentes concentraciones (mínimo dos) partiendo de la concentración natural del extracto en el organismo de origen.

4.4 ESTÁNDAR DE TURBIDEZ PARA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para determinar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza el estándar de turbidez de BaSO_4 , equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO_4 se prepara como sigue: (NCCLS, 2003)

- (1) Una alícuota de 0,5 ml de 0,048 m/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se agrega a 99,5 ml de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
- (2) La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
- (3) La suspensión de Sulfato de Bario debe transferirse en alícuotas de 4 a 6 ml a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
- (4) Estos tubos deben ser sellados y guardados en oscuridad a temperatura ambiente.
- (5) El estándar de turbidez debe ser bien agitado en un vortex mecánico antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme. Si aparecen partículas grandes debe ser reemplazado. Suspensiones de partículas de látex pueden agregarse para agitar invirtiendo el tubo suavemente sin usar vortex.
- (6) El estándar de Sulfato de Bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente.

4.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**5.1 Conservación de cepas microbianas**

- (1) Un set de cultivos de todos los microorganismos permanece intacto tras su incubación y sólo será utilizado cuando se requiera transferir las cepas a un nuevo medio de cultivo. Las cepas se conservan bien en placas Petri y en caldo nutritivo a 4 °C durante aproximadamente 30 días (Gómez, *com. pers.*)
- (2) Un set de cultivos de todos los microorganismos se destina para uso continuo. Antes de cada siembra se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos y debe ser llevado a 4°C tras su utilización. Cada 30 días debe ser desechado.
- (3) Para el mantenimiento indefinido, las cepas se conservan en congelador (temperatura ideal -80 °C (Achkor, 2003)) en caldo tripticasa soja con glicerol 20% (Alarcón *et al.*, 2004).

5.2 Método de crecimiento

- (1) Al menos 3 a 5 colonias aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionan del agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y la muestra se transfiere a un tubo con 5 ml de un medio de cultivo adecuado (caldo nutritivo).

- (2) El caldo de cultivo es incubado a 37 °C por 24 horas, de este caldo de cultivo se extraer alícuotas correspondiente a dos asadas llenas, que son transferidas a 5 ml de un nuevo caldo nutritivo, este es incubado hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 18 a 24 horas). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml.
- (3) La turbidez del caldo se ajusta con caldo nutritivo para obtener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland. Para realizar este paso apropiadamente, se puede hacer ya sea usando un espectrofotómetro o, si se hace visualmente debe tener luz adecuada para comparar el inóculo con el estándar de 0,5 McFarland contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes.

Importante

No se recomienda el método directo de suspensión de colonias, ya que es importante garantizar que la cepa se encuentre en la fase exponencial de crecimiento.

4.6 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

- (1) En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se adiciona una alícuota de volumen conocido (0.2 ml de inóculo bacteriano y 0.5 ml de inóculo fúngico para 15 ml de agar, Zea *et al.*, 1986), al medio Mueller-Hinton líquido. Se coloca en una plancha con agitación magnética para homogenizar de esta forma el inóculo dentro del medio (90 °C y 560 RPM).
- (2) El medio inoculado se lleva a incubadora de 45°C, durante 2 horas, con agitación periódica (cada 30 minutos, 560 RPM).
- (3) Verter el preparado líquido y tibio a una placa Petri de vidrio, de fondo plano en un nivel de superficie horizontal para dar un fondo uniforme de aproximadamente 3 mm. Esto corresponde 15 ml para placas de 100 mm de diámetro.
- (4) Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.

4.7 APLICACIÓN DE LOS DISCOS A LAS PLACAS INOCULADAS

- (1) Los sensidiscos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 5 discos en placas de 100 mm para evitar superposición de los halos (Figura 3).
- (2) Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar.
- (3) Las placas son invertidas y puestas en nevera durante 20 minutos, antes de llevarlas a una incubadora a 37°C; esto mejora la difusión de sustancias al medio (Hewitt y Vincent, 1989). Las placas no se deben incubar en un ambiente de CO₂ porque los estándares de interpretación se desarrollaron usando aire ambiente.

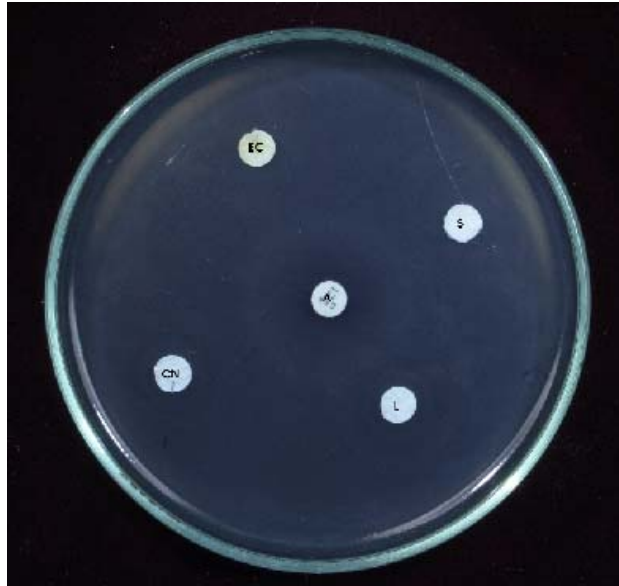


Figura 3. Disposición de los discos en una placa Petri de 100 mm EC: Extracto Crudo (Concentración x); CN: Extracto Concentración Natural; A: Antibiótico; S: Solvente; L: Disco sin sustancias

4.8 LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

(1) Después de 24 horas de incubación para bacterias y hongos (Monks *et al.*, 2002), cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa, a ojo desnudo, son medidos en mm con un calibrador, pasando por el centro del disco. La placa Petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. Si el organismo de prueba es un *Staphylococcus* spp o *Streptococcus* sp, se requieren obligatoriamente 24 horas de incubación y luz transmitida (placa se mantiene hacia la luz).

(2) El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente.

(3) Por tratarse de un extracto orgánico crudo, cuya composición se desconoce total o parcialmente, los tamaños de las zonas de inhibición no son interpretados en las Tablas NCCLS para ser informado como susceptible, intermedio, o resistente. Sólo se compara el diámetro de la zona inhibida por el extracto con el diámetro del antibiótico comercial usado como control positivo de la inhibición.

4.8.1 Controles

Cada una de las replicas del ensayo contará con tres tipos de controles:

1. Control de solvente
2. Control de antibiótico comercial
3. Control inerte

Estos controles permiten:

- (1) Determinar si existe un efecto de los solventes orgánicos sobre el crecimiento bacteriano. Si existe determinar cuanto de ese efecto de inhibición es atribuible a este.
- (2) Hacer una aproximación cuantitativa de la magnitud del efecto de inhibición producido por el extracto orgánico crudo respecto a los antibióticos comerciales, es decir, una aproximación de su poder antimicrobiano.
- (3) Confirmar el crecimiento del microorganismo así como la pureza del cultivo.
- (4) Confirmar las condiciones de esterilidad de los discos y de los extractos.
- (5) Hacer un seguimiento de los cambios de sensibilidad bacteriana respecto a los antibióticos.

4.9 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

Para la interpretación de los resultados respecto a la actividad del extracto, el procedimiento propuesto por Monks *et al.* (2002) es adecuado. Establece las siguientes categorías interpretativas para los diámetros de las zonas de inhibición:

- (-) No hay actividad
- (+) Actividad leve o débil (diámetro entre 7 -11 mm)
- (++) Actividad moderada (diámetro entre 11-16mm)
- (+++)

Respecto al microorganismo, existen tres categorías interpretativas aceptadas por el NCCL (Sensible, Intermedio y Resistente), para este tipo de análisis se consideran las dos categorías extremas:

Sensible: La categoría "sensible" implica que una cepa podría ser apropiadamente tratada con algún (algunos) compuesto (s) del extracto.

Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por la(s) concentración(es) usadas del extracto. Pueden tener CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) muy alta, que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica puede no ser confiable. Este tipo de resultados requieren de estudios posteriores a concentraciones mayores de extracto o de sustancias aisladas de este.

4.10 LIMITANTES DE MÉTODO

- (1) Desconocer la naturaleza de los compuestos presentes en un extracto orgánico crudo constituye una limitante, ya que depende de esta la adecuada difusión de las sustancias en el medio Agar Mueller-Hinton y la facilidad con la cual la sustancia puede ser transferida del disco al medio.
- (2) De acuerdo con lo anterior es posible que se presenten zonas de turbidez alrededor del disco, efecto de la difusión del extracto en el medio, que podrían enmascarar los halos de inhibición que produzcan estos mismos.

5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN HUEVOS FERTILIZADOS DE *Lytechinus variegatus*

La actividad citotóxica-antimitótica de un compuesto se basa en la capacidad que tiene este para dañar o causar la muerte directa a una célula (citotoxicidad) o indirectamente, inhibiendo y/o retrasando las divisiones mitóticas que tienen lugar en una célula inducida (e.g. un huevo fertilizado) (antimitosicidad).

La prueba de citotoxicidad y antimitosicidad en huevos fertilizados de erizo ha sido utilizada ampliamente por biólogos y bioquímicos debido a la simplicidad y tamaño de las células, características que permiten visualizar resultados con relativa facilidad en estudios sencillos de división celular hasta en aquellos que incluyen un fuerte componente molecular. Una vez fertilizados los huevos, las primeras divisiones son sincrónicas, permitiendo un inusual grado de uniformidad célula a célula cuando se investigan procesos tales como la mitosis, el clivaje o los eventos bioquímicos que ocurren durante la replicación celular. Es también útil para el estudio de la acción de drogas, ya que el embrión se expone a la droga durante los mismos estados del ciclo celular, lográndose de esta forma un alto grado de reproducibilidad así como de uniformidad en estudios farmacológicos (Jacobs *et al.*, 1981).

Aunque son variados los tipos de células que se pueden usar para comprobar la susceptibilidad *in vitro* frente a sustancias de interés, los gametos de erizos marinos se pueden usar con mayor frecuencia por que no requieren técnicas sofisticadas de obtención y mantenimiento y son suficientemente sensibles para identificar con claridad actividad positiva o negativa.

Por estos atributos, este ensayo se recomienda para la exploración básica de esta actividad de manera rápida y confiable, e incluso para hacer una aproximación a la potencia relativa de las sustancias en estudio; obteniendo resultados relevantes tanto a nivel ecológico como a nivel farmacológico.

5.1 Acondicionamiento para mantener *Lytechinus variegatus* en laboratorio

Lytechinus variegatus Lamarck, 1986 o “erizo blanco” se encuentra fácilmente en las praderas de fanerógamas marinas del Caribe (García, 2001) y puede ser colectado mediante buceo a pulmón libre. Debe ser transportado con abundante agua y en el menor tiempo posible a un laboratorio húmedo, en el cual previamente se acondiciona un estanque o varios acuarios con agua de mar filtrada (AMF) recirculante y fondo de cascajo coralino, en el que se depositan los erizos (Figura 4). Los erizos se mantienen en buenas condiciones para el desove siguiendo estas recomendaciones:

- En acuarios de 50-60 lt se mantienen entre tres y cuatro erizos; densidades mayores están asociadas a mortalidades. Cuando se supera esta densidad se debe disponer de fuentes adicionales de aireación.
- La temperatura del agua debe ser estable. Una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ es tolerada por esta especie en el laboratorio. Mientras que la salinidad puede variar en $36.3 \pm 0.6 \text{ ‰}$.

- En el medio natural, *L. variegatus* se alimenta directamente de *Thalassia testudinum*, pero en el laboratorio no es fácil mantenerla, de tal forma que se pueden alimentar con *Ulva lactuca* (Figura 5), combinándola en ocasiones con *Gracilaria* sp. (aproximadamente 70 g-peso fresco/individuo; una o dos veces al día. Esta ración permite mantener la disponibilidad de huevos en erizos que no han sido desovados. Las algas colectadas del medio natural son lavadas con AMF, antes de ser usadas y se mantienen en el laboratorio con aireación constante y fotoperíodo natural.



Figura 4. Acuario y estanque para el mantenimiento de *Lytechinus variegatus* en un laboratorio húmedo. Los erizos tienden a buscar refugios que pueden ser simulados con tubos de PVC



Figura 5. Población natural de *Ulva lactuca* (Punta Betín. Santa Marta)

5.2 Prueba de citotoxicidad y antimitosicidad

5.2.1 Desove y fecundación

1. Preparar cloruro de potasio (KCl) 0,5 M. El cloruro de potasio 0,5 M se prepara a partir del reactivo comercial deshidratado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esta debe conservarse a 4°C, protegido de la luz directa y ser reemplazada cada 30 días. Mientras se encuentra en uso también debe procurarse mantener baja temperatura (10-15°C).

2. Se induce el desove por inyección intracelómica oral de 0,5-1,0 ml de KCl 0,5 M; introduciendo 1-1,5 cm de la aguja en forma inclinada desde el eje central del erizo hacia el borde (Figura 6). Si con la primera punción no se observa la salida masiva de gametos, puede realizar dos punciones adicionales (máximo) en diferentes zonas de la periferia oral.

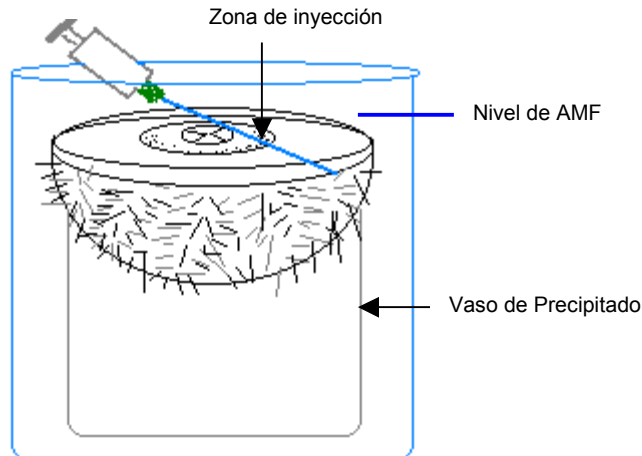


Figura 6. Montaje para la obtención de gametos del erizo *Lytechinus variegatus*

3. Colocar el erizo boca-arriba sobre un vaso de precipitado de 100ml, inmerso en AMF y esperar el desove.
4. Lavar los huevos con AMF a través de una malla de 250 μm de poro y llevarlos a un volumen final de 100 ml en AMF.
5. Adicionar 50 μl de esperma concentrado (esperma obtenido en seco o en un volumen máximo de 5 ml de AMF) o de dos a tres gotas de esperma obtenido en un volumen entre 80-100 ml de AMF a esta suspensión de huevos. Estas diluciones del esperma se realizan para evitar la polispermia (Daza y Vélez, 2003).
6. Agitar hasta obtener una solución homogénea y un minuto después, observar para detectar la presencia de la membrana de fecundación de los huevos en un microscopio. Para realizar el bioensayo la fecundación debe ser entre 80-100% (Díaz-Ruíz, 2002).
7. Si los huevos aún no están fertilizados agregar esperma diluido, gota a gota, revisando al microscopio la fecundación hasta alcanzar el porcentaje ideal.

Importante

Se obtienen mayores cantidades de gametos y con mayor facilidad; cuando se realiza el procedimiento en las primeras horas de la mañana. Es importante también señalar que antes del desove no debe proporcionarse alimento a los animales.

5.2.2 Bioensayo

1. Disponer cajas Petri de 60 o 100 mm de diámetro, mínimo por duplicado para cada extracto, fracción o compuesto a probar, con alícuotas de 25 μl de extracto a la concentración natural más 3 ml de AMF y 3 ml de huevos fertilizados.
2. Mantener los huevos a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) en agitación frecuente durante 90 minutos o hasta que aproximadamente 100% de los huevos del control 1 hayan llegado al estadio de 8 células.

3. Fijar con una gota de Formol 10% y agitar.
4. Servir tres gotas de huevos en una lámina portaobjetos para realizar conteos del número de células (1, 2, 4 y 8) en un número determinado de campos al azar (10x). Además registrar el número de huevos fertilizados y no fertilizados y el número de huevos atrofiados, con malformaciones y divisiones incompletas como evidencia de citotoxicidad.

Simultáneamente se realizan los controles:

- Control negativo: 3 ml de AMF y 3 ml de huevos fertilizados.
- Control de solvente: 3 ml de AMF, 3 ml de huevos fertilizados y la cantidad de solvente equivalente al volumen del tratamiento (extracto).
- Control positivo (opcional): 3 ml de AMF, 3 ml de huevos fertilizados y 1 ml de colchicina (100 µg/ml).

IMPORTANTE

La colchicina debe ser congelada inmediatamente después de su preparación. Para usarla debe descongelarse a la temperatura ambiente, una vez descongelada se debe rechazar el volumen sobrante, este no puede refrigerarse ni ser usado nuevamente.

Para determinar el nivel de la actividad de los extractos se usan las siguientes categorías de inhibición (Adaptadas de Zea *et al.*, 1986):

	% de inhibición	Actividad
(++++)	80-100%	Fuerte (SD=80-100%)
(+++)	60-80%	Moderada (DC=80-100%)
(++)	20-60%	Media (CC=≤80%)
(+)	1-20%	Baja (CC=80-90%)
(-)	0-1%	No hay actividad (CC=90-100%)

Los extractos activos que inhibieron las divisiones celulares en más del 80% de los huevos, son posteriormente sometidos a un ensayo dependiente del tiempo:

1. Disponer de suspensiones de huevos fertilizados en cajas de Petri por duplicado para cada serie de extracto.
2. Aplicar la misma cantidad y concentración de extracto a los 5, 15, 25, 35, 45 y 55 minutos después de la fertilización.
3. Fijar con formol 10% en el minuto 65 de toda la serie o cuando los huevos del control hayan alcanzado el estadio de dos células.
4. Contar el número de células de huevos escogidos en un número determinado de campos al azar.
5. Se usan los mismos controles de la Fase I, pero en este caso el control positivo es obligatorio.

IMPORTANTE

1. Se recomienda realizar un mínimo de dos replicas completas de cada tratamiento para las pruebas de la Fase I y de la Fase II.
2. Se observarán efectos de malformaciones o divisiones incompletas como evidencia de citotoxicidad

6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIEPIBIÓTICA

Con el fin de comprobar la capacidad antiepiibiótica de los extractos contenidos en las esponjas, se prepara un medio gelatinoso de agar compacto (Phytigel) y se dispone en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, contando con 10 réplicas por tratamiento.

Para los geles control se disuelven 0,32 g de Phytigel en 20 ml de agua desionizada fresca, y para los tratamientos (extractos) se disuelven 0,21 g de Phytigel en la misma cantidad de agua (Chaves, 2003). Una vez disuelto, se calienta y agita durante 15 minutos.

Al cabo de este tiempo, se añade 5,13 ml de metanol:diclorometano a los controles y para los tratamientos de las esponjas las cantidades equivalentes al contenido natural de extracto en 20 ml de esponja, y del solvente utilizado para disolver el extracto.

A las cajas se les pega una malla plástica para evitar que el gel se caiga. Los geles calientes se sirven inmediatamente en las cajas, evitando la formación de burbujas. Se dejan enfriar a temperatura ambiente para que solidifique el medio (Figura 7).

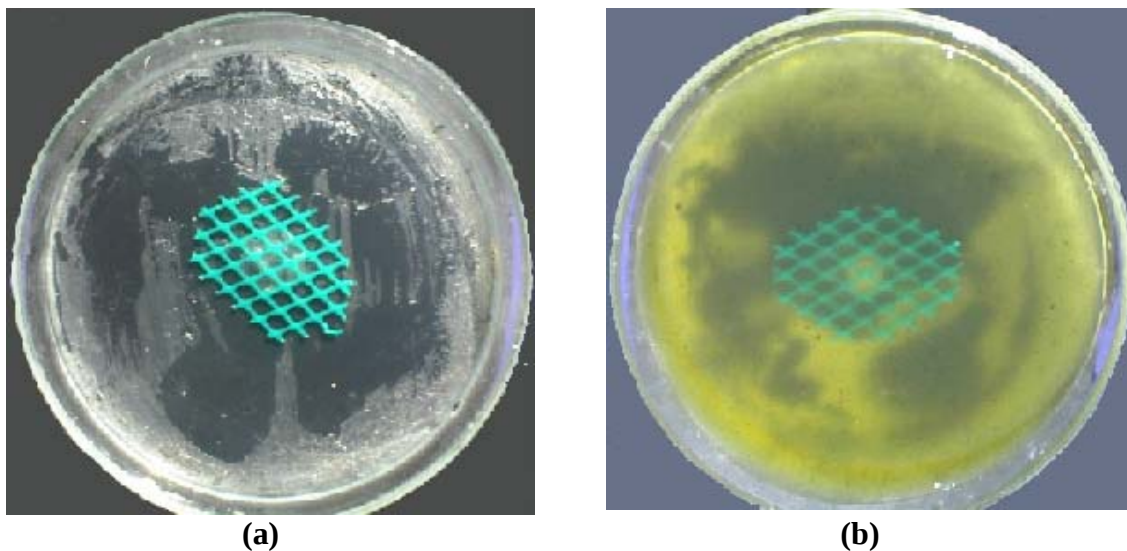


Figura 7.(a) Apariencia del gel control (b) Apariencia del gel con extracto

Las cajas se pegan a placas de acrílico y se disponen en orden aleatorio en una estructura de PVC (Figura 8,) y se sumergen en el mar, quedando el gel orientado hacia el fondo. Esta estructura de deja sumergida durante 28 días (Figura 9, Figura 10 y Figura 11).

Se realizan observaciones cualitativas de presencia de organismos epibiontes, una vez por semana mediante buceo a pulmón, y al cabo de 28 días las cajas se recuperan y se llevan al laboratorio, donde se mantienen en acuarios con agua de mar filtrada, en flujo abierto y continuo.

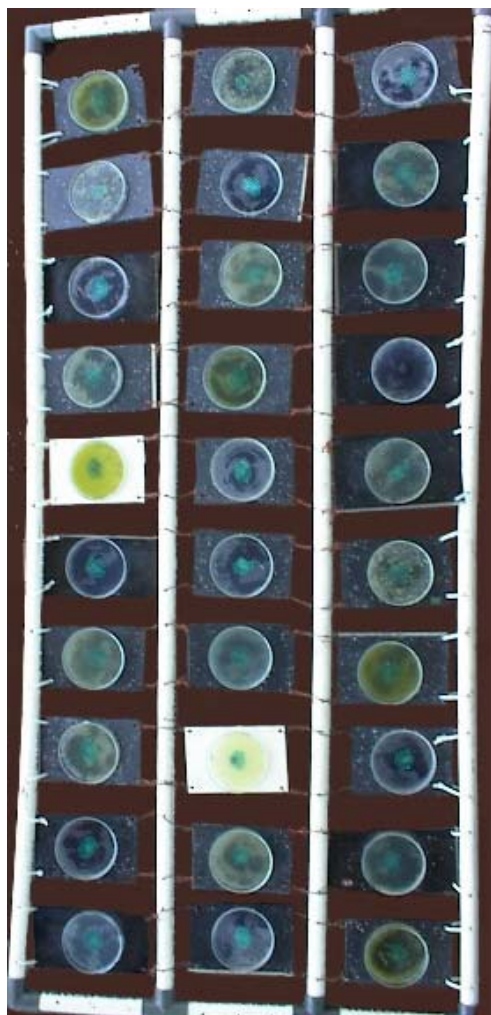


Figura 8. Montaje de los geles para el ensayo de antiepibiosis



Figura 9. Disposición de la estructura con los geles en el mar



Figura 10. Revisión de los geles en el ensayo de antiepibiosis



Figura 11. Estructura con los geles 28 días después de sumergida en el mar

Luego se observan al estereoscopio y se registra el número de individuos sésiles por grupo principal detectado (poliquetos, ascidias, briozoos, hidroides, esponjas, cianofíceas, etc.), así como una estimación de la cobertura a partir de la presencia/ausencia de los organismos, usando el método de rejilla de puntos (Henrikson y Pawlik, 1995; Pereira *et al.*, 2002; Cháves, 2003) seleccionando 100 puntos al azar en cada caja.

Las mediciones de las variables analizadas se pueden comparar entre tratamientos (controles y extractos) mediante las pruebas estadísticas de Kruskal – Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn, con un alfa de 0.05 (Siegel y Castellan, 1988).

Después de hacer las observaciones y cuantificaciones, se seleccionan aleatoriamente cinco cajas de cada tratamiento y se someten al mismo proceso de extracción que los tejidos de esponja, con el fin de determinar el porcentaje promedio de extracto (en peso) que permanece en los geles después de estar 28 días en el mar y 3 días en acuarios con agua marina filtrada en recirculación y se realiza una cromatografía de capa fina para compara el perfil del extracto original y el recuperado del gel y determinar si el gel incorpora algo nuevo del medio.

7 EVALUACIÓN DE LA DISUASIÓN ALIMENTARIA EN PECES GENERALISTAS

Para realizar la prueba de disuasión alimentaria se colectan individuos del pez damisela bicolor, *Stegastes partitus* (Pomacentridae) mediante buceo con equipo autónomo, y se trasladan en bolsas plásticas al laboratorio en el cual son sometidos a un periodo de aclimatación de 30 minutos aproximadamente, para posteriormente ubicarlos en acuarios independientes (Figura 12).



Figura 12. Mantenimiento de los peces en acuarios

Una vez ubicados en los acuarios se dejan en ayuno durante 24 horas. Durante los siguientes siete días, los peces se alimentan dos veces al día con pellets control. Al cabo de este tiempo, se alimentan en el horario acostumbrado y una hora después de alimentarlos, se hace la prueba de disuasión.

Los pellets control se preparan con harina de trigo y de manto de calamar liofilizado (Chaves, 2003). Se mezclan 3 g de harina de trigo con 0,7 g de harina de manto de calamar y 1,5 ml de agua; no se les agrega la mezcla de solventes, ya que Chaves encontró que no tienen un efecto disuasor sobre la actividad alimentaria de estos peces.

Los pellets tratamiento se preparan mezclando 1 g de harina de trigo con 0,15 g de harina de manto de calamar, 0,35 ml de agua desionizada y se agrega la cantidad de extracto volumétricamente equivalente a 1,2 ml de esponja.

Para el experimento, se da un pellet control a un pez, si no lo ingiere, no se tiene en cuenta y se prueba con otro pez; cuando lo ingiere, se espera un momento y se le ofrece un pellet con extracto; si lo toma en la boca y lo rechaza o simplemente lo ignora, se le ofrece otro pellet control; si lo consume, se marca como disuasor, si no lo ingiere, no se tiene en cuenta y se prueba con otro pez. Si ingirió el pellet con extracto se marca como no disuasor (Figura 13) (Daza y Vélez, 2003).

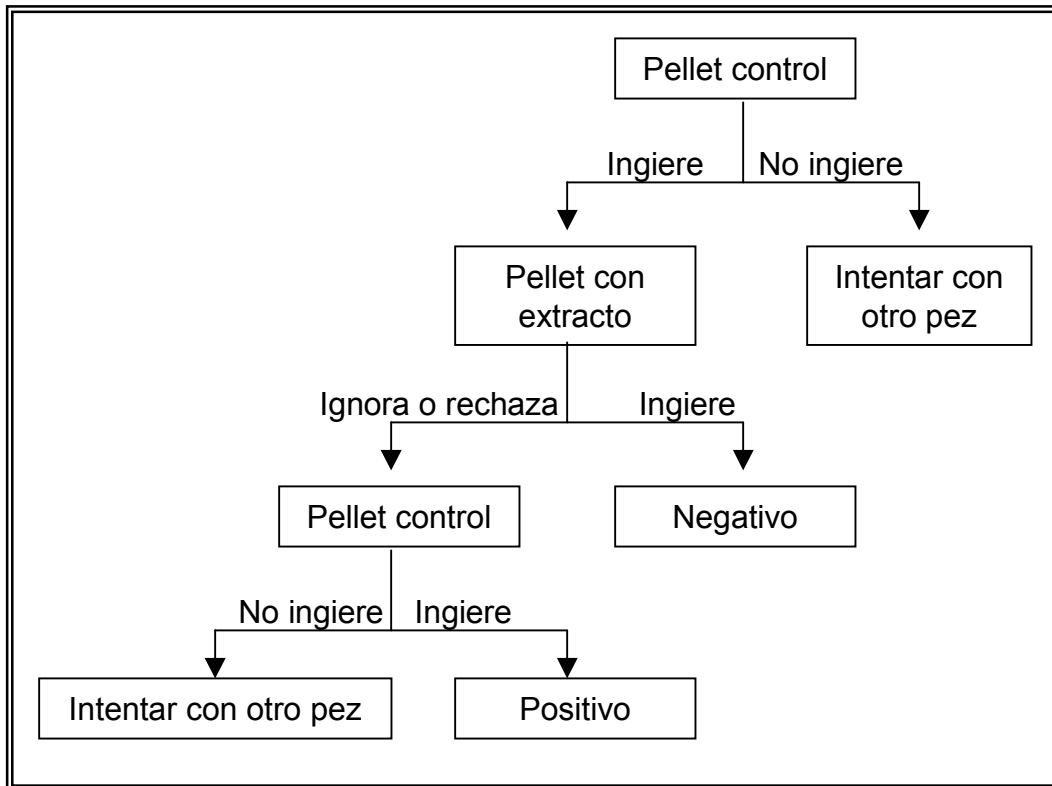


Figura 13. Procedimiento para evaluar el potencial disuasor de los extractos

La prueba se repite hasta que diez peces independientes acepten o rechacen claramente los pellets impregnados. Se realizan cuatro pruebas para cada extracto en el mismo grupo de peces, dejando doce horas entre cada prueba, alimentándolos normalmente a las horas programadas. De acuerdo con la prueba estadística exacta de Fisher (Siegel y Castellan, 1988), hay un rechazo significativo si de diez peces seis o menos consumen los pellets con extracto. Se grafica el promedio de pellets aceptados en las cuatro pruebas, y si ese promedio no sobrepasa los 6 pellets aceptados, hay rechazo significativo.

8 TOXICIDAD SOBRE CORALES

Se colectan varias colonias del coral *Madracis mirabilis* mediante buceo autónomo y se transportan en bolsas con cierre en agua del lugar. Una vez en el laboratorio, se aclimatan durante un periodo de dos horas, al cabo de las cuales se ubican en acuarios con agua de mar filtrada en flujo semicerrado y constante, así como aireación permanente. Allí permanecen durante dos días, siendo alimentadas una vez al día con nauplios de *Artemia*.

Posteriormente se seleccionan tres ramitas de coral (por cada extracto que se desee evaluar), que presenten pólipos sanos, y se ubican en pequeños acuarios independientes con agua marina filtrada y aireación continua, a los que se les adecua una pequeña base para sostener a los corales (tubo de PVC de ½") (Figura 14).

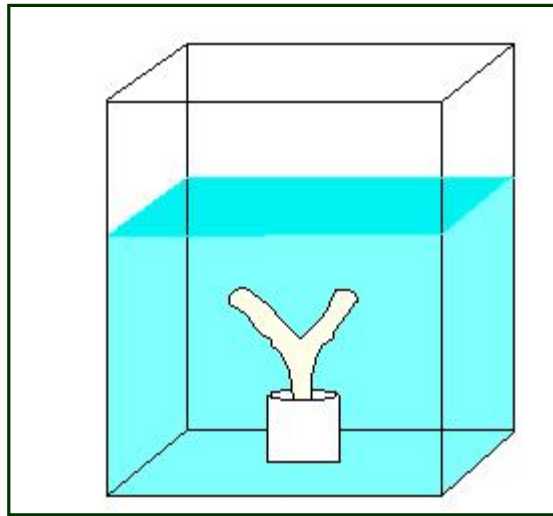


Figura 14. Mantenimiento de los corales en los acuarios

Para cada serie de experimentos, se ubica una columna de tres acuarios con agua limpia (control) y tres columnas de tres acuarios con adición de extracto de esponja (tratamiento). Cada acuario se llena con 600 ml de agua marina filtrada y para los tratamientos se agrega la cantidad de extracto presente en 10 g. (peso fresco) de esponja. Es decir, que tanto controles como tratamientos, cuentan con tres réplicas (Figura 15).

Antes de agregar los extractos, se realiza un conteo de los pólipos sanos en un área de 1 cm² en cada una de las réplicas, tanto de controles como de tratamientos. Después de agregar los extractos a los tratamientos, se cuenta cada 10 minutos durante dos horas, el número de pólipos contraídos (Dueñas, 2000).

Al cabo de las dos horas, los corales son trasladados a acuarios con agua limpia y se alimentan con los nauplios de *Artemia*. Después de 24 horas se realiza nuevamente un conteo de pólipos contraídos.



Figura 15. Montaje del bioensayo de toxicidad sobre corales

Los datos se pueden analizar por medio de gráficas tiempo vs. porcentaje de pólipos contraídos en el cm^2 observado (Dueñas, 2000).

Los nauplios de *Artemia* se pueden obtener de la siguiente forma:

Se pesan 3 g. de huevos y se dejan en hidratación con agua dulce durante hora y media; al cabo de este tiempo se seleccionan los huevos que permanecen en el fondo del recipiente, ya que estos son los viables; posteriormente se decapsulan y se obtiene los nauplios mediante agitación en agua dulce/agua marina filtrada (1:1), se preservan refrigerados a una temperatura de 4°C (Amat, 1987).

Los corales se alimentan todos los días en el horario establecido, suministrando una proporción de aproximadamente tres nauplios de *Artemia* por pólipo de coral.

BIBLIOGRAFÍA

- Achkor, H. 2003. Estudio funcional de la Formaldehído Deshidrogenasa dependiente de Glutación de *Arabidopsis thaliana*. Aplicaciones en fitoremediación. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Cerdanyola. Bellaterra. 93 p.
- Alarcón, T., M. Baquero, D. Domingo, R. López-Brea. 2004. Procedimientos en Microbiología Clínica. Eds. Cercenado, E., Cantón, R. 25 p.
- Amat, F. 1987. Utilización de Artemia en acuicultura. 68 p.
- Chaves, A. 2003. Evaluación del posible papel ecológico de los extractos orgánicos crudos de las esponjas excavadoras *Cliona aprica* Pang, 1973, *C. caribbaea* Carter, 1882, *C. delitrix* Pang, 1973 y *C. tenuis* Zea y Weil, sp. nov. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo Marino. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina. 127 p.
- Daza, Z.E. y A.P. Vélez. 2003. Ensayos de disuasión alimentaria, alelopatía por contacto, toxicidad y citotoxicidad de los extractos orgánicos crudos de las esponjas *Cliona varians* (Duchassaing y Michelotti, 1864) y *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977). Anteproyecto de Trabajo de Grado para optar el título de Biólogo Marino. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina. Área de ingeniería y recursos naturales. 46 p.
- Díaz-Ruiz, M. 2002. Ensayos de actividad biológica y ecología química de los extractos orgánicos crudos de algunas macroalgas del Caribe colombiano. Trabajo de Grado. Facultad de Biología Marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 68 p.
- Dueñas, A. 2000. Ensayos sobre bioactividad y ecología química de extractos crudos de la esponja marina *Axinyssa ambrosia* (Clase Demospongiae, Familia Halichondriidae). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 81 p. + anexos.
- García, C. 2001. Praderas de Hierbas Marinas. Departamento de Biología. UPR-Humacao. Puerto Rico. www.cuhwww.upr.clu.edu
- Jacobs, R., S. White, y L. Wilson. 1981. Selective compound derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. Federation Proceedings. 40(1):28-31.
- Muricy, G., E. Hajdu, F. Araujo, y A. Hagler, 1993. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). Scientia Marina. 57 (4): 427-432.

- Henrikson, A.A. y J.R. Pawlik. 1995. A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194: 157 – 165.
- Hewitt, W. y S. Vincent. 1989. *Theory and Application of Microbiological Assay.* Academic Press, Inc. San Diego. California.
- Koneman, E.W., S. Allen, V. Dowell. 1987. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* J.B. Lippincott Company. Philadelphia. 533 p.
- Monks, N.R., C. Lerner, A. Henriques, F. Farias, E. Schapoval, E. Suyenaga, A. da Rocha, G. Schwartzmann, y B. Mothes. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* (281): 1– 12.
- Muricy, G., E. Hajdu, F. Araujo, y A. Hagler. 1993. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Scientia Marina.* 57 (4): 427-432.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Document M2-A8. 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standard Vol 23 (1). Wayne. Pennsylvania.
- Pereira, R.C., A.G.V. Carvalho, B.A.P. Gama y R. Coutinho. 2002. Field experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants. *Braz. J. Biol.* 62 (2): 311 – 320.
- Siegel, S y N.J. Castellan. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences.* 2nd edition. Mc Graw – Hill Book Company. Estados Unidos. 399 p.
- Walker, T. 2000. *Microbiología.* Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 532 p.
- Zea, S., A. Medina y C. Duque. 1986. Ichthyotoxic, cytotoxic and antimicrobial activity of some sponges of the Colombian Caribbean. *An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín* (15/16): 31-48.