

Aislamiento e identificación de bacterias cultivables asociadas a poríferos y tunicados

Marissa Solange Bermeo Infante¹, Cecilia Tómalá², Cristóbal Domínguez² & Jenny Rodríguez².

¹ Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

² Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marina (CENAIM-ESPOL), Escuela Superior Politécnica del Litoral, San Pedro de Manglaralto, Santa Elena, Ecuador.

Resumen

La gran mayoría de metabolitos de importancia se han identificado a partir de organismos marinos bentónicos, por sus microorganismos asociados. El uso de probióticos fomenta el desarrollo de una acuicultura sustentable, ya que es una alternativa al uso de antibióticos. Se aislaron cepas bacterianas de esponjas pertenecientes al género *Aplysina*. Se identificó bacterias candidatas a probióticos pertenecientes al género *Pseudovibrio* mediante el principio de exclusión competitiva frente vibrios patógenos, y se las identificó mediante bioquímica clásica y análisis moleculares (ADNr 16s). El 27% de las bacterias analizadas fueron bioactivas contra todos los patógenos estudiados. Los análisis moleculares mostraron una predominancia de la especie *Pseudovibrio denitrificans*. Además, se confirmó la presencia de la sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) en 13 cepas aisladas.

Palabras clave: Esponjas, *Vibrio*, *Pseudovibrio*, bioactividad, antimicrobiano, NRPS.

Abstract

The great majority of important metabolites have been identified from benthic marine organisms, by their associated microorganisms. The use of probiotics promotes the development of sustainable aquaculture, since it is an alternative to the use of antibiotics. Bacterial strains were isolated from sponges belonging to the genus *Aplysina*. Candidate bacteria were identified for probiotics belonging to the genus *Pseudovibrio* through the principle of competitive exclusion against pathogenic vibrios, and it is identified by classical biochemistry and molecular analysis (16 rDNA). 27% of the analyzed bacteria were bioactive against all the pathogens studied. Molecular analyzes show a predominance of the species *Pseudovibrio denitrificans*. In addition, the presence of ribosomal peptide synthetase (NRPS) was confirmed in 13 isolated strains.

Key words: Sponges, *Vibrio*, *Pseudovibrio*, bioactivity, antimicrobial, NRPS.

1. INTRODUCCIÓN

Los *Vibrios* son un género de bacterias que causan grandes episodios de mortalidad en el ambiente marino y producciones acuícolas, afectando generalmente a peces e invertebrados. Además, es agente causal de enfermedades gastrointestinales en seres humanos por consumo de productos del mar (Leyton & Riquelme, 2008). El uso desmedido y sin control de agentes antimicrobianos para combatir patógenos en la acuicultura, ha dado como resultado un aumento de la resistencia microbiana. En diversos países, así como en el Ecuador se ha descrito resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos asociados a patógenos en *Vibrio* spp. (Li et al., 1999; Karunasagar et al., 1994; Sperling et al., 2015). Este creciente problema complica el control de enfermedades, por lo cual el desarrollo de nuevos agentes bioactivos es altamente necesario. Los océanos y organismos marinos representan un potencial recurso para el descubrimiento de productos, por lo cual ha tomado una creciente importancia (Smith, 2008; Crowley et al., 2014).

Las esponjas son organismos sésiles primitivos que han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse de patógenos, competidores y depredadores mediante un arsenal químico, metabolitos secundarios. Generalmente, estos compuestos son producidos por microorganismos asociados más que por el propio organismo (Taylor et al., 2007). Estos metabolitos secundarios con propiedades bioactivas pueden ser producto de la actividad de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), que son enzimas de múltiples dominios y módulos enzimáticos, dando lugar a la producción de diversos compuestos (Khan et al., 2004). Las esponjas albergan una alta biodiversidad a nivel microbiano ya que su estructura está constituida alrededor de 40 a 60% por microorganismos asociados (Hentschel et al., 2006; Haroim et al., 2009). En ambos organismos se han podido encontrar compuestos de interés farmacológico, entre los cuales figuran compuestos con propiedades antimicrobianas, antitumorales, anti-inflamatorias, antioxidantes, anti fúngicos, anti leucémicos, neuroactivos, entre otros (Thomas et al., 2010).

Entre los microorganismos que pueden albergar las esponjas se encuentra el género *Pseudovibrio*, el cual ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Vibrios* spp., mostrando su potencial como fuente de compuestos probióticos (Flemer et al., 2011; Jelita et al., 2014). Este género ha sido descubierto hace más de diez años, y desde entonces ha mostrado producir una variedad de compuestos bioactivos prometedores en el campo farmacéutico, al mostrar actividad inhibitoria frente a bacterias de importancia clínica (Crowley et al., 2014). El género de esponjas *Aplysina* es de particular interés ya que más del 13% de su peso en seco contiene altas concentraciones de metabolitos con actividad antimicrobiana (Hentschel et al., 2001). El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar a nivel bioquímico y molecular bacterias del género *Pseudovibrio* asociadas a esponjas del género *Aplysina*, que posean actividad antimicrobiana frente a especies de *Vibrios* spp. para identificar microorganismos candidatos a probióticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de esponjas y ascidias del género *Aplysina* y *Aplidium* respectivamente, fueron recolectadas mediante buceo autónomo, en el Islote el Pelado (01°55, 9' S – 08°47,2' W), entre Junio-Septiembre del 2016, a profundidades de 10 a 20 m en Ayangue, Provincia de Santa Elena-Ecuador. De cada espécimen se extrajo un peso aproximado de 50g. Estos se colocaron en fundas plásticas con agua del medio marino, registrándose el sitio y profundidad. Posteriormente se trasladaron en neveras de polietileno a temperatura ambiente, al laboratorio de Microbiología de CENAIM-ESPOL.

Cepas patógenas fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de CENAIM-ESPOL, para posteriores análisis de bioactividad.

Tabla 1. Patógenos a emplear en las pruebas de bioactividad.

Bacterias	Características
<i>Vibrio harveyi</i>	Cepa L29, aislada local.
<i>Vibrio campbelli</i>	Cepa luminiscente LM-2013 aislada de larvas de camarón que presentaron mortalidad.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa 1	Cepa ATCC 27969, aislada de colección transmitida al humano por consumo de especies marinas contaminadas.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa 2	Cepa BA94C2, aislada local de camarones juveniles que presentaron mortalidad.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Cepa 53, aislado local de larvas que presentaron el Síndrome de “Bolitas.

Aislamiento de bacteriano

Las muestras de esponjas fueron lavadas con agua de mar previamente esterilizada a fin de remover arena y detritus, los endobiontes y epibiontes visibles del tejido se retiraron manualmente con ayuda de un bisturí. Se recogió un trozo aproximado a 5g de diferentes partes del organismo y estos se maceraron y diluyeron en agua de mar esterilizada, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo esterilizados, las diluciones a sembrar fueron 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} en placas de agar marino (Difco). La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de difusión en medio sólido, incubando por 24 a 48 horas a temperatura constante de 28°C, luego de la incubación se seleccionó a los *Pseudovibrios* por diferencias morfológicas. Posteriormente cada cepa se purificó, mediante siembra por agotamiento, en placas individuales. Obtenidas las cepas, estas se incubaron a 26°C, se realizó un screening primero por características morfológicas

para asegurar la obtención de *Pseudovibrios*, seguido de un RAPDS para seleccionar bacterias que difieran (Fukunaga et al., 2006).

Determinación in-vitro de la bioactividad antibacteriana

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las cepas aisladas de esponjas por el método de difusión de agar por cúmulos (Crawford et al., 1999; Balouiri et al., 2016) frente a las cepas patógenas: *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* cepa 1, *Vibrio parahaemolyticus* cepa 2 y *Vibrio campbelli*. Las cepas patógenas se ajustaron a 10^{-8} para sembrar 100 μ l por extensión en medio agar marino. Se colocaron cúmulos de las cepas de esponjas con ayuda de asas de platino de 5 mm de diámetro en las mismas placas de agar. Se dejó en incubación a 26°C durante 2 días y se registró el diámetro de la zona de exclusión en milímetros (mm) (Anand et al., 2005).

Caracterización bioquímica

Los microorganismos fueron caracterizados mediante pruebas bioquímicas. Se analizó las bacterias mediante tinción Gram, motilidad, reacción de catálisis, presencia de oxidasa, uso de aminoácidos (arginina, ornitina y lisina), uso de carbohidratos (sucrosa, glucoronato y manosa), uso de citrato como fuente de carbono, formación de diacetyl (Voges-Proskauer), producción de indol, se determinó del metabolismo (fermentativo u oxidativo), la habilidad para fermentar glucosa y se caracterizó la morfología celular. Para evaluar los requerimientos de NaCl se evaluaron varias concentraciones (2% - 5%) y se comparó el crecimiento por densidad bacteriana. (Kumar & Jogani, 2014; Sertán-de Guzmán et al., 2007).

Extracción de ADN total

Colonias aisladas de cultivos bacterianos puros seleccionados de las placas de agar marino se suspendieron en 500 μ L de solución buffer (100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y 80 μ L de SDS al 10%. La solución de mezcla se dejó durante una hora a baño maría a 55°C, se añadió 600 μ L de fenol y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, para añadir 1 volumen de cloroformo- isoamil (24:1), se agitó y centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se añadió 2.5 volúmenes de etanol frío al 100% y 0.5 volúmenes de acetato de amonio 5 M al sobrenadante. La solución se almacenó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó la solución a 13,000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 300 μ L de etanol frío al 70%. El pellet se dejó secar por 2 horas a 45 °C y el ADN se re-suspendió en 50 μ L de agua Mili-Q.

Amplificación de ADNr 16s mediante PCR

La amplificación de los genes 16s rRNA (ADNr) en los aislados bacterianos (Harder et al., 2003), se realizaron en un volumen total de 30 μ L conteniendo 10 ng de DNA, 0.2 mM de dNTPs ((dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.06 U de Taq DNA polimerasa, 2.5 mM de MgCl₂, 1x de PCR Buffer y 0.3 mM de cada primer: 27F(5'-

CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R(5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACTTGTGTTACGACTT-3'). La PCR se realizó a 94°C durante 5 minutos para la desnaturalización inicial; 40 ciclos a 94°C durante 40 segundos para la desnaturalización, 44°C por 40 segundos para la hibridación y 72°C durante 40 segundos para la polimerización; la polimerización final fue a 72°C por 10 minutos; y su conservación a 4°C por 30 minutos. La amplificación de DNA se verificó mediante electroforesis de 5µL de mezclas de PCR en agarosa al 1.5% en TBE al 0.5X.

Detección de genes NRPS

La presencia de genes envueltos en la producción de metabolitos secundarios se buscó a partir de las bacterias aisladas. Los primers A3(5'-CGS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3') y A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004) se emplearon para amplificar el dominio A de NRPS. Se realizó una reacción de PCR de 20 cepas seleccionadas (bioactivas) con 30 µL de un mix que contenía 10 ng de ADN genómico, 1x de PCR buffer, 0.06 U de Taq DNA polimerasa, 0,2Mm de dNTPs, 0,5mM de cada primer y 2.5mM de MgCl₂. La PCR se realizó a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización inicial; 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos para la desnaturalización, 60°C por 2 minutos para la hibridación y 72°C durante 4 minutos para la polimerización; la polimerización final fue a 72°C por 10 minutos; y su conservación a 4°C por 30 minutos. 5 µL del producto de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5%, para la visualización de los amplicones.

Para la purificación del ADN, 25 µL restantes del producto de PCR amplificado se le adicionaron 2.5 µL de NH₄AC a 5M y 50 µL de etanol frío al 100%. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 150 µL de etanol al 70%, centrifugando a 13 000 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar el etanol y se re suspendió el pellet en 35 µL de agua ultra pura.

Secuenciación y análisis filogenético

Se seleccionaron 18 cepas de las previamente aisladas, estas se enviaron para la secuenciación para la confirmar la presencia de *Pseudovibrios* e identificar a nivel molecular las especies, además de 3 cepas para corroborar la presencia de NRPS y ser empleados como controles positivos para las demás cepas. Los productos de PCR se enviaron para la secuenciación a la empresa Macrogen (Seul, Korea).

Para el análisis filogenético, la selección de genes se realizó teniendo en cuenta a los evolutivamente conservados, reportados en el Genbank como los genes *ADNr* 16, los cuales se caracterizan por presentar una tasa de evolución constante y baja durante largos periodos, se realizó una búsqueda de secuencias de los genes previamente mencionados, con una identidad superior al 95%, a través de la herramienta BLASTn del NCBI. Las secuencias obtenidas en formato FASTA se alinearon en el programa ClustalW. Los

alineamientos fueron exportados al programa MEGA (Versión 7.0) para la construcción de la filogenia molecular (16), utilizando el test Neighbor- Joining (NJ) con el método *p-distance* con 1.000 repeticiones *bootstrap*, teniendo en cuenta transiciones y transversiones.

3. RESULTADOS

En el presente estudio, un total de 88 bacterias fueron aisladas de los géneros *Aplysina* y *Aplidium*, de las cuales se obtuvieron 41 Pseudovibrios de acuerdo a características morfológicas. Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Tabla 2, Anexos) de los aislados de *Pseudovibrio denitrificans* Ab134, *P. denitrificans* A-272 y *P. denitrificans* NBRC 100825 muestra que estos microorganismos son similares, difiriendo en la capacidad de degradar el aminoácido de la arginina. Todas las cepas fueron positivas para las pruebas de catalasa, oxidasa, indol, Voges-Proskauer, Galactosa y negativas para glucosa. Las diferencias radicaron en el uso del citrato como fuente de carbono, uso de aminoácidos y carbohidratos entre las cepas analizadas.

De 41 pseudovibrios, 11 bacterias (27%) expresaron buenos niveles de bioactividad (zona de exclusión ≥ 10 mm) contra todos los patógenos, 22 (55%) bacterias mostraron tener bioactividad frente a uno a cuatro de los patógenos analizados y 8 (18%) bacterias no mostraron bioactividad considerable (Ver Tabla1, Anexos).

De las 41 cepas de Pseudovibrios, 26 (65%) bacterias mostraron actividad antimicrobiana frente a *V. parahaemoliticus* cepa 1, 18 (45%) contra *V. parahaemoliticus* cepa 2, 24 (60%) hacia *V. vulnificus*, 27 (67,5%) contra *V. campbelli* y 28 (70%) contra *V. harveyi*.

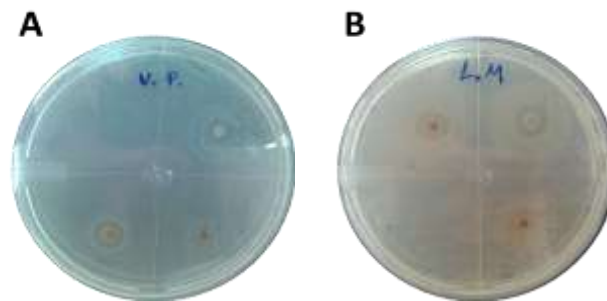


Figura 1. Actividad antimicrobiana de cepas aisladas frente a *V. parahaemoliticus* cepa 1 (A) y *V. campbelli* (B).

El análisis molecular presentó a las especies *Microbulbifer* sp. DN217_4H2, *Psychrobacter submarinus* PAMC 27139, *Alpha proteobacterium* F26, *Ruegeria* sp. ECSMC27, además confirmó que la mayoría de las cepas evaluadas en su mayor parte fueron *Pseudovibrios denitrificans* (Figura 2), donde se generaron tres códigos de accesos para esta cepa en el gen bank del NCBI: *P. denitrificans* Ab 134 (KX990273), *P. denitrificans* A-272 (KC751084) y *P. denitrificans* NBRC 100825 (NR_113946).

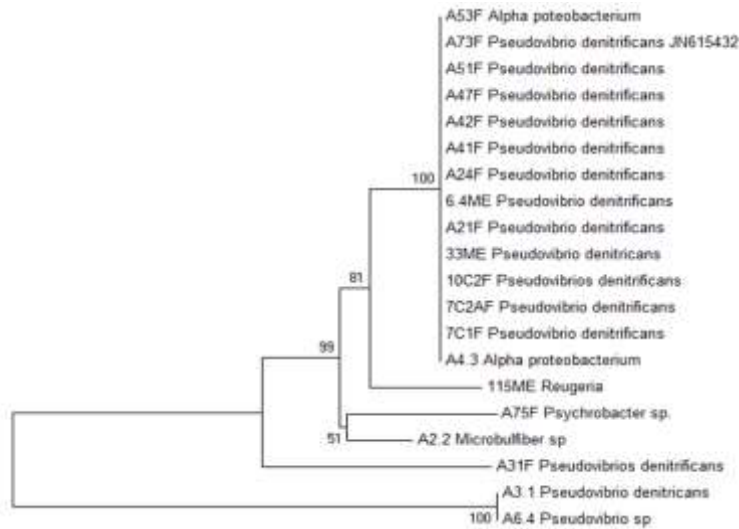


Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen *ADNr* 16S taxones de los géneros *Pseudovibrio denitrificans*, *Reuseria*, *Microbulbifer*. La construcción del árbol se empleó el método NJ con 1.000 réplicas. Los valores *Bootstrap* son mostrados entre las ramas respectivamente. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0

La presencia de la sintetasa de péptidos no ribosomales se confirmó mediante la secuenciación, estas muestras fueron empleadas como controles, para el análisis de las demás cepas. De 27 cepas analizadas, 13 fueron positivas para NRPS.

4. CONCLUSIONES

Las esponjas y tunicados representan una fuente potencial de metabolitos bioactivos de origen microbiano. El presente estudio se realizó para evaluar el potencial antimicrobiano de las bacterias simbióticas asociadas a los géneros *Aplysina* y *Aplidium* dentro de la Reserva Marina El Pelado. Los resultados de las cepas como candidatas a probióticos son prometedores, ya que se identificaron bacterias bioactivas frente a todos los patógenos estudiados, que podrían ser empleadas en la industria acuícola para el control de vibrios patógenos. Se mostró la presencia de péptidos no ribosomales que posiblemente podrían otorgar la presencia de la actividad antimicrobiana de ciertas cepas, sin embargo no solo estas cepas poseían bioactividad por lo cual, es necesario mayores estudios para determinar definitivamente cuál es el mecanismo que otorga las propiedades bioactivas a las cepas.

5. AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) en el marco del proyecto Proyecto PIC-14-CENAIM-001 “Caracterización de la biodiversidad de invertebrados de la Reserva Marina El Pelado a escalas taxonómica, metabolómica y metagenómica para uso en salud humana

y animal”. Agradecemos al Ing. Guillermo Reyes y al Blgo. Leandro Bajaña por su ayuda técnica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Anad T, Bhat A, Schouche Y, Roy U, Siddharth J & Sarma S. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161: 252-262.
2. Ayuso-Sacido A & Genilloud O. 2004. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microbial Ecology*, 49(1): 10-24.
3. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.
4. Crawford D, Lynch J, Whipps J & Ousley M. 1993. Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3899-3905.
5. Crowley S, O’Gara F, O’Sullivan O, Cotter P & Dobson A. 2014. Marine *Pseudovibrio* sp. as a Novel Source of Antimicrobials. *Mar. Drugs*, 12: 5916-5929.
6. Flemer B, Kennedy J, Margassery L, Morrissey, Gara F & Dobson A. 2011. Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. *Journal of Applied Microbiology* 112: 289-301.
7. Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., & Harayama, S. (2006). *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 343-347.
8. Harder T, Lau S, Dobretsov S, Fang T & Quian F. 2003. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism against bacterial epibiosis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 337-347.
9. Haroim C, Costa R, Araújo F, Hadju E, Peixoto R, Lins U, Rosado A & Van Elsas J. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10): 3331-3343.
10. Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C & Hacker J. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 305-312.
11. Hentschel U, Usher K & Taylor M. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* 55:167-177.

12. Jelita C, Bachtiar E & Liviawaty E. 2014. The Effectiveness of Ascidian *Didemnum molle* Extracts as Antibacterium *Vibrio harveyi* On Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Proceeding of International Conference of Aquaculture Indonesia (ICAI).
13. Karunasagar I, Pai R, Malathi G & Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
14. Khan S, Musarrat J, Alkhedhairi A and Kazuo S. 2014. Diversity of bacteria and polyketide synthase associated with marine sponge *Haliclona* sp. *Ann. Microbiol.*, 64: 199-207.
15. Kumar M & Jogani S. 2014. Primary characterization of sponge associated bacteria of marine sponges-*Halichondria glabrata*, *Cliona lobata*, *Spirastrella pachyspira* and their antimicrobial properties. *J Microbiol Biotech Food Sci.* 4(2): 117-121.
16. Leyton Y, & Riquelme C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(3):441-456.
17. Li J, Yies J, Foo R, Ling J, Xus H & Woo N. 1999. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus sarba*. *Marine Pollution Bulletin.* 39(1-12): 245-249.
18. Sertan-de Guzmán A, Predicala R, Bernardo E, Neilan B, Prado S, Mangalindan G,... Concepción G. 2007. Pseudovibrio denitrificans strain Z143-1, a heptylprodigiosin producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiol Letters*, 277(2): 188-196.
19. Smith P, 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 27 (1): 243-264.
20. Sperling L, Alter T & Huehn S. 2015. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* spp. in Retail and Farm Shrimps in Ecuador. *Journal of Food Protection*, 78(11): 2089-2092.
21. Taylor M, Radax R, Steger D & Wagner M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(2):95-347
22. Thomas T, Kavlekar D & LokaBharathi P. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association. *Mar. Drugs.* 8: 1417-1468.

7. Anexos

Tabla 1. Actividad antibacteriana Pseudovibrios asociados a esponjas marinas frente a varios patógenos.

Organismo de colecta	Código	Zona de exclusión (mm) frente a varios patógenos				
		<i>V. parahemoliticus cepa 2</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. parahemoliticus cepa 1</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Aplysina revillagigedi</i>	A21	15	23	11	15	20
	A22	15	24	7	16	21
	A24	17	-	12	17	15
	A31	11	12	10	20	10
	A33	10	18	16	19	18
	A34	9	30	-	7	17
	A41	8	26	13	15	26
	A42	11	25	11	25	19
	A43	8	18	11	15	18
	A44	-	-	-	-	-
	A47	7	21	10	13	18
	A51	10	28	13	10	25
	A53	11	15	12	10	15
	A54	-	3	11	9	18
	A55	-	-	5	-	-
	A61	7	21	13	11	20
	A63	-	-	6	-	8
	A64	11	1	8	21	21
	A69	8	11	14	8	25
	A71	-	-	-	-	-
A72	9	21	9	21	11	
A73	6	35	10	22	29	
A74	-	-	-	-	-	
A75	18	16	17	-	17	
<i>Aplysina gerardogreeni</i>	1 ME	-	-	-	27	-
<i>Aplysina clathrata</i>	2.1 ME	8	10	15	8	7
<i>Aplysina clathrata</i>	3.2 ME	10	7	10	8	7
	3.3 ME	10	10	10	16	12
<i>Aplysina revillagigedi</i>	5.1 ME	-	-	-	5	-
	5.3 ME	15	14	14	15	9
<i>Aplysina sp.</i>	6 ME	18	18	16	12	18
	6.4 ME	15	15	7	8	1
<i>Aplidium sp.</i>	10.1 ME	9	19	-	6	10

	10.2 ME	4	4	-	4	-
	10.3 ME	15	19	19	13	16
<i>Mycalle</i>	11.3 ME	22	24	23	22	25
<i>Aplysina clathrata</i>	7C1	6	7	10	10	12
	7C2A	10	12	15	11	18
<i>Aplidium sp.</i>	10C1v	-	5	7	6	5
	10C1	-	-	10	4	4
	10C2	7	9	20	15	17

- no actividad

