



Producción de (+)-discodermólido por la esponja *Discodermia dissoluta* bajo sistemas de cultivo fijo y suspendido

Production of (+)-discodermolide by the sponge *Discodermia dissoluta* under fixed and suspended culture systems

Javier Gomez-León¹, Johann Lopez-Navarro¹, Alicia Millanguir², Jesus David Castaño¹ y Sven Zea³

0000-0001-5015-7071

¹ Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – Invemar [Institute of Marine and Coastal Research]. Calle 25 # 2-55 El Rodadero, Santa Marta, Colombia. javier.gomez@invemar.org.co; johann.lopez@invemar.org.co; jesus.castano@invemar.org.co

² Universidad Católica de Temuco, Campus Temuco, Chile. amilla2007@alu.uct.cl

³ Universidad Nacional de Colombia – Sede Caribe – Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – Cecimar, Atte. Invemar, Calle 25 # 2-55, El Rodadero, Santa Marta, Colombia. sezeas@unal.edu.co

RESUMEN

El macrólido antitumoral (+)-discodermólido, producido por la esponja marina *Discodermia dissoluta*, tiene promisorios resultados como antitumoral, antimetabólico e inmunosupresor. Sin embargo, el suministro sostenible de cualquier molécula necesita mucha investigación de trabajo in situ e in vitro para lograr la optimización y posterior obtención de la molécula de interés. En este estudio se evaluaron dos sistemas de cultivo fijo y suspendido a 15 m de profundidad, en las localidades de Punta de Betún y Nenguange en Santa Marta (Caribe colombiano). En cada caso se registró la supervivencia, el crecimiento y la producción de (+)-discodermólido, encontrando mejores resultados para el crecimiento en el sistema suspendido y una dependencia de la supervivencia según la localidad del cultivo. También se estudió la influencia de diferentes factores ambientales sobre la supervivencia, observando una correlación negativa con la temperatura. La salinidad, radiación solar, materia orgánica y flujo del agua no presentaron variaciones importantes, impidiendo establecer una correlación. En cuanto a la producción de (+)-discodermólido, no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas y localidades, registrando una producción entre 20-270 μg por gramo de esponja seca.

PALABRAS CLAVE: *Discodermia dissoluta*, (+)-discodermólido, Fragmentos de esponja, Cultivo de esponjas, Acuicultura.

ABSTRACT

The macrolide (+)-discodermolide produced by the marine sponge *Discodermia dissoluta* shows promising antitumor, antimetabolic, and immunosuppressive activity. However, the sustainable supply of any molecule requires much in situ and in vitro research to optimize and later obtain the molecule of interest. In this study, two culture systems—fixed and suspended—were evaluated at 15-m depth in two sites, Punta de Betún and Nenguange, in Santa Marta (Colombian Caribbean). Survival, growth, and production of (+)-discodermolide were recorded, with the suspended system resulting in better growth and survival, depending on the culture site. The influence of the different environmental factors on survival was also studied, and a negative correlation with temperature was observed. Salinity, solar radiation, organic matter, and water flow were not correlated. Finally, no significant differences in the production of (+)-discodermolide existed between the culture systems and study sites. Production ranged from 20 to 270 μg per gram of dry sponge.

KEYWORDS: *Discodermia dissoluta*, (+)-discodermolide, Sponge fragments, Sponge culture, Aquaculture.

DOI: 10.25268/bimc.invemar.2017.46.2.730

Publicado por INVEMAR

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by INVEMAR

This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

INTRODUCCIÓN

El medio marino representa más de la mitad de la diversidad global y se estima que contiene hasta 500 millones de especies distintas, ofreciendo una inmensa fuente de diversos compuestos con actividad biológica potencialmente útiles (Tziveleka *et al.*, 2003; Blunt *et al.*, 2013). Las esponjas son una excepcional fuente productora de compuestos con características estructurales, de los cuales la mayoría han demostrado una amplia variedad de actividades farmacológicas (Faulkner, 2002), que han alcanzado fase de evaluación preclínica e incluso clínica en algunos casos. Sin embargo, este potencial se ve afectado por la limitada disponibilidad del compuesto en los organismos, así como lo poco abundante y dispersos que se encuentran estos en el medio natural (Page *et al.*, 2005; Carballo *et al.*, 2009; Duckworth, 2009). Por lo tanto, en la búsqueda de alternativas para solucionar la dificultad de obtener compuestos (productos naturales marinos), y llevarlos a un nivel sostenible, se han planteado estrategias como síntesis química del metabolito, el cultivo del organismo bajo diferentes condiciones artificiales: cultivo de líneas celulares en laboratorio (células disociadas o disgregadas “primorfos”) y el cultivo de organismos en el mar (Sipkema *et al.*, 2006).

De estas estrategias, la acuicultura en el mar es considerada el método más efectivo por su bajo costo y eficiencia, donde se aprovecha las condiciones naturales del hábitat del organismo (Ruiz *et al.*, 2013). Así, se recolectan fragmentos de poblaciones naturales, a los cuales se les permite recuperarse en campo para posteriormente fijarlos a un sustrato para su desarrollo. Con esta alternativa, se ha demostrado que se pueden tener tasas de crecimiento importantes, garantizando un constante suministro de biomasa y por ende de los compuestos de interés (Muller *et al.*, 1999; Duckworth y Battershill, 2003a, 2003b; Treeck *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2005).

Se han realizado estudios pilotos de maricultura con esponjas, donde han establecido al menos tres criterios para la evaluación de la eficiencia de los cultivos: la supervivencia, el crecimiento, y la concentración del metabolito; sin embargo, los resultados hasta el momento indican que el éxito depende de factores como la especie, la localidad, el tamaño del fragmento, la estación, la profundidad, la epibiosis, entre otros. Se han obtenido porcentajes de supervivencia desde 23 % (Duckworth y Battershill, 2003a) hasta 100 % (Voogd, 2007), y porcentajes de crecimiento que indican desde pérdidas de peso (Duckworth *et al.*, 1997) hasta

INTRODUCTION

The marine environment accounts for more than half of the global diversity and is estimated to contain up to 500 million different species, offering an immense source of different compounds with potentially useful biological activity (Tziveleka *et al.*, 2003, Blunt *et al.*, 2013). Sponges are an exceptional source of compounds, whose structural characteristics have demonstrated a wide variety of pharmacological activities (Faulkner, 2002), and in some cases, these compounds have reached preclinical and even clinical evaluation. However, this potential is affected by the limited availability of the compounds in organisms as well as being scarce and scattered in the natural environment (Page *et al.*, 2005; Carballo *et al.*, 2009; Duckworth, 2009). Therefore, in the search for an alternative solution for obtaining compounds (natural marine products) with less difficulty, and to bring production of the compounds to a sustainable level, strategies have been proposed such as the chemical synthesis of the metabolite and the culture of the organism under different artificial conditions: growing cell lines in the laboratory (primordial dissociated or disintegrated cells) and the culture of organisms in the sea (Sipkema *et al.*, 2006).

From these strategies, aquaculture at sea, where the natural conditions of the organism's habitat are used, is considered the most effective method because of its low cost and efficiency (Ruiz *et al.*, 2013). Thus, fragments of natural populations are collected, allowed to recover in the field, and then fixed to a substrate for their development. With this alternative, significant growth rates can be obtained, guaranteeing a constant supply of biomass and therefore of the compounds of interest (Muller *et al.*, 1999; Duckworth and Battershill, 2003a, 2003b; Van Treeck *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2005).

Pilot studies of mariculture with sponges have been conducted where at least three criteria for the evaluation of cultivation efficiency have been established: survival, growth, and metabolite concentration; however, results so far indicate that success depends on factors such as species, location, fragment size, season, depth, and epibiosis, among others. Survival rates from 23% (Duckworth and Battershill, 2003a) to 100% (Voogd, 2007) have been obtained, and growth rates have been obtained ranging from weight loss (Duckworth *et al.*, 1997) to an increase of 960% (Duckworth and Battershill, 2003a). In

crecimientos de 960 % (Duckworth y Battershill, 2003a). En algunos trabajos la manipulación de la esponja aumenta la concentración del metabolito de interés (Hadas *et al.*, 2005), y estudios donde la concentración del metabolito no cambia significativamente con respecto a la concentración de la esponja en ambientes naturales e incluso algunos donde el metabolito o no se produjo o la concentración disminuyó significativamente (Voogd, 2007). Así, algunos cultivos de esponjas han mostrado ser promisorios para la obtención de biomasa y producción de metabolitos; sin embargo, a la fecha no han sido escalados para su producción industrial.

La esponja *Discodermia dissoluta* se destaca por la producción del compuesto (+)-discodermólido, una lactona de la familia de los policétidos con fuerte actividad antitumoral, antimetabólica, antifúngica e inmunosupresora (Gunasekera *et al.*, 1990). Este compuesto fue patentado por el Harbor Branch Oceanographic Institution –HBOI (Longley *et al.*, 1998, Patente US 5840.750) y licenciado por éste, a la empresa farmacéutica Novartis Pharma para su desarrollo como medicamento comercial. Durante la Fase I de investigación clínica desarrollada con pacientes humanos que sufrían de tumores sólidos, éste mostró ser eficiente, pero también presentó cierta toxicidad pulmonar secundaria en 3 de 32 pacientes (Mita *et al.*, 2004). Sin embargo, se han continuado investigaciones de tipo preclínico con animales, tendientes a determinar el farmacóforo de la molécula y la viabilidad de algunos de sus análogos sintéticos o derivados semisintéticos. No obstante, el problema de suministro sigue siendo una limitante en estos estudios (Ruiz *et al.*, 2013), debido a la baja concentración del compuesto (0.002 % en peso), así como la baja densidad de la esponja y la gran profundidad de su hábitat (> 30 m). Por lo anterior, este tipo de investigaciones se han llevado a cabo con material obtenido por síntesis total, siendo esta estrategia costosa y poco práctica (Smith *et al.*, 2003; Florence *et al.*, 2008).

A diferencia del resto del Caribe, en el área de Santa Marta la esponja *D. dissoluta* se encuentra en aguas someras entre 12 a 25 m de profundidad, con una densidad poblacional moderada de dos a cinco individuos en 50 m² (Zea, 1987; Ruiz, 2009), la cual no puede sostener una explotación directa, pero sí permitir experimentos de cultivo, con miras a mediano o largo plazo a la obtención y producción de (+)-discodermólido con fines de pruebas clínicas (Ruiz, 2009). Por esta razón, el presente trabajo es el primer avance estudiando dos diferentes estrategias de sistemas de cultivo, evaluando la supervivencia, crecimiento y producción del (+)-discodermólido con variables ambientales.

some studies, the manipulation of the sponge increases the concentration of the metabolite of interest (Hadas *et al.*, 2005); in some, the concentration of the metabolite does not change significantly with respect to the concentration of the sponge in natural environments; and in others, the metabolite was either not produced or the concentration decreased significantly (Voogd, 2007). Thus, some sponge cultures have shown to be promising for obtaining biomass and producing metabolites; however, to date, they have not been scaled for industrial production.

The sponge *Discodermia dissoluta* is known for the production of the compound (+)-discodermolide, a lactone of the polyketide family with strong antitumor, antimetabolic, antifungal, and immunosuppressive activity (Gunasekera *et al.*, 1990). This compound was patented by the Harbor Branch Oceanographic Institution –HBOI (Longley *et al.*, 1998, US Patent 5840.750) and licensed by the latter to the pharmaceutical company Novartis Pharma for its development as a commercial drug. During phase I clinical research with human patients suffering from solid tumors, this compound was shown to be efficient, but it also showed some secondary pulmonary toxicity in 3 of 32 patients (Mita *et al.*, 2004). However, preclinical animal research has continued to determine the pharmacophore of the molecule and the viability of some of its synthetic analogs or semi-synthetic derivatives. Nevertheless, the supply continues to be a limiting factor in these studies (Ruiz *et al.*, 2013), due to the low concentration of the compound (0.002% by weight), as well as the low density of the sponge and the great depth of its habitat (> 30 m). In addition, this type of research has used completely synthesized material, making it a very costly and impractical strategy (Smith *et al.*, 2003; Florence *et al.*, 2008).

Unlike the rest of the Caribbean, in the Santa Marta area *D. dissoluta* is found in shallow waters between 12- and 25-m depth, with a moderate population density of two to five individuals per 50 m² (Zea, 1987; Ruiz, 2009), which cannot sustain direct exploitation but allows cultivation experiments aimed at obtaining and producing (+)-discodermolide in the medium or long term for use in clinical trials (Ruiz, 2009). For this reason, the present work is the first attempt to study two different strategies of culture systems to evaluate the survival, growth, and production of (+)-discodermolide with environmental variables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de fragmentos

Los fragmentos fueron recolectados mediante buceo autónomo (SCUBA) a una profundidad entre 18-25 m, en las localidades del Morro de Santa Marta ($11^{\circ}15'01.1''$ N y $74^{\circ}13'47.8''$ O) y Ensenada de Granate ($11^{\circ}17'43.3''$ N y $74^{\circ}11'47.9''$ O), en las inmediaciones de la costa de la ciudad de Santa Marta, Magdalena, Colombia (Figura 1). Una vez identificados los fragmentos, se tomaron los de mayor tamaño, cortando con un cuchillo metálico por encima de la zona basal, para permitir su regeneración. Posteriormente, los fragmentos fueron introducidos en bolsas selladas, y en la superficie en neveras plásticas de 40 L, para transportarlos hasta los viveros submarinos instalados a 10 m de profundidad en Punta de Betín (PB) y Nenguange (NG) para su recuperación y adaptación durante 16 días (Figura 2).

MATERIALS AND METHODS

Fragment collection

The fragments were collected by SCUBVA at a depth of 18-25 m at Morro de Santa Marta ($11^{\circ}15'01.1''$ N and $74^{\circ}13'47.8''$ W) and the Ensenada de Granate ($11^{\circ}17'43.3''$ N and $74^{\circ}11'47.9''$ W) near the coast of the city of Santa Marta, Magdalena, Colombia (Figure 1). Once the fragments were identified, the larger ones were cut with a metal knife above the basal zone to allow their regeneration. Subsequently, the fragments were placed in sealed bags and transported in 40-L plastic coolers to the underwater nurseries located 10 m deep at Punta de Betín (PB) and Nenguange (NG) for recovery and adaptation for 16 days (Figure 2).

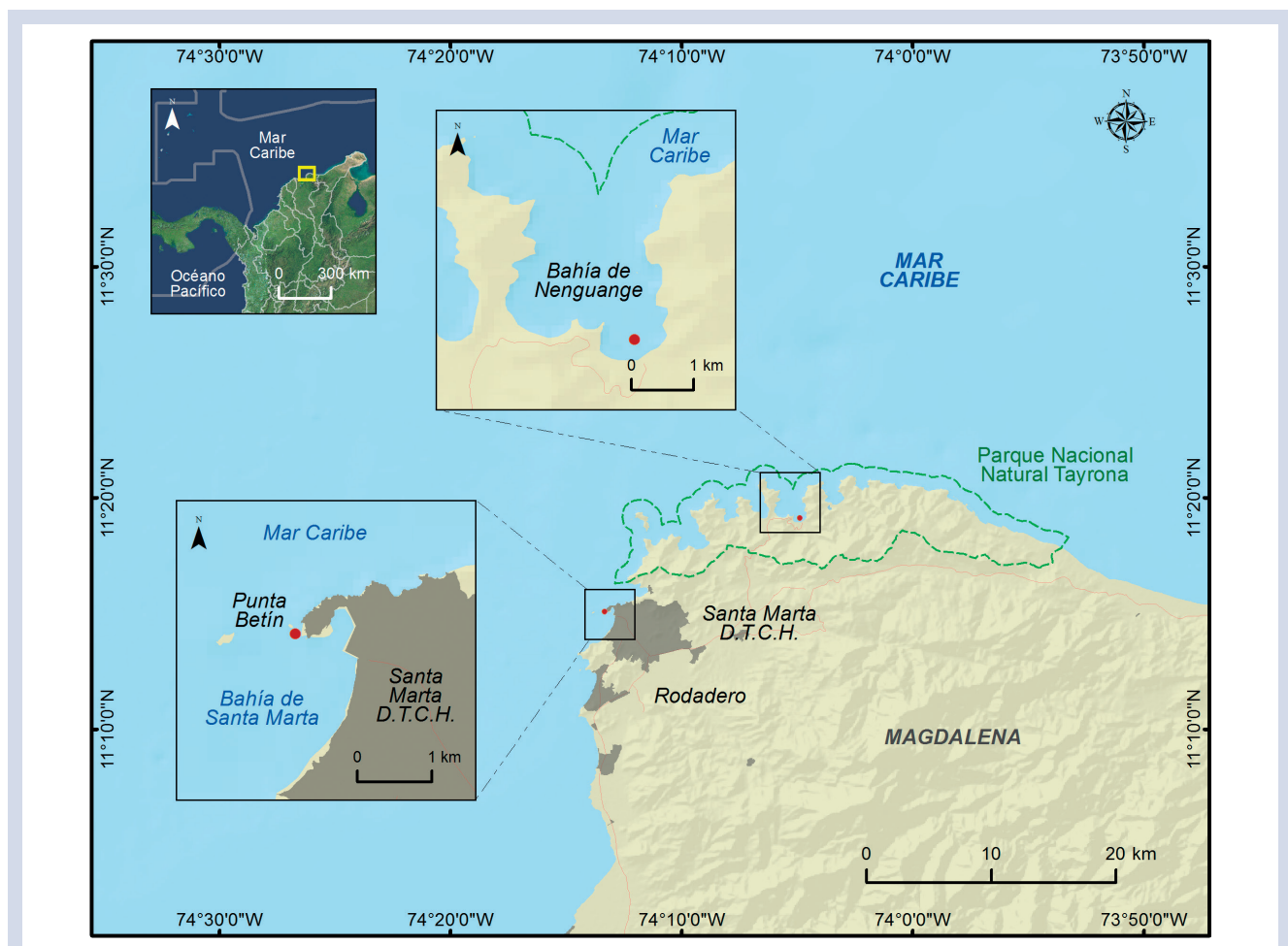


Figura 1. Ubicación de las localidades (Punta de Betín y Nenguange, Santa Marta Caribe colombiano) donde se realizaron los experimentos de cultivo de fragmentos de *D. dissoluta*.

Figure 1. Location of the sites (Punta de Betín and Nenguange, Santa Marta, Colombian Caribbean), where the experimental culture of *D. dissoluta* fragments was conducted.

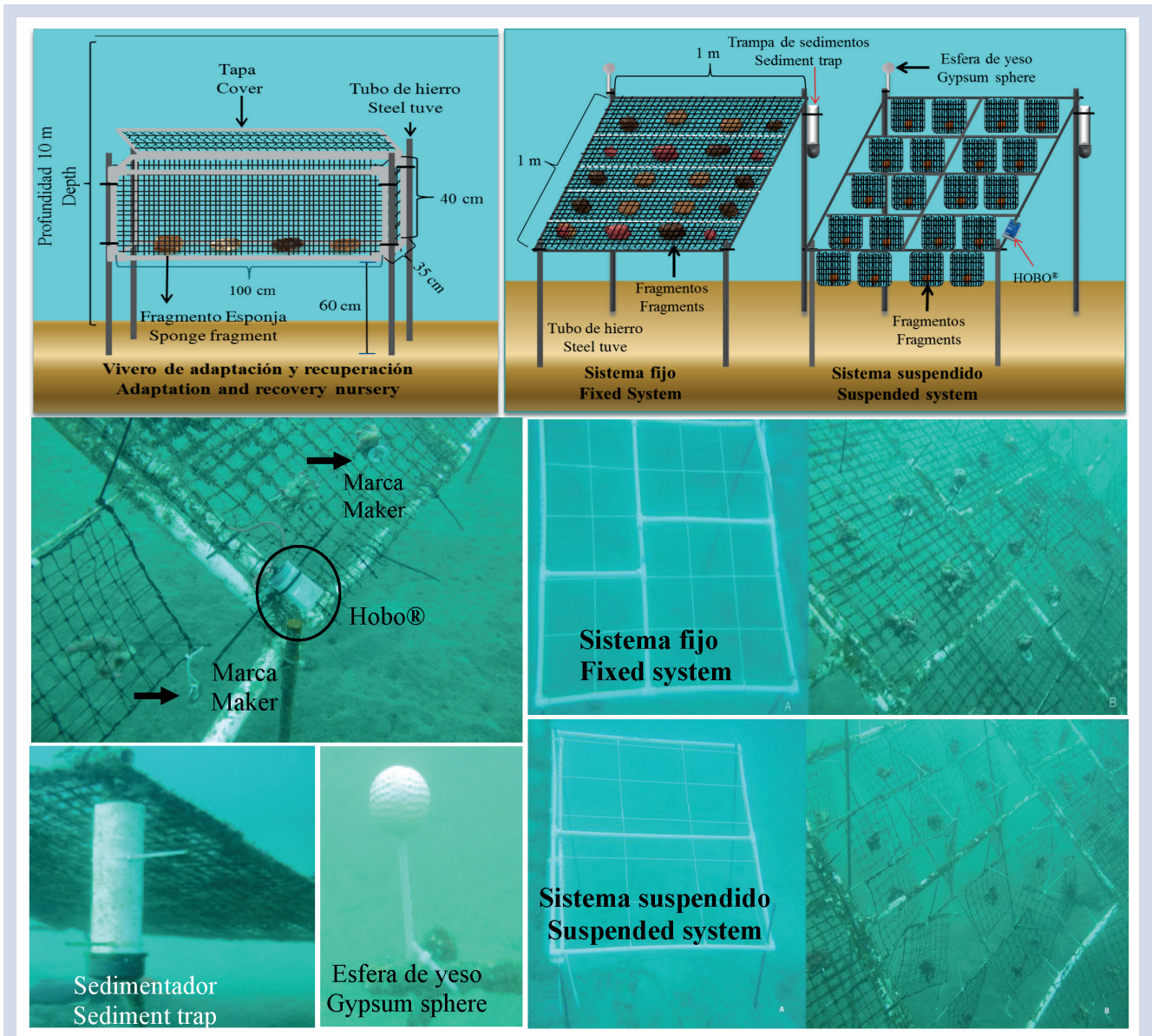


Figura 2. Vivero para la adaptación y recuperación de los fragmentos recolectados (profundidad 10 m); sistemas de cultivo suspendido y fijo instalados a 15 m de profundidad para evaluar crecimiento y supervivencia de fragmentos de la esponja *D. dissoluta*. Obsérvese la marca (arandela de acero) para diferenciar cada fragmento, el “HOBO” (termómetros electrónicos de precisión para registrar la temperatura y radiación solar), el sedimentador para la tasa de sedimentación y esferas de yeso para el flujo del agua.

Figure 2. Nursery for the adaptation and recovery of the fragments collected (depth 10 m); suspended and fixed culture systems installed at 15-m depth to evaluate the growth and survival of fragments of the sponge *D. dissoluta*. Note the marker (steel washer) used to differentiate each fragment, the “HOBO” (precision electronic thermometers to record temperature and solar radiation), sediment trap for measuring sedimentation rate, and gypsum spheres for water flow.

Sistemas de cultivo

El cultivo se evaluó de dos maneras: sistema fijo, compuesto de un cuadrante o panel de 1 m², construido en tubería y accesorios de PVC de media pulgada, cubierto de malla plástica de 3 cm² de abertura (reforzada internamente con tubería de PVC), que sirvió de sustrato para mantener los fragmentos fijos a la malla, en un área específica

Cultivation systems

The culture was evaluated in two ways: a fixed system, composed of a 1-m² quadrant or panel, built in half-inch PVC pipe and fittings, covered with plastic net with 3 cm² mesh (internally reinforced with PVC pipe), which served as a substrate to keep the fragments fixed to the mesh in a specific area constructed with 3-mm polyethylene rope

construida con cuerda de polietileno de 3 mm (Figura 2), y sistema suspendido, basado en el mismo cuadrante o panel de 1 m², compuesto con un refuerzo horizontal con cinco líneas de cuerdas de polietileno de 3 mm (Figura 2), las cuales sirvieron para colgar las bolsas con medidas de 18 x 18 cm² de alto y ancho elaboradas con malla plástica de 3 cm² de abertura. Se construyeron 4 cuadrantes por sistema (8 en total), instalando dos para fijo y dos para suspendido a una profundidad de 15 m en las dos localidades de Punta de Betín (PB) y Nenguange (NG).

Medición de la talla (en volumen)

Finalizado el periodo de recuperación y adaptación (16 días), los fragmentos fueron recolectados e introducidos en bolsas selladas y en neveras plásticas de 40 L (que contenían agua de mar) y trasladados hasta el laboratorio de bioprospección marina del Invemar (LabBIM). A cada fragmento se le midió la talla (volumen) inicial y final mediante el desplazamiento del agua de mar, utilizando un dispositivo volumétrico fabricado por Ruiz y Zea (2013), que consiste en un cilindro graduado de 250 mL adherido a un recipiente de 860 mL con cierre hermético, con un error de ± 2 mL. Adicionalmente, se tuvo en cuenta el origen de los fragmentos sembrados, considerando fragmentos directamente del medio natural (F0) y fragmentos provenientes de experimentos realizados 1.5 meses con anterioridad para estandarizar los experimentos en este trabajo (F2). Posteriormente se continuó con el marcaje, que consistió en una arandela de acero inoxidable con un código establecido, amarrada con cable de teléfono a cada fragmento para el sistema fijo y en las bolsas de malla para el suspendido (Figura 2).

Para determinar la biomasa inicial de cultivo, fue aplicada la siguiente ecuación:

$$B_i = (E_i)(W_i)$$

Donde:

B_i : Biomasa inicial

E_i : Numero de fragmentos iniciales

W_i : Peso promedio en volumen

Siembra y cosecha de los fragmentos

Una vez medidos y marcados, los fragmentos se introdujeron en bolsas selladas y colocados en neveras plásticas de 40 L, y mediante buceo SCUBA se trasladaron y ubicaron en cada sistema de cultivo, sembrando un total de 160 fragmentos: 80 en cada estación y 20 por sistema de

(Figura 2), and a suspended system, based on the same 1-m² quadrant or panel, composed of a horizontal reinforcement with five lines of 3-mm polyethylene ropes (Figure 2), which served to hang the 18 x 18-cm² bags made with plastic net with 3-cm² mesh. Four quadrants were built per system (eight in total), installing two fixed and two suspended at a depth of 15 m in the two sites of Punta de Betín (PB) and Nenguange (NG).

Measurement of size (by volume)

After the recovery and adaptation period (16 days), the fragments were collected and placed in sealed bags, which were placed in 40-L plastic coolers (containing sea water), and transferred to the Invemar Marine Bioprospecting Laboratory (LabBIM). For each fragment, the initial and final size (volume) was measured by the displacement of the sea water, with an error of ± 2 mL, using a volumetric device manufactured by Ruiz and Zea (2013), consisting of a 250-mL graduated cylinder adhered to a hermetically sealed 860-mL vessel. In addition, the origin of the explant fragments were classified into fragments coming directly from the natural environment (F0) and fragments from experiments carried out 1.5 months prior, to standardize the experiments in this work (F2). Later, the marking was continued, which consisted of a coded stainless-steel washer, tied with telephone cable to each fragment for the fixed system and in the mesh bags for the suspended one (Figure 2).

To determine the initial biomass of the culture, the following equation was applied:

$$B_i = (E_i)(W_i)$$

where:

B_i = Initial biomass

E_i = Number of initial fragments

W_i = Average weight in volume

Explanting and harvesting the fragments

Once measured and marked, the fragments were placed in sealed bags, collected in 40-L plastic coolers, and transferred by SCUBA and placed in each culture system, with a total of 160 fragments—80 in each station and 20 per cultivation system, with two replicates per system—being explanted.

At the time of explant, the fragments to be cultured in the fixed system were placed in the panel

cultivo, manejando dos réplicas por sistema.

Al momento de la siembra, los fragmentos a cultivar en el sistema fijo se colocaron en el panel sobre la malla y encima se puso otra malla plástica de ojo de 2 cm, mientras que los fragmentos del sistema suspendido fueron introducidos dentro de las bolsas de malla y se colgaron con ayuda de sunchos plásticos a las cuerdas de polietileno instaladas en el panel (Figura 2).

Los fragmentos se cultivaron durante nueve meses (marzo a noviembre de 2013), realizando una limpieza cada quince días, que consistió en generar corrientes fuertes de agua con el movimiento de la mano, con el propósito de remover la sedimentación y fouling adherido a las mallas y fragmentos. Finalizado el tiempo de cultivo, mediante buceo autónomo (SCUBA) se recolectaron los fragmentos, los cuales una vez en la superficie fueron introducidos en neveras plásticas de 40 L y transportados desde el sitio de recolección hasta el LabBIM, para determinar su talla (volumen desplazado). Paralelamente, se recolectaron 12 fragmentos del total cosechado o recuperado al final del cultivo (tres por cada sistema y localidad de cultivo) para llevar a cabo la extracción del (+)-discodermólido, preservando las muestras a -15 °C hasta el momento de la extracción y cuantificación.

En cuanto al porcentaje de crecimiento de los fragmentos expresado en volumen, se tuvo en cuenta el volumen ganado o perdido de la esponja durante el tiempo de cultivo. Este porcentaje fue calculado como:

$$(\%C) = \left(\frac{V_f - V_i}{V_i} \right) \times 100$$

Dónde:

%C= Porcentaje de crecimiento

V_i = Volumen inicial

V_f = Volumen final

Adicionalmente, se calculó el crecimiento mensual a través de la fórmula:

$$\%Cm = \left(\frac{V_f - V_i}{V_i \times \Delta t} \right) \times 100$$

Dónde,

%Cm= Porcentaje de crecimiento mensual

V_i = Volumen inicial

V_f = Volumen final

Δt = Tiempo de cultivo en meses

La supervivencia se evaluó visualmente teniendo en cuenta el color de los fragmentos, debido

on the mesh, and another plastic mesh (2 cm mesh size) was placed on top, while the fragments of the suspended system were introduced into the mesh bags and hung with plastic cable ties to the polyethylene ropes installed in the panel (Figure 2).

The fragments were cultivated for 9 months (March to November 2013) and cleaned every 15 days by generating strong currents of water with the hand, to remove the sedimentation and fouling adhered to the mesh and fragments. At the end of the culture period, fragments were collected by SCUBA, brought to the surface and placed into 40-L plastic coolers and transported from the collection site to the LabBIM to determine their size (displaced volume). At the same time, 12 fragments of the total number harvested or recovered at the end of the culture (three for each system and culture site) were harvested to carry out the (+)-discodermólido extraction, with the samples being preserved at -15 °C until the time of extraction and quantification.

Regarding the percentage of growth of the fragments expressed in volume, the volume gained or lost by the sponge during the culture period was considered. This percentage was calculated as follows:

$$(\%C) = \left(\frac{V_f - V_i}{V_i} \right) \times 100$$

where:

% C = Percentage growth

V_i = Initial volume

V_f = Final volume

Additionally, the monthly growth was calculated using the following formula:

$$\%Cm = \left(\frac{V_f - V_i}{V_i \times \Delta t} \right) \times 100$$

where,

% Cm = Monthly growth rate

V_i = Initial volume

V_f = Final volume

Δt = Cultivation time in months

Survival was evaluated visually by the color of the fragments, as living sponges have an intense color (red-brown), whereas dead sponges are white, and their skeletons are covered with algae, sponges, and other invertebrates and sediment.

a que las esponjas vivas presentan un color intenso (rojo-marrón) mientras que las muertas su color es blanco y el esqueleto recubierto de algas, esponjas y otros invertebrados y sedimento.

El porcentaje de supervivencia se calculó a partir del número total de fragmentos sembrados en relación con el número de fragmentos muertos presentes en el cultivo después de los ocho meses, expresándose como:

$$\% \text{ Supervivencia} = 100 \times \frac{\text{No. explantes sembrados} - \text{No. explantes muertos}}{\text{No. explantes sembrados}}$$

Variables ambientales

Con el propósito de conocer la influencia de las variables ambientales sobre el crecimiento (Biomasa) y supervivencia de los fragmentos cultivados, se evaluó la temperatura y radiación solar con termómetros electrónicos de precisión conocidos como “HOBOS” de la marca Onset (Figura 2), los cuales fueron programados para registrar la información cada hora, y se remplazaron mensualmente por nuevos dispositivos. La salinidad se registró cada 15 días por triplicado utilizando una sonda multiparámetro marca YSI. El análisis de materia orgánica particulada se llevó a cabo mediante la técnica de sólidos totales de acuerdo con Garay *et al.* (2003). La sedimentación fue evaluada utilizando trampas de sedimento de acuerdo con Huang *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Brevemente, se usaron tubos de PVC de 3.8 cm de diámetro y 30 cm de longitud, y se dejaron las trampas por un periodo de dos meses (Figura 2). Finalmente, el flujo del agua se estimó indirectamente a través de la pérdida de masa de esferas de yeso (Figura 2) (Nishizaki y Ackerman, 2007). El yeso utilizado fue tipo IV comercial para odontología, y se obtuvieron esferas de 4.5 cm de diámetro mediante el empleo de moldes apropiados. Las esferas, una vez compactas, se secaron a 38°C por tres horas y luego se registró su masa inicial antes de instalarlas en las localidades de cultivo. Luego de 48 h de inmersión, las esferas fueron recolectadas y secadas en estufa para determinar la pérdida de peso.

Cuantificación de (+)-discodermólido

Para la extracción y cuantificación se siguió la metodología de acuerdo con Valderrama *et al.* (2010), utilizando HPLC LC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies) y un detector DAD Agilent 1260 Infinity G1315C. Para este análisis, en primer lugar, se aisló el metabolito de individuos silvestres y a partir de este se construyó una curva de calibración con soluciones en

The survival rate was calculated from the total number of fragments seeded relative to the number of dead fragments present in the culture after 8 months, expressed as follows:

$$\% \text{ Survival} = 100 \times \frac{\text{No. explants planted} - \text{No. explants dead}}{\text{No. explants planted}}$$

Environmental variables

For determination of the influence of the environmental variables on the growth (biomass) and survival of the cultured fragments, the temperature and solar radiation were evaluated with precision electronic thermometers known as “HOBOS” (Onset) (Figure 2), which were programmed to record the information every hour and were replaced monthly by new devices. Salinity was recorded every 15 days in triplicate using a YSI multiparameter probe. The analysis of particulate organic matter was performed out using a modified total solids technique according to Garay *et al.* (2003). Sedimentation was evaluated using sediment traps according to Huang *et al.* (2011) with some modifications. Briefly, PVC tubes 3.8 cm in diameter and 30 cm in length were used, and the traps were left for a period of 2 months (Figure 2). Finally, water flow was estimated indirectly through the loss of the gypsum sphere mass (Figure 2) (Nishizaki and Ackerman, 2007). The gypsum used was commercial type IV for dentistry, and 4.5-cm-diameter spheres were obtained by using appropriate molds. The spheres, once compact, were dried at 38 °C for 3 hours, and then, their initial mass was recorded before they were installed at the growing sites. After 48 hours of immersion, the spheres were collected and oven dried to determine weight loss.

Quantification of (+)-discodermolide

For the extraction and quantification, the methodology according to Valderrama *et al.* (2010) was followed using Agilent 1260 Infinity LC HPLC (Agilent Technologies) and an Agilent 1260 Infinity G1315C DAD detector. For this analysis, the metabolite of wild individuals was first isolated, and a calibration curve for the wild metabolite was constructed using methanol solutions ranging from 1.4 to 118 µg/mL. From this calibration curve, the quantification of the metabolite was performed in the 12 selected fragments.

For the entire process of analyzing the (+) - discodermolide content in the tissues of *D. dissoluta*, for both

metanol, comprendidas entre 1.4 y 118 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de esta curva de calibración, se realizó la cuantificación del metabolito en los 12 fragmentos seleccionados.

En todo el proceso de análisis del contenido de (+)-discodermólido en los tejidos de *D. dissoluta* estudiados, tanto del medio natural como de los sistemas de cultivo, se empleó un patrón de la sustancia pura, para verificar la presencia del metabolito en las muestras procesadas, este patrón fue suministrado por el HBOI.

Análisis estadístico

Para determinar el desempeño del cultivo, se utilizó un modelo lineal generalizado (MLG), teniendo como variable dependiente el crecimiento mensual y como factores predictivos las localidades (Nenguange y Punta de Betín), sistemas de cultivo (fijo y suspendido), el origen (F0 y F2) y considerando las variaciones de tamaño de los fragmentos mediante las clases de talla (pequeña ≤ 20 mL; mediana: 21-39 mL y grande: ≥ 40 mL), tomando como factor cuantitativo la talla inicial de los fragmentos cultivados. Por último, se realizó una regresión lineal simple entre la talla inicial y el crecimiento, para determinar si el crecimiento dependió de la talla inicial del fragmento.

Así mismo, para evaluar la mortalidad, se cuantificó su número total, y se determinó el porcentaje que correspondía a los cuatro factores (sitios, sistemas de cultivo, clases de talla y origen), posteriormente se realizó una prueba de independencia de la frecuencia de fragmentos vivos v/s muertos, en relación a los factores mencionados, mediante el software estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

También fueron aplicados ANOVAS a dos y tres vías, utilizando como factor los sistemas de cultivo, las dos localidades y el origen del fragmento (F0 y F2), tomando como covariable la talla inicial de siembra, una vez comprobado los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Así mismo, se realizó una regresión lineal simple entre la talla inicial y el crecimiento, para determinar si el crecimiento en volumen dependió del volumen inicial de los fragmentos.

Finalmente, para evaluar la posible relación entre la mortalidad presentada en los diferentes sistemas de cultivo con la variación de las variables ambientales, se procedió a realizar un análisis de correlación utilizando como predictor estadístico la prueba de Pearson (valor de significancia de $p > 0.05$) mediante el software SPSS 20.

the natural environment and culture systems, a pattern of the pure substance supplied by the HBOI was used to verify the presence of the metabolite in the samples processed.

Statistical analysis

A generalized linear model (GLM) was used to determine the performance of the culture, with monthly growth being used as the dependent variable; the site (Nenguange and Punta de Betín), cultivation systems (fixed and suspended), and origin (F0 and F2) as the predictive factors; and the initial size of the cultured fragments, based on the size classes (small: ≤ 20 mL; medium: 21-39 mL; and large: ≥ 40 mL), as covariate. Finally, a simple linear regression was performed between the initial size and growth to determine if the growth depended on the initial size of the fragment.

Likewise, to evaluate mortality, the total number was quantified, and the percentage that corresponded to the four factors (sites, cultivation systems, size classes, and origin) was determined, after which a test of independence of the frequency of live fragments versus dead, determined according to the mentioned factors, was performed using statistical software Statgraphics Plus version 5.1.

Two-way and three-way ANOVAs were also used, taking the cultivation systems, the two sites, and the origin of the fragment (F0 and F2) as the factors and taking the initial explant size as covariate after assumptions of normality and homogeneity of the variances had been tested. Likewise, a simple linear regression was performed between the initial size and growth to determine if the increase in volume depended on the initial volume of the fragments.

Finally, to evaluate the possible relation between mortality in the different culture systems with the environmental variables, a correlation analysis was performed using the Pearson correlation coefficient as a statistical predictor (significance value of $p > 0.05$) using SPSS software 20.

RESULTADOS

Supervivencia y crecimiento de fragmentos

En los primeros meses se presentó alta mortalidad en ambos sistemas de cultivo (fijos y suspendidos) (Figura 3). A partir de abril la supervivencia de los fragmentos en la localidad de Punta de Betín fue relativamente estable, disminuyendo ligeramente al final del cultivo. Sin embargo en Nenguange este comportamiento se presentó en el sistema suspendido, ya que en el fijo hubo un descenso continuo de la supervivencia, alcanzando 55 % al final del experimento (Figura 3). En cuanto al sistema de cultivo, los fragmentos que se mantuvieron suspendidos presentaron un crecimiento ligeramente superior (Figura 3).

RESULTS

Survival and growth of fragments

In the first months, high mortality occurred in both cultivation systems (fixed and suspended) (Figure 3). As of April, the fragment survival at Punta de Betín was relatively stable, decreasing slightly at the end of the culture period. However, in Nenguange, this behavior occurred in the suspended system because, in the fixed system, a continuous decrease was observed in the survival, which reached 55% by the end of the experiment (Figure 3). As for the culture system, the fragments that remained suspended showed a slightly higher growth (Figure 3).

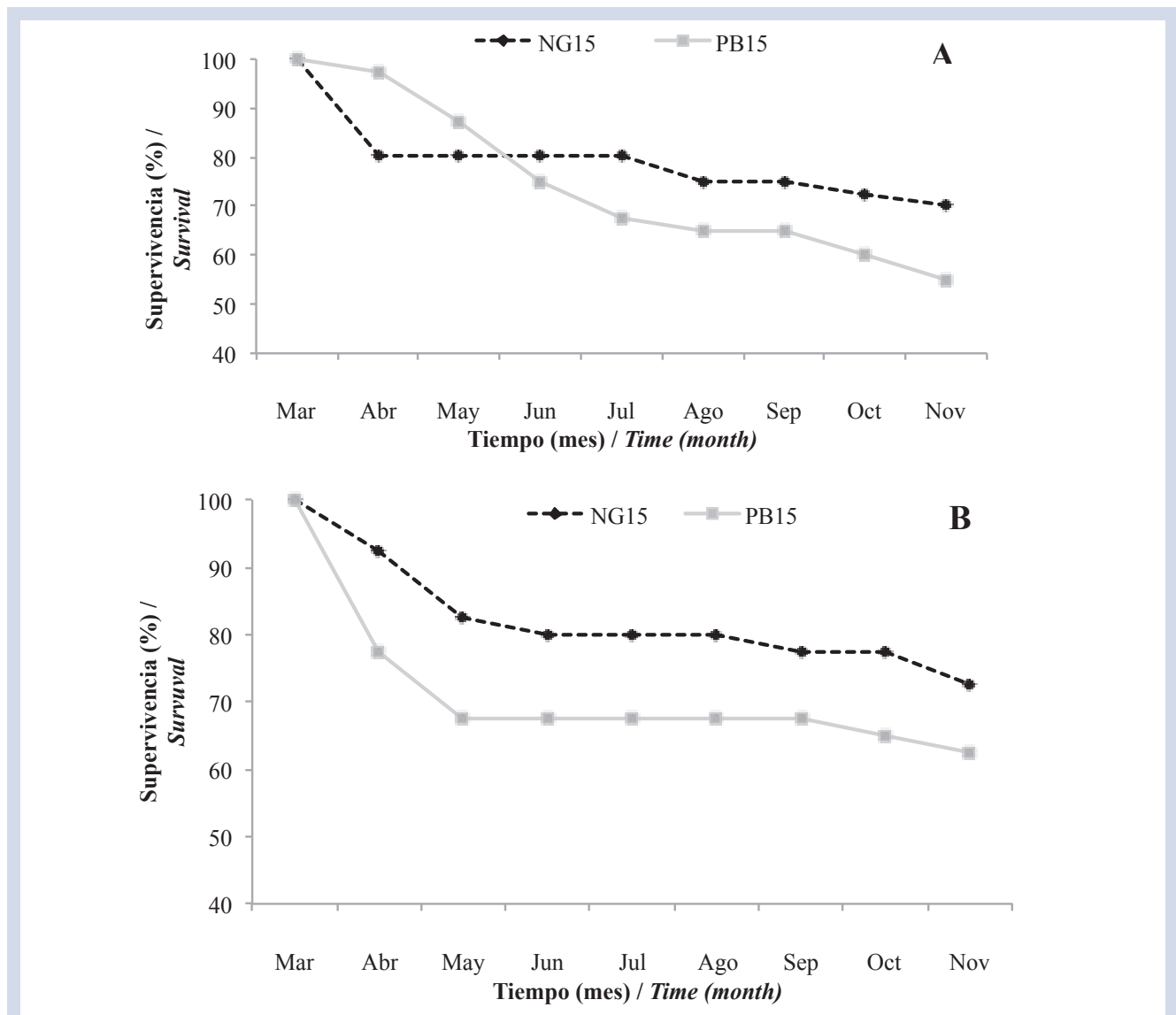


Figura 3. Supervivencia acumulada de fragmentos de *D. dissoluta* cultivados en dos sistemas fijo (A) y suspendido (B) (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín).

Figure 3. Cumulative survival of *D. dissoluta* fragments grown in two systems: fixed (A) and suspended (B) (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín).

Teniendo en cuenta el efecto del origen del fragmento, independiente de la localidad del cultivo, las mayores mortalidades se presentaron en F0 (extraída directamente del medio natural) con relación aquellas que venían de experimentos previos (F2) (Figura 4).

The highest mortalities, which consider the effect of the origin of the fragment, independent of the culture site, occurred in F0 (extracted directly from the natural environment) relative to those derived from previous experiments (F2) (Figure 4).

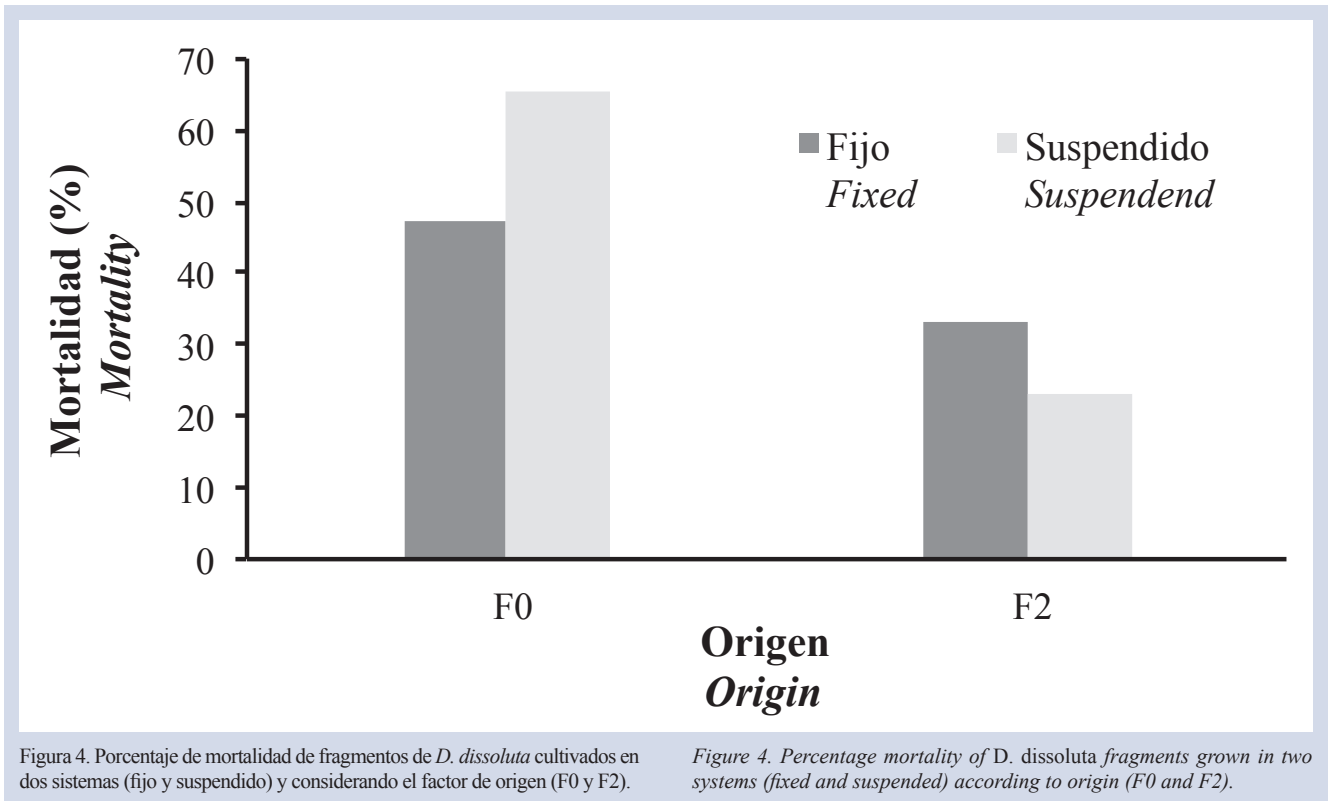


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de fragmentos de *D. dissoluta* cultivados en dos sistemas (fijo y suspendido) y considerando el factor de origen (F0 y F2).

Figure 4. Percentage mortality of *D. dissoluta* fragments grown in two systems (fixed and suspended) according to origin (F0 and F2).

Para las pruebas de independencia, solo las clases de talla combinadas para los sistemas de cultivo, mostraron variación en la frecuencia de mortalidad (chi-cuadrado =11.6; grados de libertad =2; $p < 0.05$), siendo el valor para las pequeñas de 63.26 %, seguida de las medianas con 55.25 % y las grandes con 33.36 %.

El crecimiento de los fragmentos sobrevivientes al final del cultivo fue variable, encontrando valores desde -10.9 a 109.4 % de la talla inicial, con un promedio de 2.1 ± 1.0 % de incremento mensual (± 1 error estándar); 58.94 % de los casos resultó negativo, y solo 21.85 % superó 5 % mensual. Es importante mencionar, que para el sistema fijo instalado en Punta de Betín, el crecimiento mensual fue negativo (-0.968 %) (Figura 5).

For the independence tests, only the combined size classes for the cultivation systems showed a variation in mortality frequency (chi-square = 11.6; degrees of freedom = 2; $p < 0.05$); the value for small size class was 63.26%, followed by the medium with 55.25% and the large ones with 33.36%.

The growth of the surviving fragments at the end of the culture period was variable, with values ranging from -10.9 to 109.4% of the initial size, with an average of $2.1 \pm 1.0\%$ of monthly increase (± 1 standard error); 58.94% of the cases showed negative growth, and only 21.85% exceeded 5% monthly growth. Importantly, for the fixed system installed at Punta de Betín, the monthly growth was negative (-0.968%) (Figure 5).

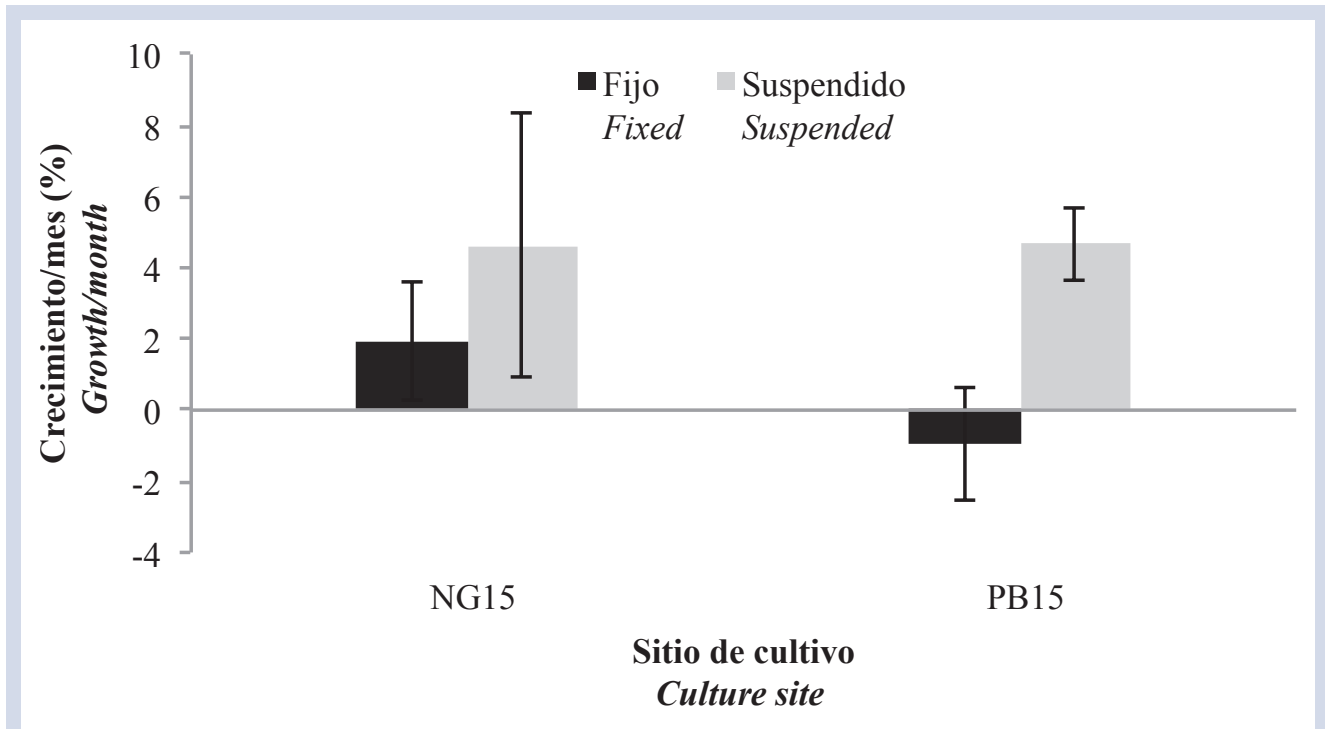


Figura 5. Porcentaje promedio de crecimiento mensual de fragmentos de *D. dissoluta*, cultivados en dos sistemas (fijo y suspendido) y localidades (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín) a 15 m de profundidad. La barra indica el error estándar.

Figure 5. Mean percentage of monthly growth of *D. dissoluta* fragments grown in two systems (fixed and suspended) and sites (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín) at 15 m depth. Bars indicate the standard error.

En cuanto a las clases de talla (pequeña: ≤ 20 mL; mediana: 21-39 mL; grande: ≥ 40 mL) según el sistema de cultivo, se observó que los fragmentos en el suspendido evidenciaron mejores resultados en las tres tallas que en el fijo, estableciendo mediante la ANOVA a dos vías, una diferencia significativa ($F = 3.44$, $p = 0.03$; pequeña: 7.5 ± 5.0 %, $n = 23$; mediana: -0.0 ± 0.6 %, $n = 60$, y grande: 2.1 ± 1.3 %, $n = 68$) (Tabla 2), siendo los mayores crecimientos en los fragmentos de talla pequeña, con un promedio de 13.9 ± 13.8 % ($n=8$); tendencia que fue evidente a través de los resultados de la regresión lineal ($p = 0.04$), pero con una muy pequeña variabilidad explicada por la talla inicial ($R^2 = 2.9$ %).

Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) a tres vías, comparando los sistemas de cultivo (fijo y suspendido), sitios (NG 15 y PB 15 m), y origen (F0 y F2), donde se incluyó como covariable la talla inicial, indicó que los factores no fueron significativos ($p > 0.05$) sobre el crecimiento, como tampoco sus interacciones (Tabla 2), probablemente debido a que al evaluar un mayor número de variables la distribución de los fragmentos pequeños fue de carácter homogénea, generando al final un resultado similar entre los tratamientos evaluados.

For the size classes (small: ≤ 20 mL; medium: 21-39 mL; and large: ≥ 40 mL), according to the culture system, the fragments in the suspended system showed better results in all three size classes than in the fixed system; two-way ANOVA showed a significant difference ($F = 3.44$, $p = 0.03$; small: 7.5 ± 5.0 %, $n = 23$; medium: -0.0 ± 0.6 %, $n = 60$; and large: 2.1 ± 1.3 %, $n = 68$) (Table 1), with the largest growth in the small fragments, with a mean of 13.9 ± 13.8 % ($n = 8$), which was also seen in the results from the linear regression ($p = 0.04$) but with a very small variability explained by the initial size ($R^2 = 2.9$ %).

However, three-way ANOVA, comparing the culture systems (fixed and suspended), sites (NG 15 and PB 15 m), and origin (F0 and F2), where size was the covariable, indicated that the factors did not affect the growth significantly ($p > 0.05$), nor their interactions (Table 2), probably because when a greater number of variables was evaluated, the distribution of the small fragments was homogeneous, generating a similar result among the evaluated treatments in the end.

Tabla 1. Análisis de Varianza (ANOVA) a dos vías, comprando el porcentaje de crecimiento (mensual) de fragmentos de *D. dissoluta* cultivados en dos sistemas (fijo y suspendido), tres tallas (pequeña: ≤ 20 mL; mediana: 21-39 mL; grande: ≥ 40 mL), utilizando la talla inicial como covariable. G.L.=Grados de libertad; P=Probabilidad.

Fuente/ Source	Suma de Cuadrados / Sum of Squares	G.L. / DF	Cuadrados Medios / Mean Squares	F	P
Tallas / Sizes	1003.9	2	501.9	3.44	0.03
Sistema de cultivo / Cultivation System	856.9	1	856.9	5.87	0.02
Talla inicial / Initial Size	61.6	1	61.6	0.42	0.52
Talla*Sistema de cultivo / Size* Cultivation System	251.6	2	125.8	0.86	0.42
Residuo / Residual	21012.9	144	145.9		
Total (corregido) / Total (corrected)	22945.3	150			

Table 1. Two-way analysis of variance (ANOVA), comparing the (monthly) percentage of growth of *D. dissoluta* fragments cultivated in two systems (fixed and suspended) and for three sizes (small: ≤ 20 mL; medium: 21- 39 mL; and large: ≥ 40 mL), using the initial size as covariate. DF = degrees of freedom; P = probability.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) a tres vías comparando el porcentaje de crecimiento (mensual) de fragmentos de *D. dissoluta* cultivados en dos sistemas (fijo y suspendido), dos sitios (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín) y origen (F0 y F2), utilizando el volumen inicial como covariable. G.L = Grados de libertad; P = Probabilidad.

Fuente / Source	Suma de Cuadrados / Sum of Squares	G.L./ DF	Cuadrados Medios / Mean squares	F	P
A-Sistema cultivo / Cultivation system	337.1	1	337.1	2.14	0.15
B-Localidad / Site	52.1	2	26.0	0.17	0.85
C-Origen / Origin	5.5	1	5.5	0.04	0.85
Talla inicial (covariable) / Initial Size (covariable)	252.6	1	252.6	1.60	0.21
A*B	14.8	2	7.4	0.05	0.95
A*C	2.3	1	2.3	0.01	0.90
B*C	70.0	2	35.0	0.22	0.80
A*B*C	39.4	2	19.7	0.13	0.88
Residuo	21732.8	138	157.5		
Total (corregido) / Total (corrected)	22929.8	150			

Table 2. Three-way analysis of variance (ANOVA) comparing the (monthly) percentage of growth of *D. dissoluta* fragments cultivated in two systems (fixed and suspended) and at two sites (NG = Nenguange, PB = Punta de Betín) and origins (F0 and F2), using the initial volume as a covariate. DF = degrees of freedom; P = probability.

Variables ambientales

La temperatura durante el cultivo fue similar en ambas localidades, con un promedio de 27 °C, iniciando con una temperatura de 24 °C en marzo, aumentando paulatinamente hasta noviembre, alcanzando su valor más alto en octubre con 29 °C. Con relación a la radiación solar, se observó un comportamiento variable, con los mayores registros en junio en Nenguange con 2.36 watt/m² y septiembre en Punta de Betín con 0.48 watt/m² (Figura 6). La salinidad disminuyó de 37 a 35 en Punta de Betín y de 37 a 36 en Nenguange. La materia orgánica en las dos estaciones fue muy variable entre 11.1 a 5.1 mg/L, resaltando Punta de Betín con los mayores valores de materia orgánica durante gran parte del estudio (Figura 6). En cuanto a la tasa de sedimentación, se encontraron tendencias opuestas entre las dos estaciones; en Punta de Betín el valor mas alto fue en mayo con 421.8 mg/m²/dia; sin embargo, a apartir de ese mes la tasa de sedimentación

Environmental variables

The temperature during the cultivation was similar at both sites, with an average of 27 °C, starting with a temperature of 24 °C in March, with the temperature increasing gradually until November, reaching its highest value in October with 29 °C. For the solar radiation, the behavior was variable, with the highest records in June in Nenguange, with 2.36 watt/m², and September in Punta de Betín, with 0.48 watt/m² (Figure 6). Salinity decreased from 37 to 35 at Punta de Betín and from 37 to 36 at Nenguange. The organic matter at the two sites was highly variable, ranging between 11.1 to 5.1 mg/L, with Punta de Betín having the highest values of organic matter during much of the study (Figure 6). As for the sedimentation rate, Punta de Betín had the highest value in May, with 421.8 mg/m²/day; however, subsequently, the sedimentation rate decreased, unlike Nenguange, whose sedimentation

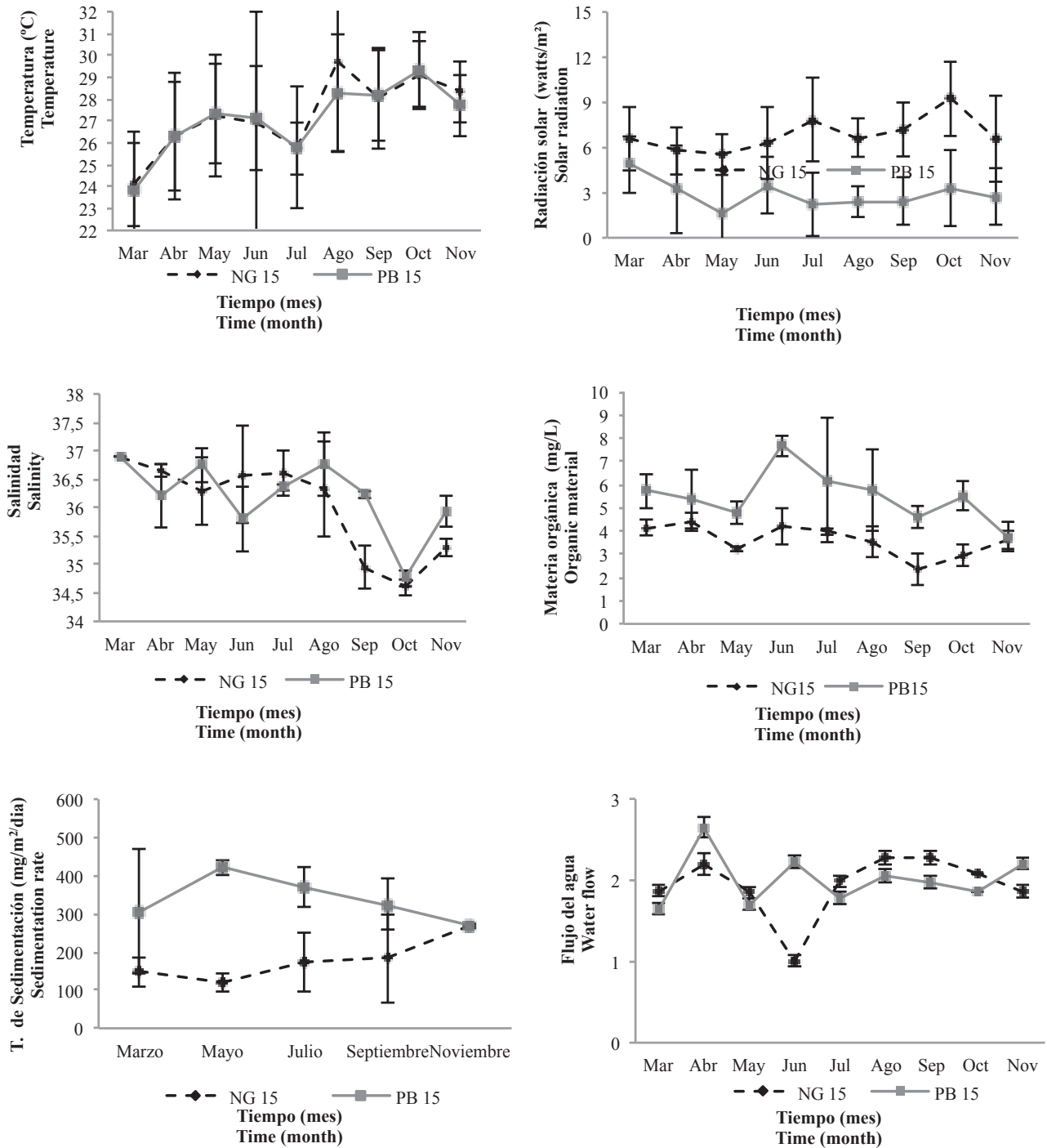


Figura 6. Variables ambientales evaluadas durante el cultivo de los fragmentos de *D. dissoluta* (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín). la barra indica la desviación estándar.

Figure 6. Environmental variables evaluated during the culture of *D. dissoluta* fragments (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín). Bars indicate the standard deviation.

disminuyó, al contrario a Nenguange que la tasa aumento paulatinamente con el valor mas alto en noviembre 265.6 mg/m²/día. Finalmente, el flujo de agua no tuvo variaciones importantes, solo se resalta junio en Nenguange como el mas bajo con 1 df y el mas alto para Punta de Betín en abril con 2.7 df (Figura 6).

Los resultados de correlación entre las variables ambientales y la supervivencia de los fragmentos no mostraron significancia ($p > 0.05$). Se resalta la correlación negativa entre la temperatura y la supervivencia observada en Punta de Betín para los dos sistemas de cultivo ($n = 9$; $p < 0.05$; PB15 Suspendido $C = -0.9$ y PB15 Fijo $C = -0.9$) (Tabla3).

rate gradually increased, with the highest value being observed in November of 265.6 mg/m²/day. Finally, the water flow did not show significant variation. The lowest flow was recorded in Nenguange during June with 1 df, and the highest flow was recorded in Punta de Betín during April with 2.7 df (Figure 6).

The correlation results between the environmental variables and the survival of the fragments were not significant ($p > 0.05$). A negative correlation was observed between temperature and survival at Punta de Betín for the two cultivation systems ($n = 9$; $p < 0.05$, PB15 Suspended $C = -0.9$ and PB15 Fixed $C = -0.9$) (Table 3).

Tabla 3. Análisis de correlación de Pearson entre la mortalidad y las variables ambientales evaluadas en el cultivo de los fragmentos de *D. dissoluta* (NG = Nenguange; PB = Punta de Betín; S = Suspendido; F = Fijo). ($p > 0.05$). C = Valor de la correlación; p = Significancia y n = Número de datos.

Table 3. Pearson correlation analysis between mortality and the environmental variables evaluated in the culture of *D. dissoluta* fragments (NG = Nenguange, PB = Punta de Betin, S = Suspended, F = Fixed). ($p > 0.05$). C = correlation value, p = significance, and n = sample size.

Sitio / Site	Correlaciones / Correlations						
	Variables/ Valores - Variables/Values	Temp	Salinidad / Salinity	Materia orgánica / Organic Material	Tasa Sedimentación/ Sedimentation Rate	Flujo de Agua/ Water Flow	Radiación solar / Solar Radiation
PB15F	C	-0.89**	0.55	-0.13	-0.24	-0.48	-0.45
	P	0.00	0.12	0.75	0.70	0.19	0.22
	n	9	9	9	5	9	9
PB15S	C	-0.79*	0.32	0.06	-0.40	-0.35	-0.46
	P	0.01	0.41	0.87	0.51	0.35	0.21
	n	9	9	9	5	9	9
NG15F	C	0.14	0.41	0.43	-0.37	0.48	-0.15
	P	0.73	0.28	0.25	0.54	0.19	0.69
	n	9	9	9	5	9	9
NG15S	C	-0.48	0.37	-0.39	0.08	0.08	-0.55
	P	0.19	0.32	0.30	0.90	0.84	0.13
	n	9	9	9	5	9	9

Obtención de (+)-discodermólido

La determinación del contenido de (+)-discodermólido en las localidades y sistemas, mostraron que en Punta de Betín el sistema fijo presentó la mayor producción promedio del metabolito con 132.9 µg/g de peso seco libre de cenizas; sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la cantidad de metabolito producido por los fragmentos según la localidad, así como tampoco al sistema de cultivo (Figura 7).

Obtaining (+)-discodermolide

The determination of the content of (+)-discodermolide from the sites and systems showed that in Punta de Betín, the fixed system presented the highest average production of the metabolite, with 132.9 µg/g ash free dry weight; however, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the amount of metabolite produced by the fragments according to site, nor by the culture system (Figure 7).

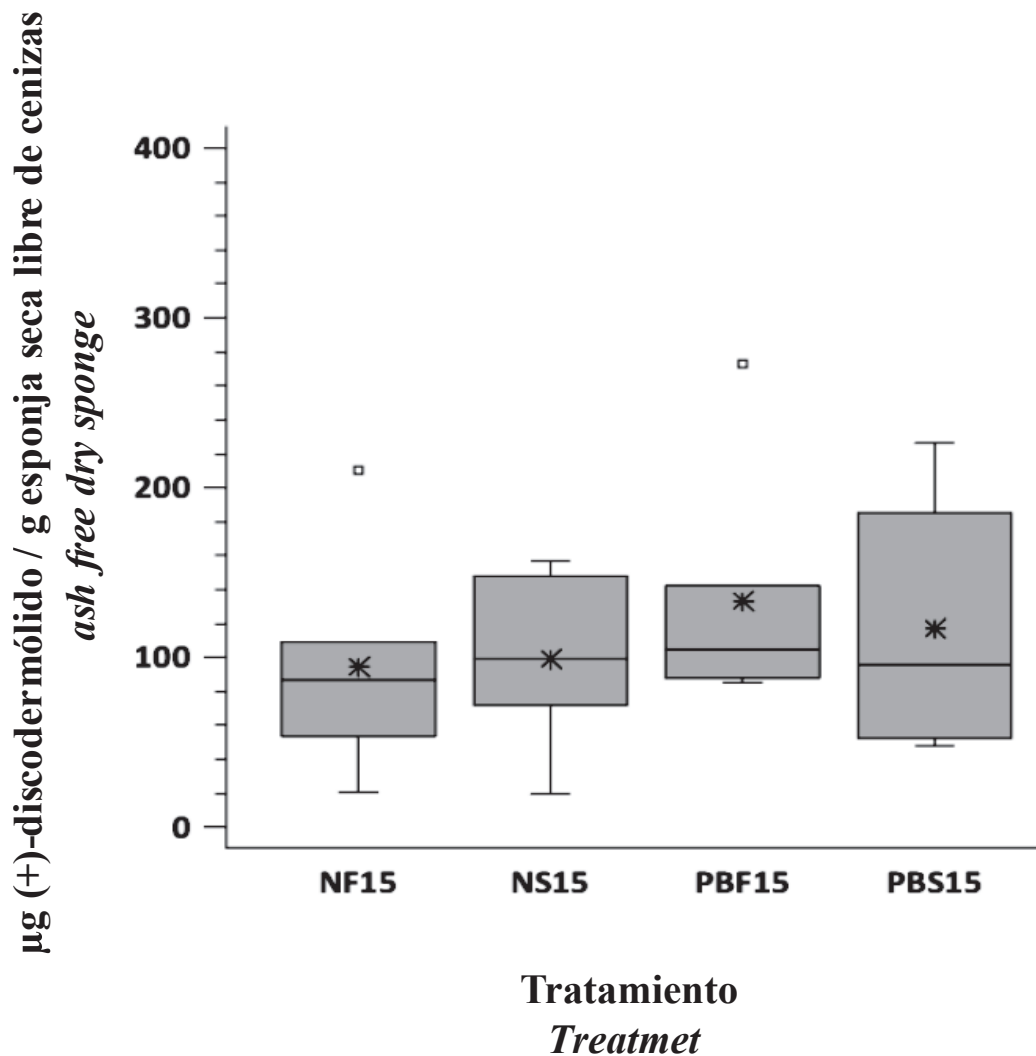


Figura 7. Variación en el contenido de (+)-discodermólido en fragmentos de *D. dissoluta* obtenidos de dos sistemas de cultivo: NF = Nenguange Fijo, NS =Nenguange Suspendido; PBF = Punta de Betin Fijo; PBS = Punta Betin Suspendido.

Figure 7. Variation in the (+)-discodermolide content of *D. dissoluta* fragments obtained from two culture systems: NF = Nenguange Fixed, NS = Nenguange Suspended, PBF =: Punta de Betin Fixed, PBS = Punta de Betin Suspended.

DISCUSIÓN

El trabajo tuvo en cuenta la localidad, tipo de cultivo y variables ambientales, con el propósito de conocer si afectaban el crecimiento y supervivencia de los fragmentos como la concentración de (+)-discodermólido. Las altas mortalidades de los fragmentos al inicio del cultivo se atribuyó al estrés por la manipulación fuera del agua durante el proceso del pesaje, marcaje y siembra, afectando a la esponja y la comunidad de bacterias simbiotas asociadas (Webster *et al.*, 2008), causando un debilitamiento del organismo, necrosis del tejido y muerte del fragmento y los que sobrevivieron un

DISCUSSION

This study considered the site, type of cultivation, and environmental variables to determine if they affected the growth and survival of the fragments as well as the concentration of the (+)-discodermolide. The high mortalities of the fragments at the beginning of the cultivation were attributed to stress from manipulation outside the water during the weighing, marking, and explanting process, which affected the sponge and its community of associated symbiont bacteria (Webster *et al.*, 2008), causing a weakening of the organism, tissue

consumo de energía durante el proceso de cicatrización para recuperarse (Van Treeck *et al.*, 2003). Aunque el porcentaje de supervivencia para los dos sitios y sistemas fue de 55-72 %, no se puede afirmar que sea promisorio, si se compara con el porcentaje (93%) obtenido por el estudio realizado por Ruiz *et al.* (2013) usando cultivo suspendido (bolsillos) a 18 m de profundidad y otros estudios realizado con *Negombata magnifica* que variaron entre 17 y 84 % (Hadas *et al.*, 2005). Sin embargo, si se ajustan aspectos como el tiempo fuera del agua para los procedimientos mencionados, y se usa solo el cultivo suspendido, aumentaría probablemente el porcentaje de supervivencia de los fragmentos.

Duckworth (2009) describe que las bolsas de malla poseen aberturas que maximizan el área superficial para la alimentación y respiración, obteniendo altas tasas de supervivencia en varias especies de esponjas. Los resultados obtenidos concuerdan con los fragmentos cultivados en bolsillos, los cuales presentaron mayor supervivencia y un crecimiento mensual superior para ambas localidades, indicando que este sistema permite mayor flujo de agua y por ende más alimento y menor sedimentación. Adicionalmente los fragmentos cultivados en Punta de Betín usando el sistema fijo corroboran lo observado como la alta sedimentación y por ende alta colonización por otros organismos. Otra consideración es que, al estar Punta de Betín expuesta a descargas residuales provenientes de los ríos Gaira y Manzanares (Parra y Zea, 2003; Roa *et al.*, 2007), es de esperar una mayor sedimentación, y por consiguiente más alimento, lo cual eventualmente pudo resultar negativo para la esponja e impedir su crecimiento y producción del metabolito (+)-discodermólido ya que ambos sistemas de cultivo, principalmente el fijo, aunque se realizaron limpiezas periódicas con el propósito de remover la sedimentación adherida a las mallas y los fragmentos, se colmataron con mucha facilidad cubriendo la malla.

Otras investigaciones de cultivo de esponjas (*Polymastia croceus* y *Latrunculia wellingtonensis*), señalan que las bolsas de malla aumentan las posibilidades de crecimiento, teniendo en cuenta, que el organismo puede tener inicialmente baja competencia interespecífica en relación con el alimento y espacio (Caralt, 2007). Otros autores sugieren las ventajas del crecimiento en sistemas de malla fija, en cuanto a una mayor protección al oleaje (Van Treeck *et al.*, 2003; Duckworth, 2009), así como a una mayor exposición a la luz, que favorecería la translocación de nutrientes provenientes de la fotosíntesis realizada por parte de cianobacterias simbiotas (Schirmer *et al.*, 2005). Sin embargo, este trabajo

necrosis, death of the fragment, and energy consumption by those fragments that survived during the healing process (Van Treeck *et al.*, 2003). Although the survival rate for both sites and systems was 55-72%, this rate is not very promising when compared to the percentage (93%) obtained by Ruiz *et al.* (2013) using suspended culture (pockets) at 18-m depth and other studies performed with *Negombata magnifica*, with survival rates ranging from 17 to 84% (Hadas *et al.*, 2005). However, adjusting some aspects, such as the time out of water for the above procedures and using only suspended culture, would probably increase the survival of the fragments.

Duckworth (2009) reported that mesh bags have openings that maximize the surface area for feeding and breathing, obtaining high survival rates in several species of sponges. The results support this statement for the fragments grown in pockets, which presented greater survival and higher monthly growth for both sites, indicating that this system allows a greater flow of water and therefore more food and less sedimentation. Additionally, the fragments grown at Punta de Betín in the fixed system corroborate that high sedimentation corresponded with high colonization by other organisms. Another consideration is that because Punta de Betín is exposed to residual discharges from the Gaira and Manzanares rivers (Parra and Zea, 2003; Roa *et al.*, 2007), greater sedimentation and, consequently, more food is expected, which could eventually be negative for the sponge and prevent its growth and production of the metabolite (+)-discodermolide. Despite periodic cleanings with the express purpose of removing sedimentation adhered to the mesh and the fragments, both cultivation systems, especially the fixed, were easily filled with sedimentation covering the mesh.

Other research on sponge cultivation (*Polymastia croceus* and *Latrunculia wellingtonensis*), indicate that mesh bags increase the growth potential because the organism may initially have low interspecific competition for food and space (Caralt, 2007). Other authors suggest the advantages of growth in fixed-mesh systems in terms of increased wave protection (Van Treeck *et al.*, 2003; Duckworth, 2009), as well as greater exposure to light, which would favor the translocation of nutrients from photosynthesis performed by symbiotic cyanobacteria (Schirmer *et al.*, 2005). However, this study did not reveal any outstanding behavior of this cultivation system (fixed); in contrast, it favored the growth of fouling

no evidenció un comportamiento destacado de este sistema de cultivo (fijo); ya que por el contrario favoreció el crecimiento de organismos incrustantes, generando el taponamiento de la malla que disminuyó el flujo del agua.

Las variables ambientales evaluadas no mostraron significancia ($p > 0.05$) con el crecimiento, supervivencia y en cuanto al contenido de (+)-discodermólido. Adicionalmente, se encontró que la procedencia de los fragmentos resulta determinante para la supervivencia de la esponja, presentando mejores resultados aquellos provenientes del experimento previo (F2) de cultivo sobre los extraídos directamente del medio natural (F0). Duckworth y Battershill (2003a) y Ferrati *et al.* (2006) observaron que las tasas de crecimiento de *Agelas oroides* y *Petrosia ficiformis* no están relacionadas con la talla inicial de la esponja, mientras que en otras especies el tamaño del explante es determinante (Reiswig, 1973; Leys y Lauzon, 1998). En nuestro caso, los fragmentos pequeños crecieron más, comportamiento que también se presentó en los fragmentos de *D. dissoluta* en el trabajo realizado por Vásquez (2011), los cuales duplicaron y hasta cuadruplicaron su volumen, mencionando que fragmentar esponjas donantes en un mayor número de fragmentos pequeños, es una muy buena estrategia, para obtener mejores y más rápido crecimiento.

El estudio evaluó la mejor condición del cultivo que maximizará el crecimiento de los fragmentos, y por ende mayor concentración del metabolito, teniendo en cuenta que se debían escoger condiciones que se adaptaran a la recolección de los fragmentos, la profundidad, la localidad que garantizaran la viabilidad de la ejecución del trabajo. Los resultados han sido disímiles, con porcentaje de crecimiento mensual positivo y negativo, que dependen de muchas variables en primera instancia de la forma de crecimiento y la capacidad de regeneración, y en segunda de los métodos de amarre, la ubicación de los fragmentos y las condiciones ambientales. Estudios de cultivo realizados con especies como *Geodia cydonium*, *Latrunculia wellingtonensis*, *Polymastia croceus*, *Axinella corrugata*, *Negombata magnifica*, *Callyspongia (Euplacella) biru*, *Mycale hentscheli* (Duckworth *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1999; Duckworth y Battershill, 2003a; Hadas *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005; Voogd, 2007; Duckworth, 2009), mencionan que los mejores resultados se han obtenido al ubicar las estructuras en ambientes con buena circulación de agua, poniendo los fragmentos por encima del sustrato, para maximizar la obtención de alimento y minimizar los efectos del sustrato, y manteniéndolos en bolsas de malla ancha o atravesándolos con nylon.

organisms, which plugged the mesh and diminished the water flow.

The environmental variables evaluated did not have significant effects ($p > 0.05$) on the growth, survival, and content of (+)-discodermolide. Additionally, the origin of the fragment was found to be a determining factor for sponge survival, with sponges from the previous experiment (F2) having higher survival than those extracted directly from their natural environment (F0). Duckworth and Battershill (2003a) and Ferrati *et al.* (2006) observed that the growth rates of *Agelas oroides* and *Petrosia ficiformis* are not related to the initial size of the sponge, whereas in other species, explant size is determinant (Reiswig, 1973; Leys and Lauzon, 1998). In our case, the small fragments grew more, a behavior that was also present in the fragments of *D. dissoluta* in the study by Vásquez (2011), in which the fragments doubled and even quadrupled their volume, suggesting that fragmenting donor sponges into a larger number of small fragments is a very good strategy to achieve better and faster growth.

This study evaluated the best cultivation condition for maximizing the growth of the fragments and, thus, a higher concentration of the metabolite, considering that conditions should be chosen that could be adapted for fragment collection, depth, and site to ensure feasibility of the study. The results are contrasting, with a positive and negative monthly growth rate, which depends first on many variables in terms of growth form and regeneration capacity, and second on attachment methods, the location of the fragments, and the environmental conditions. Culture studies conducted with species such as *Geodia cydonium*, *Latrunculia wellingtonensis*, *Polymastia croceus*, *Axinella corrugata*, *Negombata magnifica*, *Callyspongia (Euplacella) biru*, and *Mycale hentscheli* (Duckworth *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1999; Duckworth and Battershill, 2003a; Hadas *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005; Voogd, 2007; Duckworth 2009) note the best results were obtained by placing structures in areas with good water circulation, placing the fragments above the substrate to maximize food production and minimize the effects of the substrate, and keeping them in wide mesh bags or securing them with nylon.

Duckworth and Battershill (2003a) and Voogd (2007) note that for the cultivation of these organisms to be feasible or sustainable, a good supply of the metabolite is necessary, in addition to adequate biomass

Duckworthe y Battershill (2003a) y Voogd (2007) mencionan que para hacer sustentable o potencial el cultivo de estos organismos, es necesario además de una adecuada producción de biomasa y alta supervivencia, un buen suministro del metabolito. En el caso de *D. dissoluta* el (+)-discodermólido se encuentra en baja concentración, por lo que implementar una estrategia de cultivo sería efectiva para esta especie (Valderrama, 2009). Varios estudios con otras especies de esponjas y mediante diversos métodos de análisis, la concentración de los compuestos han estado por encima o debajo a las encontradas en condiciones naturales, ejemplo: *Callyspongia (Euplacella) biru*, concentraciones de los fragmentos en cultivo (0.03 y 0.17 % en peso) no fueron significativamente menor a las de las poblaciones naturales (0.06 y 0.22 % en peso) (Voogd, 2007); mientras *Latrunculia wellingtonensis* y *Polymastin croceus* (Duckworth y Battershill, 2003a) y *Mycele hentscheli* (Page *et al.*, 2005) las concentraciones de cultivo fueron mayores a la población natural. Esto demuestra la variabilidad de producción de estos compuestos, la cual puede depender de la especie y del tipo de prueba que se esté desarrollando.

CONCLUSIONES

La poca variación de las condiciones ambientales durante el cultivo no fue un factor determinante para el crecimiento y supervivencia de *D. dissoluta*. Las mayores supervivencias se obtuvieron en el sistema suspendido: mayor flujo de agua, disponibilidad de alimento, fácil limpieza (eliminación del sedimento y fouling) y cosecha de los fragmentos. A pesar que los fragmentos de la esponja *D. dissoluta* son capaces de sanar, sobrevivir y crecer, factores como la manipulación excesiva conllevan al estrés del animal, causando debilitamiento, infecciones, muerte del tejido e incluso la muerte del fragmento. Esto a su vez, se ha considerado como la principal causa de variación de crecimiento, que estuvo entre - 10.9 a 109.4 % para los sitios y sistemas de cultivo. Adicionalmente, se encontró que la procedencia de los fragmentos resulta determinante para la supervivencia de la esponja, presentando mejores resultados aquellos provenientes del experimento previo de cultivo, sobre los extraídos directamente del medio natural para el experimento. En cuanto al contenido de (+)-discodermólido, se observó una variación muy alta y no diferencias significativas entre las localidades y sistemas de cultivo, fue difícil establecer que sistema de cultivo fue el más eficiente.

production and high survival. In the case of *D. dissoluta*, the (+)-discodermolide is in low concentration; therefore, implementing a culture strategy would be effective for this species (Valderrama, 2009). Several studies with other species of sponges and using various methods of analysis show the concentration of compounds to be above or below those found in natural conditions; for example, in *Callyspongia (Euplacella) biru*, concentrations of the fragments in culture (0.03 and 0.17% by weight) were not significantly lower than those in natural populations (0.06 and 0.22% by weight) (Voogd, 2007), whereas in *Latrunculia wellingtonensis*, *Polymastia croceus* (Duckworth and Battershill, 2003a), and *Mycale hentscheli* (Page *et al.*, 2005), the culture concentrations were higher than the natural population. These results demonstrate the production variability of these compounds, which may depend on the species and the type of test being developed.

CONCLUSIONS

The low variation in the environmental conditions during the culture was not a determining factor for the growth and survival of *D. dissoluta*. The highest survival rates were obtained in the suspended system, which had increased water flow, food availability, easy cleaning (removal of sediment and fouling), and harvesting of the fragments. Although fragments of the *D. dissoluta* sponge can heal, survive, and grow, factors such as excessive manipulation lead to stress of the animal, causing weakness, infections, tissue death, and even death of the fragment. This, in turn, has been considered the main cause of the variation in growth, which was between -10.9 to 109.4% for the sites and culture systems. In addition, the origin of the fragments is a determining factor for the survival of the sponge, with sponges from the previous experimental culture having better survival than those extracted directly from the natural environment for the experiment. In terms of (+)-discodermolide, this content was highly variable, but because no significant differences existed between the sites and culture systems, establishing which culture system was the most efficient was difficult.

The use of smaller fast-growing fragments is recommended, with suspended pockets, thereby minimizing the time the fragments are exposed to air and handling during the process of cutting, weighing, and marking the fragments.

Se recomienda trabajar con fragmentos pequeños cuyo crecimiento es más rápido, con sistemas de bolsillos suspendidos, minimizando el tiempo de exposición al aire y cuidado en el proceso del corte, pesaje y marcaje de los fragmentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero por parte del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –Colciencias, mediante contrato RC No. 327-2011. Al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andrés” –Invemar (Contribución N° 1164); a la Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe; al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible –MADS a través del Banco de Proyectos de Inversión Nacional –BPIN, por financiar el presente proyecto PRY-VAR-006-011. También a la Línea de Bioprospección Marina del Programa de Valoración y Aprovechamiento de los Recursos Marinos donde se llevó a cabo el proyecto, principalmente a Carlos Puentes en la cuantificación del (+)-discodermólido. El aporte de Sven Zea es contribución 466 del Instituto de Estudios en Ciencias del Mar—CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support from the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias (Administrative Department of Science, Technology and Innovation) under contract RC No. 327-2011. The authors acknowledge the Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Institute of Marine and Coastal Research – Contribution N° 1164) “José Benito Vives De Andrés”-Invemar; the Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe (National University of Colombia, Caribbean); and the Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible -MADS (Ministry of Environment and Sustainable Development), which through the Banco de Proyectos de Inversión Nacional –BPIN (Bank of National Investment Projects) financed the present project PRY-VAR-006-011. Additionally, the authors acknowledge the Línea de Bioprospección Marina del Programa de Valoración y Aprovechamiento de los Recursos Marinos (Marine Bioprospection Division of the Program for the Evaluation and Use of Marine and Coastal Resources), where the project was carried out, and especially thank Carlos Puentes for the quantification of (+)-discodermolide. Sven Zea’s work is contribution 466 of Instituto de Estudios en Ciencias del Mar—CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe.

**BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED**

- Blunt, J.W., B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H. Munro and M.R. Prinsep. 2013. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 30(2): 237-323.
- Caralt, S. 2007. *Sponge Culture: Learning from biology and ecology*. Wageningen University. 187 p.
- Carballo, J.L., B. Yañez, E. Zubia, M.J. Ortega and C. Vega. 2009. Culture of explants from the sponge *Mycale cecilia* to obtain bioactive Mycalalaz-Type metabolites. *Mar. Biotech.*, 12: 516-525.
- Duckworth, A. 2009. Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: A Review *Mar. Biotech.*, 11: 669-679.
- Duckworth, A.R. and C.N. Battershill. 2003a. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, 217: 139-156.
- Duckworth, A.R. and C.N. Battershill. 2003b. Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture*, 221: 311-329.
- Duckworth, A.R., C. Battershill and P.R. Bergquist. 1997. Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture*, 165: 251-267.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 1-48.
- Ferrati, C., S. Vacca, R. Pronzato, R. Manconi and A.R. Duckworth. 2006. Sponge culture in a small harbour: the case study of the demosponges *Agelas oroides* (Agelasida) and *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida) in the W-Mediterranean. Abstracts, 7th Int. Sponge Symp., Rio de Janeiro, 7-13 may.
- Florence, G.J., M.N. Gardner and I. Paterson. 2008. Development of practical syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin. *Nat. Prod. Rep.*, 25: 342-375.
- Garay, J., J. Betancourt, G. Ramírez, B. Marin, B. Cadavid, L. Panizzo, L. Lesmes, J. E. Sanchez, S. L. Lozano y A. Franco. 2003. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros Físicoquímicos y contaminación marina: Agua, sedimento y organismos. Serie Documentos Generales 1, Invemar, Santa Marta. 177 p.
- Gunasekera, S, M. Gunasekera and R. Longley. 1990. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.*, 55: 4912-4915.
- Hadas, E., M. Shpigel and M. Ilan. 2005. Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production. *Aquaculture*, 244: 159 -169.
- Huang, Y.C.A., H.J. Hsieh, S.C. Huang, P.J. Meng, Y.S. Chen, S. Keshavmurthy, Y. Nozawa and C.A. Chen. 2011. Nutrient enrichment caused by marine cage culture and its influence on subtropical coral communities in turbid waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 423: 83-93.
- Leys, S.P. and N.R.J. Lauzon. 1998. Hexactinellid sponge ecology: growth rates and seasonality in deep water sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 230: 111-129.
- Longley, R.E., S.P. Gunasekera and S.A. Pomponi. 1998. Discodermolide compounds. U.S. Patent 5840.750.
- Mita, A., C. Lockhart, T.L. Chen, K. Boshinski, J. Curtright, W. Cooper, L. Hammond, M. Rothenberg, E. Rowinsky and S.A. Sharma. 2004. Phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 22(14): 2025.
- Müller, W., W. Wimmer, W. Schatton, M. Bohm, R. Batel and Z. Filic. 1999. Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: example, *Geodia cydonium*. *Mar. Biotech.*, 1: 569-579.
- Nishizaki, M.T. and J.D. Ackerman. 2007. Juvenile-adult associations in sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. droebachiensis*): protection from predation and hydrodynamics in *S. franciscanus*. *Mar. Biol.*, 151:135-145.
- Page, M., P. Northcote, V. Webb, S. Mackey and S. Handley. 2005. Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Aquaculture*, 250: 256- 269.
- Parra, F.J. y S. Zea. 2003. Comparación de la abundancia, distribución y algunas características de las esponjas del género *Ircinia* (Porifera: Demospongiae) en dos ambientes contrastantes del área de Santa Marta, Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 32: 75-91.
- Reiswig, H.M. 1973. Population dynamics of three Jamaican desmopongiae. *Bull. Mar. Sci.*, 23 (2): 191-226.
- Roa, A., L. Saavedra, A. Acero P. y L. Mejía. 2007. Nuevos registros de peces para el Caribe colombiano de los órdenes Myctophiformes, Polymixiiformes, Gadiformes, Ophidiiformes y Lophiiformes. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 36:181-207.
- Ruiz, C. 2009. Aspectos ecológicos de la población de la esponja *Discodermia dissoluta* (Porifera: Demospongiae: Lithistida) en el Caribe Colombiano. Tesis Biol. Mar., Univ. Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 50 p.
- Ruiz, C., K. Valderrama, L. Castellanos and S. Zea. 2013. Mariculture and natural production of the antitumoral (+)-discodermolide by the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Mar. Biotech.*, 15(5): 571-583.
- Schirmer, A., R. Gadka, C.D. Reeve, F. Ibrahim, E.F. DeLong and C.R. Hutchinson. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:4840-4849.

- Sipkema, D., H.W. Blanch and R.H. Wijffels. 2006. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cells or synthesis? Abstracts, 7th Int. Sponge Symp. Rio de Janeiro. 7-13 mayo 2006.
- Smith, A.B., B.S. Freeze, I. Brouard and T. Hirose. 2003. A practical improvement, enhancing the large-scale synthesis of (+)-discodermolide: A third-generation approach. *Org. Lett.*, 5: 4405-4408.
- Tziveleka, L.A., C. Vagias and V. Roussis. 2003. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Curr. Top Med. Chem.*, 3(13): 1512-35.
- Valderrama, K. 2009. Evaluación de la oferta natural y potencial de producción de (+)-discodermólido y/o análogos de la esponja marina del Caribe colombiano *Discodermia dissoluta*. Tesis M. Sc. Química, Univ. Nacional de Colombia, Bogotá. 104 p.
- Valderrama, K., L. Castellanos and S. Zea. 2010. Validation and evaluation of an HPLC methodology for the quantification of the potent antimetabolic compound (+)-discodermolide in the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Sep. Sci.*, 33(15): 2316-21.
- Van Treeck, P., M. Eisinger, J. Müller, M. Paster and H. Schuhmacher. 2003. Mariculture trials with Mediterranean sponge species: the exploitation of an old natural resource with sustainable and novel methods. *Aquaculture*, 218:439-455.
- Vásquez, E. 2011. Cultivo in situ de la esponja de Caribe *Discodermia dissoluta* con miras a la producción biotecnológica del compuesto antitumoral (+)-Discodermólido. Tesis Biol., Univ. Nacional de Colombia, Bogotá. 49 p.
- Webster, N.S., R.E. Cobb and A.P. Negri. 2008. Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J.*, 2(8): 830-42.
- Voogd, N.J. 2007. The mariculture potential of the Indonesian reef-dwelling sponge *Callyspongia (Euplacella) biru*: Growth, survival and bioactive compounds. *Aquaculture*, 262: 54-64.
- Zea S. 1987. Esponjas del Caribe colombiano. *Catálogo Científico*, Bogotá. 286 p.

RECIBIDO / RECEIVED: 29/12/2015

ACEPTADO / ACCEPTED: 30/08/2017

