



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Cultivo de esponjas marinas: estado actual y direcciones futuras

Albert Fuster Prohens

Grau de Biologia

Any acadèmic 2016-17

DNI de l'alumne: 41586797Z

Treball tutelat per Pere Ferriol Bunyola
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Porífera metabolitos secundarios, fármacos, maricultura, cultivo *ex situ*, cultivo celular, *primmorphs*, simbiosis

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	4
<i>Abstract</i>	4
1. Introducción.....	5 - 8
2. Acuicultura de esponjas	8 - 21
2.1. Cultivo <i>in situ</i>	8 - 13
2.2. Cultivo <i>ex situ</i>	13 - 17
2.3. Producción de metabolitos en acuicultura	18 - 21
3. Cultivo de esponjas <i>in vitro</i>	21 - 24
4. Cultivo de simbiontes de esponjas	24 - 25
5. Referencias	26 - 30

RESUMEN

Las esponjas o bien sus comunidades de microorganismos asociadas tienen la capacidad de sintetizar numerosos metabolitos secundarios con potencial farmacológico. Sin embargo, resulta difícil el desarrollo de fármacos derivados de estos compuestos ya que se dan en bajas concentraciones en los poríferos. Por tanto, con el fin de obtener un suministro de éstos suficiente para abastecer la demanda de la industria farmacéutica, se ha tratado de dar con un método de cultivo óptimo para estos organismos. Dentro de las diferentes modalidades de cultivo, el cultivo *in situ*, también llamado maricultura, es la más productiva y económica. En cambio, el cultivo *ex situ* ha presentado una producción de metabolito y un incremento de biomasa generalmente iguales o inferiores respecto a los obtenidos en la maricultura. Considerando el mayor coste económico que implica el cultivo *ex situ*, se deberían obtener mejores resultados para considerarse viable. También el cultivo de esponjas *in vitro* está siendo estudiado actualmente. Aunque en el cultivo de células de poríferos disociadas los resultados han sido más bien pobres, la reagrupación de estas células para la formación de *primmorphs* podría ser una alternativa muy prometedora. El cultivo de los simbioses de las esponjas es otra alternativa al cultivo de esponjas, considerando que ciertos metabolitos son sintetizados parcial o totalmente por dichos microorganismos. Sin embargo, el cultivo tradicional de simbioses únicamente permite cultivar una pequeña porción del número total de microorganismos pertenecientes a la comunidad propia de las esponjas, debido a los requerimientos propios de su contexto ecológico. Técnicas como el co-cultivo y el cultivo *in situ* podrían dar con la solución a esta problemática.

ABSTRACT

Sponges or their associated microorganism's communities have the ability to synthesize bioactive compounds with pharmacological potential. However, the development of drugs derived from these metabolites is difficult since they occur in low concentrations in the poriferans. Therefore, in order to obtain a supply of these compounds sufficient to satisfy the demand of the pharmaceutical industry, an attempt has been made to provide an optimal culture method for these organisms. Within the different cultivation modalities, *in situ* cultivation, also called mariculture, is the most productive and economic method. On the contrary, *ex situ* cultivation has obtained a metabolite production and a biomass increase generally equal to or lower than those obtained in Mariculture. Given its high economic cost, *Ex situ* culture should acquire better results as to be considered viable. On the other hand, the cultivation of sponges *in vitro* is also being studied. Although the results gathered in the culture of dissociated cells have been rather poor, the regrouping of these cells for the formation of *primmorphs* can be regarded as a promising alternative. The cultivation of sponge symbiosis is another alternative to sponge cultivation, considering that the metabolites are partially or totally synthesized by microorganisms. Nevertheless, the traditional culture of symbionts only allows the cultivation of a small portion of the total of microorganisms belonging to the sponge community, due to the requirements of its ecological context. Techniques such as co-cultivation and cultivation *in situ* could be the answer to these problems.

CULTIVO DE ESPONJAS MARINAS: ESTADO ACTUAL Y DIRECCIONES FUTURAS

1. INTRODUCCIÓN

Los poríferos, comúnmente conocidos como esponjas, son los animales pluricelulares más simples y antiguos (Bergquist, 1978). Proceden de una ramificación temprana del reino animal, separándose así del resto de metazoos (Van Soest *et al.*, 2017). Aparecieron en el Precámbrico dándose su máxima diversidad durante las eras del Paleozoico y el Mesozoico, especialmente durante el Cretácico (Hooper & Van Soest, 2012; Van Soest *et al.*, 2017). Actualmente no existe un consenso científico del número total de especies de esponjas (Chapman, 2009). El número de especies descritas oscila en torno a las 9000 (Bergquist, 1978; Van Soest *et al.*, 2017) con un número estimado de poríferos existentes de 15000 (Hooper & van Soest, 2012). Aunque se trate de un número elevado, solo representa una pequeña porción de las esponjas existentes en el pasado (Hooper & van Soest, 2012).

Anatómicamente las esponjas carecen de tejidos verdaderos. Se pueden definir como un conjunto de varios tipos celulares recubiertos por una capa celular externa llamada pinacodermo y un endoesqueleto formado por fibras y/o espículas de esponja (Bergquist, 1978). Son organismos bentónicos sésiles que habitan un amplio abanico de ecosistemas tanto de agua dulce como agua salada (Duckworth, 2009; Schippers, 2013). En ellos pueden dominar la comunidad bentónica en términos de biomasa y abundancia (Duckworth, 2009). Los poríferos son organismos filtradores que tienen la capacidad de captar partículas orgánicas de carbono (POC) (Koopmans *et al.*, 2010) además del carbono orgánico disuelto (DOC) (de Goeij *et al.*, 2008). Este hecho les da un papel relevante en la transferencia de energía de la comunidad planctónica a la bentónica (Duckworth, 2009). Estos organismos sésiles disponen de mecanismos de comunicación química, así como un sistema de defensa, ambos basados en metabolitos secundarios (Hogg *et al.*, 2010). Estos metabolitos ofrecen protección frente al *fouling* (Proksch, 1994), la depredación (Becerro *et al.*, 1997) y las infecciones microbianas (Sipkema *et al.*, 2005a). Cabe recalcar que la mayoría de las esponjas actuales presentan simbiosis con diversos microorganismos como microalgas, bacterias y hongos (Taylor *et al.*, 2007). Éstos desempeñan diversos papeles como la fijación de carbono y nitrógeno, así como el reciclado de nutrientes. Además, algunos simbioses tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos. Este hecho hace difícil determinar si los compuestos bioactivos presentes en los poríferos son producidos por ellos mismos, por sus simbioses o bien de la cooperación de ambos organismos (Schippers, 2013).

Debido a sus numerosas propiedades, las esponjas empezaron a ser utilizadas por los humanos hace miles de años, presentando un amplio bagaje histórico. En un principio se utilizaron los poríferos sin espículas como esponjas de baño. La explotación de este recurso se inició con los primeros egipcios, los cuales recolectaban esponjas mediante el buceo libre (Storr, 1957). Aproximadamente en el año 700 a. C. se empezaron a utilizar también las esponjas en el ámbito médico, como describen Homero y Aristóteles (Voultsiadou, 2007). Durante la época romana, Plinio describió el uso de los poríferos empapándolos con diversas sustancias para tratar dolencias diversas como infecciones, picaduras de animales venenosos, entre otras (Hofrichter y Sidri, 2001). Desde el siglo XVIII los médicos rusos, ucranianos y polacos utilizaba el Badiaga, polvo seco de diversas esponjas de agua dulce, para diversos tratamientos por ejemplo enfermedades pulmonares y reumatismo (Nozeman, 1790). El potencial médico que presenta dicho producto radica en la alta concentración de yodo hallada en la mayoría de las esponjas que la componen (Sipkema *et al.*, 2005a). En los últimos 200 años la práctica de la recolección de esponjas sufrió una amplia expansión desde el Mediterráneo hasta las regiones tropicales del Océano Atlántico occidental y el Océano Pacífico, convirtiéndose así en una importante industria (Duckworth, 2009). Sin embargo, la actividad pesquera y los brotes de enfermedades diezmaron las poblaciones naturales (Lauckner, 1980). Como resultado, durante el siglo XVIII y XIX se inició la investigación del cultivo de esponjas de baño. Japón fue uno de los países con más relevancia en este aspecto alcanzando su auge a finales de la década de 1930 y principios de 1940 especialmente en la zona de Micronesia. Sin embargo, el inicio de la Segunda Guerra Mundial paralizó los esfuerzos realizados (MacMillan & Ladwig, 1996). Además, las enfermedades (Smith, 1941) y el boicot de los pescadores de esponja

(Moore, 1910) impidieron el asentamiento definitivo del cultivo comercial de esponjas. Posteriormente, la invención de la esponja de baño sintética en 1960, mucho más económica, terminó por convertir el comercio de la esponja de baño natural en un pequeño sector dedicado al lujo (Hogg *et al.*, 2010).

Por otro lado, los metabolitos secundarios producidos por las esponjas o sus simbioses abrió un nuevo campo de investigación en la industria farmacéutica. A mediados del siglo XX se inició la criba de los productos bioactivos de los poríferos (Schippers *et al.*, 2012). En 1951 se descubrieron algunos de los primeros nucleósidos de la especie *Cryptotethya crypta* (Bergmann & Feeney, 1951). Se descubrió el efecto antiviral de estos nucleósidos, a partir de los cuales se produjeron derivados como Ara-A, activo contra el herpes, y Ara-C, eficaz en el tratamiento para la leucemia (Schippers *et al.*, 2013). Consecuentemente, en la década de los 70 el instituto *Roche Research Institute of Marine Pharmacology* inició la investigación de los productos químicos producidos por organismos marinos. Con ellos se pretendía poder sintetizar numerosos fármacos (Pomponi, 2001). El 48,8% de los compuestos descubiertos entre 1990 y 2009 procedieron de las esponjas marinas (Leal *et al.*, 2012). Algunos de estos compuestos o sus derivados están siendo estudiados actualmente como potenciales fármacos encontrándose en diferentes etapas de desarrollo (Tabla 1).

Muchos de los compuestos bioactivos se encuentran en concentraciones muy bajas en las esponjas (Schmitz *et al.*, 1993). Por tanto, sería necesaria una recolección de esponjas muy alta que podría poner en riesgo las poblaciones naturales de las especies diana. Este hecho, junto a la dificultad de sintetizar estos compuestos plantea un problema en el suministro de estas sustancias (Hamada & Shioiri, 2005; Schippers *et al.*, 2012). El cultivo comercial de esponjas con el fin de obtener estos productos puede ser una opción viable para poder llevar a cabo el desarrollo de los fármacos y su posterior distribución (Duckworth, 2009; Duckworth & Battershill, 2003; Osinga *et al.*, 2010). Como resultado, hoy en día se ha recuperado el interés en el desarrollo de granjas de poríferos (MacMillan & Ladwig, 1996).

Tabla 1. Algunos de los metabolitos secundarios procedentes de esponjas que han sido aprobados o en vías de investigación. PKS: Síntesis policéticas, NRPS: péptido no sintetizado por ribosomas, “*”: Compuestos con investigación clínica discontinua.

Estadio clínico	Compuesto	Especie(s)	Clase química	Utilidad potencial	Referencia(s)
Aprobado	Cytarabina, Ara- C	<i>Cryptotethya crypta</i>	Nucleósido	Cáncer, leucemia	Bergmann & Feeney, 1951; Malve, 2016
	Eribulina mesylata (E7389)	<i>Lissodendoryx sp.</i> , <i>Halichondria okadai</i>	Macrólido	Cáncer de pecho	Molinski <i>et al.</i> , 2009; Malve, 2016
	Vidarabina, Ara-A	<i>Cryptotethya crypta</i>	Nucleósido	Anti-viral	Bergmann & Feeney, 1951; Malve, 2016
Fase II	Cryptophicina 52 *	<i>Dysidea arenaria</i>	Depsipéptido	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
	Contignasterol (HMR-4011A)	<i>Cymbastela sp.</i> , <i>Auletta sp.</i>	Esteroides	Antihistamínico	Newman & Cragg, 2004
	Manoalide*	<i>Luffariella variabilis</i>	-	Antipsoriasis	Newman & Cragg, 2004

Tabla 1. (Continuación)

Estadio clínico	Compuesto	Especie(s)	Clase química	Utilidad potencial	Referencia(s)
Fase I	Agelasfina (KRN-7000)	<i>Agelas mauritianus</i>	-	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
	Bengamida* (LAF 389)	<i>Jaspis sp.</i>	Alcaloide	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
	Discodermalida*	<i>Discodermia dissoluta</i>	Policétido	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
	Girodazol* (Girollina)	<i>Cymbastela cantharella</i>	-	Cáncer	Newman & Cragg, 2004
	Hemiasterilina (E7974)	<i>Cymbastela sp.</i> , <i>Auletta sp.</i>	Tripéptido	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009; Malve, 2016
	Hemiasterilina (Taltobulina)	<i>Cymbastela sp.</i> , <i>Auletta sp.</i>	-	Cáncer	Newman & Cragg, 2004
	Psammaplina (KRN-7000)	<i>Psammaplinaplysilla sp.</i>	Compuesto fenólico	Cáncer	Newman & Cragg, 2004
	Psammaplina (LAQ 824)	<i>Psammaplinaplysilla sp.</i>	Compuesto fenólico	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
	Renieramicina (Zalypsis)	<i>Xetospongia sp.</i>	-	Cáncer	Sashidhara <i>et al.</i> , 2009
Fase preclínica	Ácido homogentísico	<i>Pseudoceratina sp.</i>	Ácido shikímico	Malaria	Lebouvier <i>et al.</i> , 2009; Malve, 2016
	Callyspongiol	<i>Callyspongia sp.</i>	Policétido	Inmunidad	Umeyama <i>et al.</i> , 2010; Malve, 2016
	Calyculina A	<i>Discodermia calyx</i>	PKS/NRPS	Sistema nervioso	Egami <i>et al.</i> , 2014; Malve, 2016
	Dysideamina	<i>Dysidea sp.</i>	Terpeno	Sistema nervioso	Suna <i>et al.</i> , 2009; Malve, 2016
	Dysidina	<i>Dysidea sp.</i>	Terpeno	Diabetes	Giannini <i>et al.</i> , 2001; Malve, 2016
	Geodisterol sulfato	<i>Topsentia sp.</i>	Péptido	Infecciones de hongos	DiGirolamo <i>et al.</i> , 2009; Malve, 2016
	Hymenidina	<i>Axinella sp.</i>	Alcaloide	Tuberculosis	Zhang <i>et al.</i> , 2012; Malve, 2016

Muchos de los compuestos bioactivos se encuentran en concentraciones muy bajas en las esponjas (Schmitz *et al.*, 1993). Por tanto, sería necesaria una recolección de esponjas muy alta que podría poner en riesgo las poblaciones naturales de las especies diana. Este hecho, junto a la dificultad de sintetizar

estos compuestos plantea un problema en el suministro de estas sustancias (Hamada & Shioiri, 2005; Schippers *et al.*, 2012). El cultivo comercial de esponjas con el fin de obtener estos productos puede ser una opción viable para poder llevar a cabo el desarrollo de los fármacos y su posterior distribución (Duckworth, 2009; Duckworth & Battershill, 2003; Osinga *et al.*, 2010). Como resultado, hoy en día se ha recuperado el interés en el desarrollo de granjas de poríferos (MacMillan & Ladwig, 1996).

Desde 1990 se han realizado numerosos estudios con el fin de encontrar el método de cultivo óptimo para obtener la máxima producción de los compuestos bioactivos de interés. Para esponjas con alta concentración del compuesto de interés, el cultivo de esponjas adultas *in situ* o *ex situ* puede resultar el mejor método (Sipkema *et al.*, 2005b). Ésta técnica se basa en la alta capacidad de regeneración de las esponjas asociada a su reproducción asexual (Duckworth, 2003). Por tanto, a partir de un individuo se pueden obtener numerosos explantes capaces de sobrevivir y aumentar su biomasa (Duckworth, 2009). Por otro lado, cuando las concentraciones de los metabolitos secundarios son muy bajas pueden resultar más productivos otros métodos de cultivo. El cultivo celular *in vitro* permite modificar las condiciones de cultivo para así optimizar la producción del compuesto de interés (Schippers *et al.*, 2012). Además, en caso de que el compuesto bioactivo sea sintetizado por microorganismos simbioses, se podría cultivar únicamente este organismo. Cuando el compuesto es parcialmente sintetizado por la esponja y el simbionte es necesario aplicar co-cultivos (Schippers *et al.*, 2012). En definitiva, es necesario disponer de un amplio abanico de técnicas de cultivo de esponjas y sus simbioses para así poder aplicar el método más apropiado en función de cada especie y metabolito de interés.

Bajo este contexto, esta revisión pretende analizar el estado actual de las diferentes técnicas de cultivo de esponjas y/o sus simbioses. Se tratarán tanto el cultivo de esponjas enteras o explantes (*in situ* y *ex situ*) como el cultivo *in vitro* para la obtención de sus metabolitos.

2. ACUICULTURA DE ESPONJAS

En los últimos años se han publicado numerosas revisiones sobre el cultivo de esponjas (Sipkema *et al.*, 2005b; Pronzato & Manconi, 2008; Duckworth, 2009; Shippers *et al.*, 2012 entre otros) en dos de las cuales se ha recopilado información de los últimos 100 años (Pronzato & Manconi, 2008; Duckworth, 2009). Esta sección del presente trabajo pretende mostrar los nuevos avances en el cultivo de esponjas *in situ* y *ex situ*.

2.1. Cultivo *in situ*

El cultivo de esponjas *in situ* o maricultura consiste en el crecimiento de esponjas en su entorno natural mediante estructuras artificiales. Estas estructuras pueden ser jaulas (Figura 1C); plataformas submarinas que sostienen las explantes perforados verticalmente; cuerdas que atraviesan la esponja para sostenerla (Figura 1A), ya sean horizontales o verticales; mallas, generalmente ubicando los explantes en bolsas (Figura 1C), entre otras (Duckworth, 2009). El éxito de la maricultura radica en la capacidad de las esponjas para regenerarse (Duckworth, 2003). Por tanto, a partir de una esponja se pueden obtener numerosos fragmentos viables de la misma, conocidos como explantes. La técnica de fragmentación de las esponjas para su cultivo se lleva a cabo desde el siglo XIX (Pronzato & Manconi, 2008). El primer estudio sobre cultivo *in situ* fue realizado por Schmidt (1863), desde ese momento existe un amplio bagaje de estudios publicados sobre esta temática. Sin embargo, actualmente el cultivo *in situ* de esponjas sigue representando un reto para los investigadores. Las múltiples amenazas biológicas, ambientales y antrópicas convierten la maricultura en un campo muy vulnerable (Shippers *et al.*, 2012). Por ese motivo la mayoría de los estudios realizados recientemente pretenden determinar los factores ambientales óptimos y las estructuras de cultivo más convenientes para cada especie de esponja (Duckworth, 2009). En este apartado se pretenden valorar los resultados obtenidos en los estudios más recientes de cultivo de esponjas (Tabla 2) y a partir de esa información evaluar los métodos y condiciones más adecuados para llevar a cabo ésta práctica.

Tabla 2. Resultados obtenidos en el cultivo de esponjas *in situ* en los estudios más recientes. % crecimiento (día^{-1}): porcentaje de crecimiento por día respecto el peso inicial. “*”: el porcentaje de supervivencia es aproximado ya que el estudio consultado no facilitó los datos como porcentajes exactos, sino en forma de gráfico. Negativo: se ha dado una reducción del volumen final respecto al inicial.

Especie	Método de cultivo	Localización y profundidad	Supervivencia (%)	Ratio de crecimiento	% crecimiento (día^{-1})	Referencia
<i>Amphimedon chloros</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 10 m profundidad.	16 en 767 días	30-54 % año^{-1}	0,0008-0,0015 %	Bergman <i>et al.</i> , 2011
<i>Amphimedon chloros</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 20 m profundidad	19 en 767 días	29-93 % año^{-1}	0,0007-0,0025 %	Bergman <i>et al.</i> , 2011
<i>Discodermia dissoluta</i>	Bolsa de malla	Santa Marta, Colombia. 18 m profundidad	96 en 6 meses	25,3-33,1 % en 6 meses	0,0014-0,0018 %	Ruiz <i>et al.</i> , 2013
<i>Liosina paradoxa</i>	Jaula	Islas Andamán, India. 3-5 m profundidad	84 en 120 días	54,23 % en 120 días	0,0045 %	Sankar <i>et al.</i> , 2016.
<i>Negombata magnifica</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 10 m profundidad	58 en 592 días	267-351 % año^{-1}	0,0073-0,0096 %	Bergman <i>et al.</i> , 2011
<i>Negombata magnifica</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 20 m profundidad	54 en 592 días	258-338 % año^{-1}	0,0070-0,0092 %	Bergman <i>et al.</i> , 2011
<i>Neopetrosia</i> sp.	Línea horizontal	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	85* en 108 días	106% mes^{-1}	0,0348 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Neopetrosia</i> sp.	Sobre cantos rodados	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	8* en 108 días	12% mes^{-1}	0,0039 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Neopetrosia</i> sp.	Sustrato artificial	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	100* en 83 días	122% mes^{-1}	0,0400 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Jaula	Islas Andamán, India. 3-5 m profundidad	91 en 120 días	95,62 % en 120 días	0,0080 %	Sankar <i>et al.</i> , 2016.
<i>Stylissa massa</i>	Línea horizontal	Pulau Pari, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	37%* en 120 días	4,25% en 120 días	0,0004 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012

Tabla 2. (Continuación)

Especie	Método de cultivo	Localización y profundidad	Supervivencia (%)	Ratio de crecimiento	% crecimiento (día ⁻¹)	Referencia
<i>Stylissa massa</i>	Línea horizontal	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	95* en 108 días	34% mes ⁻¹	0,0111 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Sobra cantos rodados	Pulau Pari, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	0% en 120 días	0	0	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Sobra cantos rodados	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	75* en 108 días	27% mes ⁻¹	0,0089 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Sustrato artificial	Teluk Pegametan, Indonesia. 2,5-1,3 m de profundidad	90* en 108 días	31% mes ⁻¹	0,0102 %	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Theonella swinhoei</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 10 m profundidad	11 en 767 días	-28- (-10) % año ⁻¹	Negativo	Bergman <i>et al.</i> , 2011
<i>Theonella swinhoei</i>	Bolsa de malla, con marco de plástico	Muelle IUI, Israel. 20 m profundidad	22 en 767 días	-46- (-26) % año ⁻¹	Negativo	Bergman <i>et al.</i> , 2011

Los diferentes estudios analizados tuvieron una duración variable, por ello los datos de supervivencia y rango de crecimiento se encuentran en escalas temporales diferentes. Partiendo del supuesto que las esponjas tuvieron un crecimiento constante durante el transcurso del experimento, se ha calculado el porcentaje de crecimiento por día respecto al tamaño inicial. De este modo resulta posible comparar los resultados de los diferentes estudios en una misma escala temporal.

Se puede apreciar que tanto el porcentaje de supervivencia como los rangos de crecimiento presentan grandes variaciones entre las diferentes esponjas y los diversos métodos de cultivo. La especie *Neopetrosia sp.* cultivada en sustrato artificial presentó un rango de crecimiento diario del 0,04% siendo así la esponja con el mayor incremento de biomasa, además de presentar un porcentaje de supervivencia elevado. Este mismo género también presentó un crecimiento y supervivencia similar en cultivos realizados con línea horizontal (Figura 1A), técnica basada en cuerdas dispuestas en posición horizontal. Sin embargo, al aplicar el método de cultivo sobre cantos rodados (Figura 1A) se observaron unos niveles de crecimiento diarios considerablemente inferiores (0'004%). La justificación a este hecho radica en que *Neopetrosia sp.* habita sobre corales y esponjas, con el fin de tener una posición expuesta para llevar a cabo la filtración del agua. El uso de la línea horizontal y el sustrato artificial, ubicados a 50 cm del fondo del mar con una rejilla, son similares a sus condiciones naturales (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012). Por otro lado, el cultivo en canto rodado se encuentra en el fondo del mar. La mayor concentración de sedimentos en el agua provoca la obstrucción de los ósculos. Al no tratarse de una especie adaptada a estas condiciones, la esponja reduce su capacidad de filtración. Además, se ven

obligadas a invertir gran parte de su energía en tareas de limpieza, limitando así su crecimiento (Wilkinson & Vacelet 1979).

Probablemente el bajo porcentaje de crecimiento observado en *Liosina paradoxa* puede ser causado también por el mismo factor. Las jaulas utilizadas en el estudio se encontraban en una zona con un alto contenido de sedimentos en el agua, pudiendo dificultar la filtración de la esponja (Sankar *et al.*, 2016).

En cambio, *Stylissa massa* presentó unos rangos de crecimiento similares para los cultivos de línea horizontal, canto rodado y sustrato artificial en Teluk Pegamentan (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012) y en jaula (Figura 1B) en las Islas Adamán (Sankar *et al.*, 2016). Este hecho se debe a que se puede encontrar de forma natural en cantos rodados de coral, fondos arenosos y zonas de transición entre prados de fanerógamas marinas y arrecifes de coral. Por tanto, dicha especie presenta unas preferencias de hábitats más extendidas que *Neopetrosia sp.*, presentando así menor diferencia entre las diferentes técnicas de cultivo aplicadas (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012). En conclusión, el éxito en la maricultura de esponjas requiere el conocimiento de las condiciones ambientales óptimas de las especies de porífero diana (Duckworth, 2009).

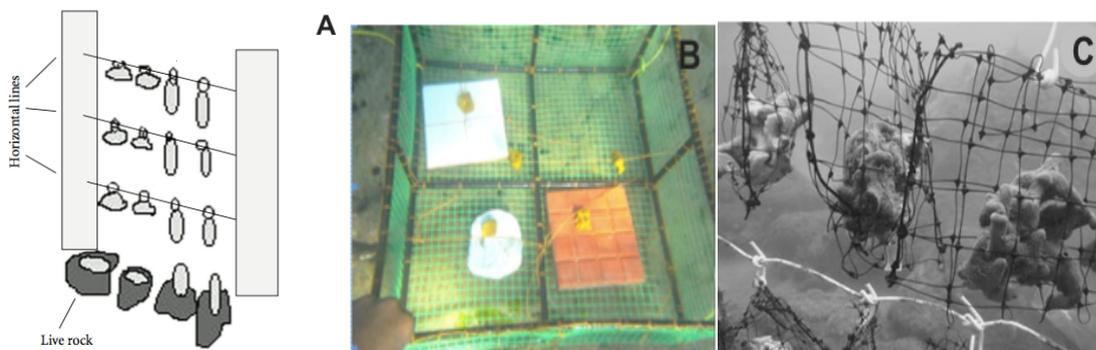


Figura 1. Sistemas de cultivo de poríferos en maricultura. (A) Esquema de un cultivo de esponjas en cuerda horizontal y sobre cantos rodados (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012); (B) Explantes de esponjas cultivados dentro de cajas (Sankar *et al.*, 2016); (C) Cultivo de *D. dissoluta* dentro de bolsas de malla (Ruiz *et al.*, 2013).

Por otra parte, a diferencia de lo esperado, *S. massa* presentó una supervivencia y crecimiento muy inferiores en la zona de Paulau Pari (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012), véase en la Tabla 2. Probablemente esta acentuada disminución en estos parámetros sea causada por la fuerte acción de las olas y las corrientes en este lugar. Este conjunto de factores adversos puede condicionar el comportamiento de las esponjas, ya que se reduce la disponibilidad de alimento y, además, los poríferos invierten mayor cantidad de energía en construir estructuras esqueléticas más consistentes. Para realizar un cultivo de esponjas en estas condiciones las técnicas aplicadas en el estudio analizado (línea horizontal y cantos rodados) no son las más adecuadas, siendo el cultivo en malla la más apropiada (Duckworth, 2009).

La profundidad resulta ser otro parámetro importante que precisar para optimizar el cultivo de poríferos. En el estudio realizado por Bergman y colegas (2011) se mostró una clara diferencia entre los rangos de crecimiento de las diferentes especies estudiadas (*Negombata magnifica*, *Amphimedon chloros* y *Theonella swinhoei*). Sin embargo, no se observaron diferencias relevantes entre los cultivos de una misma especie a diferentes profundidades. Este hecho contrasta con estudios anteriores donde se demostró que la profundidad es uno de los factores ambientales que determinan la supervivencia y el crecimiento de los poríferos (Duckworth *et al.*, 2004). Una posible justificación a esta discrepancia es que la zona de estudio utilizada en el estudio de Bergman presenta un mar tranquilo y claro durante la mayor parte del año y, por otra parte, condiciones homogéneas de temperatura (Bergman *et al.*, 2011). Además, como los explantes se ubicaron a profundidades superiores a 5 metros no se vieron afectados por la posible acción de los rayos UV que podrían limitar su crecimiento (Duckworth *et al.*, 1997).

Otro aspecto importante en el cultivo de esponjas es el sustrato sobre el que se van a cultivar. En el estudio realizado por Sankar y colegas en 2016 se utilizaron cuatro sustratos diferentes en las jaulas donde se cultivó *S. massa* y *L. paradoxa* (roca coralina, bloques de cemento, azulejos y cuerdas). En la tabla 2 únicamente se refleja la media de los cuatro sustratos ya que en el artículo no se aporta toda la información necesaria para completar con precisión los diferentes apartados. Sin embargo, resulta interesante remarcar que existen diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia de los explantes en función del sustrato. Para ambas especies se observó un incremento significativo en el crecimiento en los explantes cultivados con sustrato de roca coralina. Además, la supervivencia de *S. massa* fue del 100% en dicho sustrato. *S. massa* también mostró un crecimiento notable al utilizar como sustrato los bloques, aunque éste fue inferior al primero. Por tanto, se puede suponer que con un sustrato de cultivo semejante al que utiliza el porífero cultivado en su hábitat natural se obtendrán unos resultados de crecimiento y supervivencia óptimos.

Para considerarse un cultivo comercialmente viable las esponjas cultivadas deben duplicar, como mínimo, su tamaño al cabo de un año (Crawshay, 1939) lo que implica un crecimiento diario de un 0'0027% respecto al tamaño inicial. Por tanto, la mayoría de esponjas cultivadas recientemente cumplen este requisito, a excepción de *Discodermia dissoluta* que presentó unos rangos de crecimiento inferiores a los deseados (Tabla 2). Sin embargo, para esta especie en cuestión se pueden considerar unos rangos apropiados ya que resultan similares al crecimiento que experimenta esta especie en la naturaleza (Ruiz *et al.*, 2013). El escaso crecimiento puede ser explicado por la gran cantidad de energía que invierten las especies con un denso esqueleto de espículas en su construcción, a diferencia de las esponjas con esqueleto carnoso (Page *et al.*, 2005). Por otro lado, la mayoría de cultivos donde se ha dado el porcentaje de crecimiento deseado han sido realizados durante periodos de tiempo relativamente cortos, a excepción de *N. magnifica*. Aunque en los estudios de Sankar y colegas (2016), realizado durante un tiempo relativamente extenso, se obtuvieron unos rangos de crecimiento aceptables, cabe puntualizar que en ambas especies se observó una reducción en su crecimiento durante las últimas etapas del muestreo. *L. paradoxa* presentó un desarrollo positivo durante los primeros 90 días de experimento, sin embargo, a partir del día 105 se observó una reducción en el volumen de los ejemplares, respecto a la medición anterior, que se prolongó hasta el último día. Aunque *S. massa* mostró un crecimiento positivo durante todo el experimento, a partir del día 105 se observó una reducción en el crecimiento. Una posible hipótesis a este hecho es que los explantes, una vez regenerados de las heridas producidas al cortarse reducen su tasa de crecimiento invirtiendo más energía en otras funciones. Se demostró que *Latrunculia wellingtonensis* dañada presentó un mayor crecimiento que los especímenes no dañados, ya que posiblemente invirtieron gran parte de su energía en la reproducción (Duckworth *et al.*, 1997). Sería recomendable realizar estudios sobre estas especies más a largo plazo para comprobar si se mantiene el rango de crecimiento a lo largo del tiempo y, por tanto, si se trata de un cultivo potencialmente viable.

La búsqueda una posible solución a la reducción o pérdida de biomasa en los poríferos observada en la mayoría de estudios a largo plazo, lleva a plantear un sistema de cultivo con cosechas parciales. Esta técnica consiste en la recolección periódica de parte de la biomasa de cada explante permitiendo abaratar considerablemente los costes, ya que se mantiene la estructura y los explantes cultivados (Duckworth, 2009). Además, las tasas de crecimiento observadas al aplicar esta técnica en varias esponjas han sido iguales o superiores a los explantes no cosechados (Duckworth & Battershill, 2003; de Voogd, 2007).

Por otro lado, la tasa de supervivencia de los explantes es otro aspecto clave para determinar las posibilidades de una esponja para ser cultivada. Este aspecto refleja la sensibilidad de cada especie de poríferos a las condiciones ambientales, a la preparación de los explantes y a la técnica de cultivo utilizada (Sankar *et al.*, 2016). En este aspecto, para que un cultivo se considere comercialmente viable debe tener una supervivencia superior al 90% (Verdanel & Vacelet, 1990). Generalmente la mayor mortalidad se da durante los primeros días, ya que la capacidad de cicatrización y aclimatación de la esponja cultivada es uno de los factores clave (Devoogd, 2005). Por tanto, minimizar el daño producido al cortar los explantes podría mejorar las tasas de supervivencia en los cultivos (Sankar *et al.*, 2016). Otros aspectos, como escoger el método de cultivo óptimo para cada especie y zona, así como evitar el efecto de los rayos UV realizando los cultivos en profundidades superiores a cinco metros pueden contribuir considerablemente a mejorar este aspecto.

En conclusión, la maricultura puede tratarse de una opción comercialmente viable. Como se ha podido determinar en esta revisión, el éxito del cultivo radica en las características propias de la esponja cultivada, las condiciones ambientales del lugar de cultivo, la reducción en el daño realizado al cortar los explantes y la selección del método de cultivo más adecuado. En caso de desear realizar un cultivo con una nueva especie de esponja resulta imprescindible conocer previamente las condiciones ambientales óptimas para esta especie (Duckworth, 2009). Por una parte, sería necesario el hábitat donde vive y su comportamiento en el ambiente natural. Una vez se disponga de dicha información sería recomendable realizar un estudio experimental sobre el cultivo de la esponja diana en diferentes lugares y utilizando varios métodos (Shippers *et al.*, 2012). En él se mediría parámetros como el rango de crecimiento, la tasa de supervivencia y la producción del compuesto de interés. De este modo se podría determinar si el cultivo del porífero en cuestión resulta viable comercialmente con alguna de las técnicas y métodos utilizados en el estudio experimental.

2.2. Cultivo *ex situ*

El cultivo de poríferos *ex situ* representa otra alternativa para la obtención de los metabolitos secundarios de las esponjas. Esta técnica consistente en el cultivo de las esponjas fuera de su área natural, por lo que permite controlar totalmente las condiciones de cultivo. Por tanto, debería ser posible optimizar tanto la producción de los compuestos de interés como el crecimiento y supervivencia de las esponjas (Duckworth, 2009). Sin embargo, el alto coste de las instalaciones y los escasos resultados apropiados obtenidos en estos estudios comprometen la potencial viabilidad económica de estos estudios.

A pesar de todo, siguen siendo numerosos los estudios recientes centrados en el cultivo de esponjas *ex situ* (Tabla 3). En la mayoría de ellos se pretendieron identificar las condiciones y metodologías óptimas con el fin de rentabilizar el cultivo. Sin embargo, otros se focalizaron en el ámbito medioambiental, como los posibles efectos del aumento de temperatura en los océanos (Duckworth *et al.*, 2012, Duckworth & Peterson, 2013). Estos estudios no buscaron perfeccionar las técnicas de cultivo *ex situ*, pero sí aportaron información relevante sobre las condiciones idóneas para las esponjas.

Duckworth y colegas (2012) realizaron el cultivo de esponja de arrecifes de coral, en diferentes con el fin de determinar los efectos de la acidificación del agua y el aumento de temperatura que se esperan para el año 2100 (Orr *et al.*, 2005). Se utilizaron cuatro tratamientos combinando temperaturas de 28 °C y 32 °C y pH de 7,8 y 8,1. No se observaron diferencias significativas ni en el crecimiento ni en la supervivencia bajo ninguno de los tratamientos. Por tanto, estas variaciones de temperatura y pH podrían no haber sido suficientes para implicar un cambio en el rendimiento de las esponjas. Sin embargo, se sugirió que con un mayor tiempo de cultivo tal vez se hubieran podido observar diferencias, ya que son especies que habitan a escasa profundidad y están bien adaptadas a cambios temporales de temperatura. Por otra parte, en un estudio realizado por Duckworth y Peterson (2013) con *Cliona celata* si se pudieron observar diferencias significativas en la tasa de supervivencia con la variación del pH. Se observó una supervivencia total en el tratamiento con el pH propio de su hábitat (8,1) y un 83% de supervivencia al aplicar un pH ligeramente más ácido (7,8). Se sugirió que la tolerancia a pH más bajos viene dada en gran parte por el genotipo de cada individuo (Duckworth & Peterson, 2013).

Independientemente de los tratamientos, la supervivencia fue total en la mayoría de las especies cultivadas, (*Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Ectyoplasia ferox* e *Iotrochota birotulata*). En comparación con otros autores cabe destacar que en el estudio realizado por Gallimore y colegas en 2013 se dio una tasa de supervivencia en *A. fistularis* notablemente inferior (44%), hecho que demuestra que las técnicas aplicadas por Duckworth *et al.*, fueron más apropiadas. Sin embargo, en el estudio de Duckworth y colegas (2012) para *Smenospongia conulosa* y *Aiolochoira crassa* se dieron tasas de supervivencia inferiores al 100%, 82% y 78% respectivamente. Como la mortalidad se dio en los primeros días de crecimiento probablemente se debió a que ambas esponjas son de forma masivas, es decir formas irregulares que cubren todo el sustrato, y por tanto sufren un mayor daño al realizar los explantes (Duckworth *et al.*, 2012). Por otro lado, los rangos de crecimiento fueron notablemente

diferentes entre las distintas especies. Este hecho se debió a las diferencias interespecíficas propias de cada porífero, ya que el crecimiento observado para cada especie fue cercano a sus rangos de crecimiento silvestres (Wilkinson & Vacelet, 1979; Leong & Pawlik, 2010).

Este hecho refleja que las técnicas aplicadas en este cultivo fueron las apropiadas. En él se utilizó un flujo de agua de mar continuo con una velocidad de circulación de 0,5 litros por minuto. De este modo se aportó el alimento necesario para el desarrollo de las esponjas, además de eliminar el amoníaco producido por la actividad de los explantes. El flujo continuo de agua procedente del mar resulta idóneo para el cultivo de esponjas de arrecifes de coral ya que éstas son más propensas a sufrir estrés fisiológico si las condiciones de cultivo difieren de las condiciones naturales de su hábitat (Duckworth, 2009). De este modo se consiguieron unos parámetros del agua similares a los naturales. Además, al tratarse de poríferos propios de ambientes oligotróficos no se realizó la adición de alimentos o suplementos, ya que sus requerimientos alimentarios son notablemente inferiores a los poríferos de ambientes más ricos en nutrientes (Duckworth *et al.*, 2003; Duckworth & Pomponi, 2005).

Por tanto, con el flujo continuo de agua marina sin filtrar ya se deberían cubrir las necesidades nutricionales de las esponjas. Si se hubiera introducido más alimento, se hubiera podido comprometer la filtración de los explantes viéndose reducido así su crecimiento (Osinga *et al.*, 2001; Duckworth *et al.*, 2003). También fue importante el uso de burbujeadores distribuidos a lo largo del tanque, los cuales permitieron una correcta mezcla del agua y el mantenimiento de unos niveles de oxígeno óptimo.

Cabe destacar que en ninguno de los dos estudios (Duckworth *et al.*, 2012; Duckworth & Peterson, 2013) se dieron variaciones significativas en el crecimiento de las esponjas con la disminución del pH. Puede que este hecho fuese debido a unos niveles de acidez demasiado bajos. Se observó que en condiciones de pH 6,8 las esponjas (del mismo grupo que *C. celata*) cerraban los ósculos, reduciendo así considerablemente su filtración y consecuentemente su crecimiento (Emson, 1966). Por tanto, el mantenimiento de pH próximo al del mar (8,1) puede resultar un factor crucial en la optimización del cultivo *ex situ*.

En el estudio realizado por Sankar y colegas (2016) se utilizó un acuario con agua de mar sin filtrar. El agua se reemplazó diariamente con el fin de mantener sus condiciones óptimas. Tampoco se añadieron nutrientes ni suplementos adicionales. El cultivo de *L. paradoxa* dio resultados alentadores con una alta tasa de supervivencia (94%) y un rango de crecimiento aceptable (0,0037% día⁻¹ respecto al volumen inicial). Por tanto, podría tratarse de una técnica adecuada para su cultivo. En este mismo estudio también se cultivó *S. massa* siguiendo el mismo sistema, pero para esta especie los resultados fueron negativos. La tasa de supervivencia de los explantes fue notablemente inferior (81%) y se dio una reducción en el volumen de los explantes a lo largo del tiempo, por lo que el crecimiento registrado al final del experimento fue negativo. Durante los primeros 15 días se apreció un incremento del volumen, aunque a partir del día 30 se experimentó una reducción progresiva de éste. El elevado crecimiento inicial y su posterior estabilización o reducción ya se había observado en numerosos cultivos de poríferos (García Camacho *et al.*, 2006). Este patrón de crecimiento pudo deberse a un déficit de alimento y a la respuesta de crecimiento rápido de los explantes al ser cortados (Duckworth, 2009). El agua de mar sin filtrar parece ser el sistema de cultivo *ex situ* más exitoso (Osinga *et al.*, 1999). Sin embargo, resultaría interesante realizar un estudio con esta misma especie y técnicas, pero añadiendo alimento adicional para así comparar la influencia de la alimentación en el crecimiento y en la supervivencia de los explantes (Sankar *et al.*, 2016).

Otro aspecto de la acuicultura de esponjas que se revisó en los estudios recientes fue la relevancia del sustrato en el rendimiento del cultivo. El tipo de sustrato determinó en gran medida la facilidad de apego de las esponjas sobre éste. A su vez, el apego tiene un gran peso en la supervivencia (Duckworth & Battershill, 2003; Sankar *et al.*, 2016). En el cultivo realizado por Sankar y colegas (2016) para *S. massa* y *L. paradoxa*, se comparó el uso de cuatro sustratos diferentes (azulejos, cuerda, cantos rodados y bloques) (Figura 2A). En términos de supervivencia se obtuvieron resultados óptimos con los cantos

Tabla 3. Diferentes cultivos de especies de esponjas *ex situ* y resultados obtenidos. % crecimiento (día⁻¹): % de crecimiento por día respecto el peso inicial. “*”: se utilizaron tanques con diferentes pH y temperaturas, al no obtener diferencias significativas se realizó la media de los resultados. N. d.: no se facilita la información en el artículo original. Negativo: se ha dado una reducción del volumen final respecto al inicial.

Espece	Metodología	Alimento	Supervivencia (%)	Ratio de crecimiento	% crecimiento (día ⁻¹)	Referencia
<i>Aiolochoira crassa</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de luz natural	Flujo continuo de agua	78 en 24 días	39,4% en 24 días	0,0164	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Aplysina cauliformis</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de Luz natural	Flujo continuo de agua	100 en 24 días	42,1% en 24 días	0,0175	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Aplysina fistularis</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de Luz natural	Flujo continuo de agua	100 en 24 días	20,1% en 24 días	0,0084	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Aplysina fistularis</i>	Tanque de plástico opaco. Fijadas en fila a una malla	Flujo continuo de agua marina sin filtrar	44 en 44 días	n.d.	n.d.	Gallimore, 2013
<i>Cliona celata</i>	Acuario. pH controlado = 7,8. Crecimiento sobre conchas de vieiras	Flujo continuo de agua. Se añadieron suplementos alimentarios	83 en 133 días	56% en 133 días	0,0042	Duckworth & Peterson, 2013
<i>Cliona celata</i>	Acuario. pH controlado = 8,1. Crecimiento sobre conchas de vieiras	Flujo continuo de agua. Se añadieron suplementos alimentarios.	100 en 133 días	56% en 133 días	0,0042	Duckworth & Peterson, 2013
<i>Ectyoplasia ferox</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de Luz natural	Flujo continuo de agua.	100 en 24 días	0,1% en 24 días	0	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Iotrochota birotulata</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de Luz natural	Flujo continuo de agua.	100 en 24 días	31,5% en 24 días	0,0131	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Liosina paradoxa</i>	Acuario. Cultivado sobre varios sustratos	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	94% en 120 días	44% en 120 días	0,0037	Sankar <i>et al.</i> , 2016

Tabla 3. Continuación

Especie	Metodología	Alimento	Supervivencia (%)	Ratio de crecimiento	% crecimiento (dia ⁻¹)	Referencia
<i>Neopetrosia sp.</i>	Tanque de vidrio. Protegido de luz y lluvia. Cultivo de línea horizontal	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	21 en 107 días	-13% mes ⁻¹	Negativo	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Neopetrosia sp.</i>	Tanque de vidrio. Protegido de luz y lluvia. Cultivo sobre cantos rodados	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	0 en 107 días	0	0	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Neopetrosia sp.</i>	Tanque de cemento. Protegido de luz y lluvia. Cultivo sobre sustrato artificial.	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	100 en 45 días	-7% mes ⁻¹	Negativo	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Smenospongia conulosa</i>	Tanques. Temperatura y pH controlados*. Disponían de Luz natural	Flujo continuo de agua	82 en 24 días	28,9%	0,0120	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>Stylissa massa</i>	Acuario. Cultivado sobre varios sustratos	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	81 en 120 días	-25% en 120 días	Negativo	Sankar <i>et al.</i> , 2016
<i>Stylissa massa</i>	Tanque de vidrio. Protegido de luz y lluvia. Cultivo de línea horizontal	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	4 en 107 días	-4% mes ⁻¹	Negativo	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Tanque de vidrio. Protegido de luz y lluvia. Cultivo sobre cantos rodados	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	6,25 en 107 días	-11% mes ⁻¹	Negativo	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012
<i>Stylissa massa</i>	Tanque de cemento. Protegido de luz y lluvia. Cultivo sobre sustrato artificial	Agua marina con filtro biológico, con renovación diaria. Sin nutrientes añadidos.	100 en 45 días	10% mes ⁻¹	0,0003	Schiefenhövel & Kunzmann, 2012

rodados para ambas especies (100% de supervivencia). Este hecho se debió al excelente apego dado en las esponjas en este sustrato. Probablemente tuvieron esta gran facilidad de apego debido a que se trata de un sustrato natural propio de su entorno. También los bloques ofrecieron una supervivencia total para *L. paradoxa*. En los sustratos restantes la supervivencia fue notablemente baja debido a las dificultades que presentaron los poríferos para el apego (Sankar *et al.*, 2016). Para poder promover la supervivencia de los explantes y facilitar su apego se propuso conservar una pequeña porción del sustrato adherido a las esponjas al ser recogidas en su medio natural (Nickel *et al.*, 2001).

Algunos estudios difirieron en los resultados ya comentados referentes a la supervivencia de las esponjas. En el cultivo de *Neopetrosia sp.* y *S. massa* realizado por Schiefenhövel y Kunzmann (2012), donde se compararon tres sustratos (artificial, cantos rodados y cuerdas en línea horizontal), la mayor supervivencia y apego se dio sobre el sustrato artificial. Sin embargo, la metodología utilizada para los diferentes sustratos no fue la misma. Para los cantos rodados y la línea horizontal se utilizaron tanques de vidrio más pequeños que los tanques de cemento donde se cultivó con sustrato artificial. Por tanto, el mayor volumen de agua en los tanques de cemento ofreció una mayor capacidad de intercambio de nutrientes mitigando los efectos de la limitación de nutrientes explicados anteriormente (Schiefenhövel & Kunzmann, 2012). También se apuntó a la posible toxicidad de los fragmentos muertos en el tanque de vidrio, hecho que conllevó a un fallecimiento en cadena de los explantes restantes (Delbeek & Sprung, 1994). Al tratarse de un circuito de agua cerrada este efecto se vio magnificado.

Sin embargo, en el estudio realizado por Sankar y colegas (2016), las tasas de crecimiento más altas no se dieron en los cantos rodados, donde la supervivencia y el apego fue mayor. Para *S. massa* se dieron rangos de crecimiento significativamente más altos utilizando cuerdas y azulejos, respecto a los cantos rodados. Para *L. paradoxa* se observó también el mayor crecimiento en cuerda, presentando un crecimiento similar para los tres sustratos restantes. Probablemente este incremento del crecimiento al utilizar la cuerda como sustrato se debe a que esta técnica ejerce un mayor daño sobre los explantes promoviendo así su regeneración, como ya se ha observado en otros estudios (Duckworth *et al.*, 1997).

En conclusión, el cultivo de esponjas *ex situ* se encuentra lejos de ser un cultivo comercialmente viable. El alto coste económico que conlleva la adecuación de un recinto para dicha actividad implica obtener unos niveles de producción óptimos que lo hagan rentable. Nada más lejos, los resultados obtenidos en los diversos estudios realizados apuntan a una producción generalmente más baja que en la maricultura, técnica notablemente más económica. Por tanto, sigue siendo necesario una amplia investigación sobre este tipo de cultivo para poder dar con la metodología y condiciones para obtener los resultados deseados. En definitiva, difícilmente el cultivo de esponjas *ex situ* resultará una industria viable a corto o medio plazo, aunque presente un gran potencial.

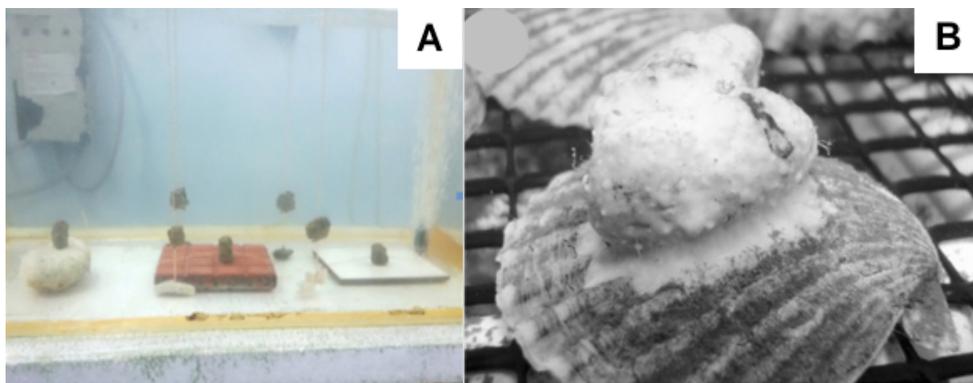


Figura 2. Sistemas de maricultura. (A) Cultivo de explantes en acuario sobre varios sustratos (Sankar *et al.*, 2016). (B) *C. celata* cultivada en tanque sobre las conchas de vieiras (*Pecten sp.*) (Duckworth *et al.*, 2012).

2.3. Producción de metabolitos en acuicultura

Como ya se ha afirmado anteriormente, el cultivo actual de poríferos, tanto *in situ* como *ex situ* tiene como diana la obtención de metabolitos secundarios de con potencial farmacológico. Aunque en términos de rendimiento de cultivo se acostumbra a hablar de crecimiento y supervivencia, resulta crucial que los explantes cultivados conserven la capacidad de producir los compuestos de interés que presentan en su hábitat natural (Shippers *et al.*, 2012). Algunos de los estudios mencionados en los apartados anteriores, han valorado las concentraciones de los metabolitos de interés producidos por cada especie de esponja (Bergman *et al.*, 2011; Duckworth *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Winklet, 2013). Los resultados obtenidos en estas investigaciones se encuentran agrupados en la Tabla 4.

En el cultivo *ex situ* por Duckworth y colegas en 2012 se utilizaron cuatro tratamientos combinando dos valores de temperaturas (28 y 32°C) y dos valores pH (7,8 y 8,1). En él se compararon las concentraciones de los metabolitos secundarios mayoritarios producidos por: *A. cauliformis* (Fistularina 3), *A. crassa* (N-methyl-aerophobin 2 y N, N'-dimethylhistamina), *E. ferox* (Zooanemonina) y *I. birotulata* (N-tele-methylhistamina).

Las concentraciones de la mayoría de los metabolitos estudiados se encontraron dentro de los rangos de las concentraciones naturales de cada especie (Tabla 4). Sin embargo, las concentraciones de los dos metabolitos de *A. crassa* (N-methyl-aerophobin 2 y N, N'-dimethylhistamina) fueron significativamente inferiores a las encontradas en los especímenes en estado salvaje. Esta escasa producción no pareció estar relacionada con una respuesta de la esponja al ser cortada (defensa química), ya que la recogida y posterior congelación de los explantes se realizaron transcurridos 24 días del corte. Por tanto, este hecho indica que el cultivo en acuario altera la biosíntesis de algunos metabolitos, resultando en unos niveles anómalos respecto las poblaciones naturales (Duckworth *et al.*, 2012).

Por otra parte, de los 5 metabolitos analizados en dicho estudio, únicamente se observaron variaciones significativas en las concentraciones de Zooanemonina de *E. ferox* y N-tele-metilhistamina de *I. birotulata* entre los tratamientos realizados.

Las concentraciones de zooanemonina variaron significativamente en función de la temperatura del agua. La concentración del compuesto a una temperatura de 28 °C, fue de 1,9 mg·g⁻¹, siendo prácticamente un 20 % superior a la del tratamiento a 31 °C (1,5 mg·g⁻¹). Resultó evidente la reducción en la producción de Zooanemonina a temperaturas más altas. Por tanto, mantener una temperatura en los acuarios próxima a la del mar resultó ser clave para obtener unos niveles de producción del compuesto lo más altos posibles. Sin embargo, cabe destacar que los niveles de metabolitos para ambos tratamientos se encontraron dentro de los rangos de las poblaciones naturales de *E. ferox* (Duckworth *et al.*, 2012). Es importante remarcar que esta disminución en la concentración del metabolito estudiado con el aumento de la temperatura no se puede generalizar a todas las especies de poríferos. En otros estudios, se observó una correlación positiva entre la temperatura y la concentración de los metabolitos Salicylialmida A en *Halicona sp.* (Abdo *et al.*, 2007) y Mycalamida A en *Mycale hentscheli* (Page *et al.*, 2005). Además, se demostró que a una temperatura de 33 °C o superior se comprometían seriamente las relaciones simbióticas con microorganismos en diferentes especies de esponjas (Webster *et al.*, 2008). Evidentemente, la desaparición de estos microorganismos implicaría una reducción notable en la supervivencia y crecimiento del porífero así como una reducción en la concentración de los metabolitos secundarios.

La concentración media de N-tele-metilhistamina varió en función del pH cuando la temperatura del agua fue de 28 °C. Se observó un aumento de casi un 25% de la concentración del compuesto al aplicar un pH más ácido (7,8) que el propio del mar (8,2). En consecuencia, con la acidificación del agua se consiguió un ligero incremento en las concentraciones de este compuesto en *I. birotulata* cultivada, respecto las poblaciones naturales de esta misma especie.

Tabla 4. Producciones naturales y en cultivo de los metabolitos secundarios de interés producidos por diversas especies de esponjas. N. d.: no se facilitó la información en el artículo original. ”*”: En dicho estudio se aportó la concentración del metabolito por gramos de esponja seca sin cenizas.

Metabolito	Especie	Método de cultivo	Producción en cultivo (g·g ⁻¹ esponja seca)	Producción natural (g·g ⁻¹ esponja seca)	Referencia(s)
11-Oxoacerothonina	<i>Aplysina fistularis</i>	<i>Ex situ</i>	0,29 %	0,11- 0,12 %	Ciminiello <i>et al.</i> , 1994; Winklet, 2013
Aerotionina	<i>Aplysina fistularis</i>	<i>Ex situ</i>	0,07 %	0,09- 1,50 %	Ciminiello <i>et al.</i> , 1994; Winklet, 2013
Discodermolida	<i>Discodermia dissoluta</i>	<i>In situ</i>	0,02 %*	0,02 %*	Ruiz <i>et al.</i> , 2013
Halitoxina	<i>Amphimedon rosros</i>	<i>In situ</i>	n. d.	n. d.	Bergman <i>et al.</i> , 2011
Fistularina 3	<i>Aplysina cauliformis</i>	<i>Ex situ</i>	1,30 %	1,15- 1,60 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
Lat-B	<i>Negombata magnifica</i>	<i>In situ</i>	0,94 %	0,72%	Bergman <i>et al.</i> , 2011
N-methyl-aerophobin 2	<i>Aiolochoira crassa</i>	<i>Ex situ</i>	0,83 %	1,10- 1,40 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
N,N'-dimethylhistamina	<i>Aiolochoira crassa</i>	<i>Ex situ</i>	0,21 %	0,18- 0,26 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>N-tele-</i> methylhistamina	<i>Iotrochota birotulata</i>	<i>Ex situ</i> Temperatura: 28° C pH: 7,8	0,29 %	0,20- 0,27 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
<i>N-tele-</i> methylhistamina	<i>Iotrochota birotulata</i>	<i>Ex situ</i> Temperatura: 28° C pH: 8,1	0,22 %	0,20- 0,27 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
Swinholida A	<i>Theonella swinhoei</i>	<i>In situ</i>	n. d.	n. d.	Bergman <i>et al.</i> , 2011
Zooanemonina	<i>Ectyoplasia ferox</i>	<i>Ex situ</i> Temperatura: 28° C	0,19 %	0,13- 0,17 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012
Zooanemonina	<i>Ectyoplasia ferox</i>	<i>Ex situ</i> Temperatura: 32° C	0,15 %	0,13- 0,17 %	Duckworth <i>et al.</i> , 2012

Las concentraciones de muchos metabolitos bioactivos de poríferos están estrechamente ligados a diversos factores ambientales tales como la temperatura (Koopmans *et al.*, 2009). Sin embargo, en el estudio de Duckworth y colegas (2012), el hecho de que las esponjas cultivadas fueran propias de arrecifes de coral, bien adaptadas a cambios temporales en las condiciones del agua, y además, la corta duración del experimento (24 días), atenuaron considerablemente los efectos de dichas variaciones, dando lugar a unas concentraciones cercanas a las naturales y con escasa variación entre los tratamientos. Para poder determinar con mayor certeza las variaciones en los compuestos bioactivos de las esponjas estudiadas, se sugirió realizar un cultivo más a largo plazo.

En su conjunto la metodología de cultivo *ex situ* aplicada en el estudio de Duckworth y colegas (2012), explicada en el apartado 2.2., resultó ser ciertamente prometedora. El crecimiento, la supervivencia y la concentración de metabolitos estudiados para las diferentes especies fueron similares a los encontrados en las poblaciones naturales de estas esponjas.

En otro estudio llevado a cabo por Winklet (2013) se cultivaron explantes de *Aplysina fistularis* en tanques. Al realizar el análisis químico de los metabolitos secundarios se observaron cuatro tipos diferentes: Aerotionina (producción: 0,07 %), 11-oxoaerotionina (producción: 0,29 %), Aeroplysinina 2 (producción: 0,03%) y Acetamida (producción: 0,05 %).

La Aerotionina y 11-oxoaerotionina se encontraron también en las poblaciones naturales de *A. fistularis*. La concentración de Aerotionina fue notablemente inferior en los explantes de los tanques que en las poblaciones naturales (1,5 %). La producción de este metabolito viene íntimamente ligado a una respuesta frente a las amenazas (Walker *et al.*, 1985). El segundo compuesto hallado, presentó unos rangos superiores a los silvestres (0,20-0,27 %) (Ciminiello *et al.*, 1994). El hecho de que los explantes cultivados presentaron estos compuestos bioactivos propios de las poblaciones naturales, indicó que los poríferos fueron capaces de hacer frente al estrés asociado al cultivo manteniendo su sistema biosintético funcional sin grandes modificaciones (Winklet, 2013).

Por otro lado, los compuestos Aeroplysinina 2 y Acetamida no se habían encontrado en las poblaciones naturales de esta especie. Probablemente estos compuestos adicionales fueron producto de la manipulación para el cultivo, debido a que su función ecológica en estado natural es la defensa química frente al daño producido por ejemplo por la depredación (Thoms *et al.*, 2006). Esta misma respuesta ya se había observado para una especie del mismo género, *Aplysina aerophoba* (Weiss *et al.*, 1996). Además, la presencia de estos metabolitos también indicó que el sistema de acuicultura utilizado mejoró, o al menos, alteró ciertos sistemas biosintéticos de la esponja. Aeroplysinina 2 ya se había identificado en *A. fistulosa* (Cruz *et al.*, 1990) y *A. aerophoba* (Minale *et al.*, 1972). Se supuso que se trataba de un compuesto producto de la conversión de aeroplysinina 1, compuesto que no se halló en este estudio, a Aeroplysinina 2 mediante una reacción catalizada por enzimas. La bioconversión de Aeroplysinina 1 se observó en numerosas especies del género *Aplysina* cuando se infringieron lesiones a los poríferos (Thoms *et al.*, 2006). Por tanto, el daño sufrido por los explantes al ser cortados podría explicar la presencia de este metabolito. Por otro lado, la Acetamida fue detectada por primera vez en *A. fistularis* en el cultivo de Winklet (2013).

Aunque las tasas de supervivencia fueron ciertamente pobres en este mismo estudio (Tabla 3), la producción de metabolitos de los explantes fue prometedora. Se consiguió una concentración de 11-oxoaerotionina en los explantes superior al de las poblaciones naturales. Este compuesto resulta de gran interés en la industria farmacéutica debido a su elevada actividad citotóxica en las células de cáncer de colon humano (Acosta & Rodríguez, 1992). Resultaría interesante seguir estudiando el cultivo de *A. fistularis* para así optimizar la metodología de cultivo que se aplicó en este estudio y conseguir una mejora en la tasa de supervivencia y el crecimiento. De este modo, se podrían llegar a alcanzar una producción de biomasa y compuestos bioactivos comercialmente viables.

Son escasos los artículos recientemente publicados donde se relaciona la producción de compuestos bioactivos con la maricultura. En un estudio realizado por Bergman y colegas (2011) se cultivaron tres especies de poríferos y se analizó la producción natural y cultivada de sus principales metabolitos de interés. Las especies cultivadas y sus respectivos compuestos de interés fueron: Halitoxina de *Amphimedon chloros*, Lat-B producido por *Negombata magnifica* y Swinholida A propio de *Theonella swinhoe*.

El análisis de los explantes durante el cultivo reflejó que la producción de dichos metabolitos por parte de las tres esponjas fue continua. Como estos compuestos también se hallaron en las poblaciones naturales de estas especies, quedó patente que el cultivo *in situ* no inhibió su producción. En cuanto a las concentraciones de los compuestos bioactivos, en el estudio únicamente se informó del contenido de

Lat-B. Los niveles encontrados en los explantes cultivados (0,94 %) fueron superiores al contenido que presenta *N. magnifica* silvestre (0,72 %). Otro aspecto que se valoró en este trabajo fue las variaciones que se podían dar entre los explantes de una misma especie cultivados a diferente profundidad (10 y 20 metros). La concentración de Lat-B varió ligeramente entre los ejemplares cultivados a 10 metros (0,91%) y los cultivados a 20 metros (0,96%). Aunque la diferencia que se dio no resultó ser significativa, la menor concentración de metabolito observada a menor profundidad pudo ser efecto de la mayor luz percibida por los explantes. Este comportamiento ya se había observado en otro porífero, *Crambe crambe*, el cual presentó menor toxicidad en zonas bien iluminadas (Becerro *et al.*, 1995).

Sin duda, el cultivo *in situ* de *N. magnifica* para la obtención de Lat-B realizado por Bergman y colegas en 2013, es uno de los resultados más cercanos a ser viables. Tanto el crecimiento como la producción del metabolito fueron ciertamente alentadores. Únicamente la tasa de supervivencia se encontró por debajo de los niveles deseados (Tabla 2). Por tanto, consiguiendo mejorar este último parámetro sería viable proponer un cultivo comercial de esta especie siguiendo una metodología similar a la aplicada en el estudio comentado.

Ruiz y colegas (2013) realizaron otro cultivo *in situ* de *D. dissoluta* donde se midió la producción de Discodermolida. Las concentraciones halladas de dicho compuesto fueron prácticamente las encontradas en poblaciones naturales (0,02 %). Al igual que lo ocurrido en el crecimiento, se trató de unos niveles muy bajos para hacer viable su cultivo. Las esponjas con una baja producción de los compuestos bioactivos de interés, como *D. dissoluta*, resultan difíciles de cultivar obteniendo unos resultados deseados. La utilización de grandes cantidades de biomasa, del porífero se planteó como una posible solución. El único caso en el que se intentó cultivar una esponja de baja producción comercial utilizando grandes cantidades del porífero fue con la especie neozelandesa *Mycale hentscheli*. Sin embargo, el aumento de la escala derivó en una invasión masiva de depredadores, lo que redujo el crecimiento (Page *et al.*, 2011), y la empresa inversora dejó de interesarse por dicho cultivo. Otro aspecto que se resaltó en el estudio fueron las variaciones en el contenido de Discodermolida en función de las esponjas madre de las cuales se obtuvieron los explantes. Por tanto, se planteó la posibilidad de seleccionar para el cultivo únicamente los individuos más productivos.

En conclusión, valorando los diferentes parámetros de interés para el cultivo de esponjas (tasa de supervivencia, crecimiento y concentración del metabolito de interés) queda patente que la maricultura se encuentra mucho más cerca de ser una industria viable que el cultivo en tanques. Los resultados obtenidos *ex situ* generalmente no son mejores que en la maricultura. Además, el mayor coste económico que representan la construcción y el mantenimiento de las instalaciones en el cultivo en tanques obliga a obtener unos resultados significativamente mejor que en el cultivo *in situ*, técnica mucho más barata. Aunque aún no se ha conseguido un cultivo óptimo, sin duda en maricultura se podría llegar a esta meta en un futuro inmediato. Resultados como el obtenido en *N. magnifica* dan pie al optimismo en esta línea de investigación.

3. CULTIVO DE ESPONJAS *IN VITRO*

La acuicultura de esponjas puede parecer una solución ideal para sustentar la demanda de sus metabolitos. Sin embargo, el crecimiento extremadamente lento y la baja producción de los compuestos bioactivos por parte de ciertos poríferos pone en cuestión la viabilidad de esta práctica, al menos para algunas especies. Una posible alternativa es el desarrollo de un sistema de cultivo celular o tejidos *in vitro*. Además, con el descubrimiento de las propiedades de re-agregación de las células de esponjas capaces de desarrollar un individuo funcional (Wilson, 1907) surgió otra alternativa posible en el cultivo *in vitro* denominada como *primmorphs*. Esta técnica consiste en agregados multicelulares de células de poríferos previamente disociadas constituidos por una capa externa de pinacocitos y una zona central con células esféricas primarias (Figura 3A) (Sipkema *et al.*, 2003c). Todas estas metodologías de cultivo son potencialmente capaces de producir un número suficiente de células para obtener cantidades suficientes de los metabolitos de interés, para abastecer la demanda tanto a nivel de investigación como

comercial (Grasela *et al.*, 2012). El gran potencial de las esponjas para ser cultivadas radica en la presencia de células madre totipotentes y a la facilidad de disociar sus células. Además, el cultivo *in vitro* permite definir y controlar casi por completo el sistema de cultivo (Shippers *et al.*, 2012). Desafortunadamente, los progresos en esta línea de investigación han sido escasos.

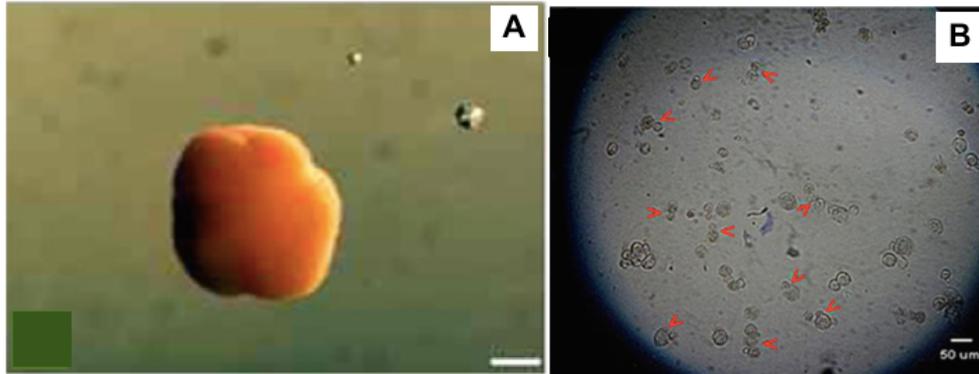


Figura 3. Técnicas aplicadas en el cultivo celular de esponjas. **(A)** *Primmorph* obtenido a partir de células disociadas de *P. ficiformis* no congeladas, cultivado en agua de mar no filtrada durante 2 días (barra = 300 μ m) (Mussino *et al.*, 2013). **(B)** Heterocarios obtenidos en la fusión de células de *Haliclona sp.* con *Trichoplusia ni*, indicados con flechas rojas (Grasela *et al.*, 2012).

Aunque el presente estudio está mayoritariamente centrado en el cultivo de esponjas *in situ* y *ex situ*, no se ha podido obviar el cultivo *in vitro* debido a su gran potencial. Por tanto, este apartado se centrará en algunos de los avances más relevantes obtenidos recientemente en este campo recientemente (Tabla 5).

Uno de los estudios más completos dentro de este campo fue realizado por Grasela y colegas (2012). En él se llevaron a cabo numerosos experimentos con el fin de determinar que metodología y técnicas permitían optimizar el cultivo celular. Se intentó aplicar por primera vez en poríferos la fusión celular con el fin de obtener heterocáries, células con dos núcleos, bien adaptados al cultivo *in vitro* (Figura 3B). La identificación y la transfección del gen Ras, implicado en la diferenciación, proliferación y supervivencia celular en las esponjas, también fue objetivo de estudio. A partir de este gen se pretendió adquirir una línea celular inmortal mediante la mutagénesis o activación de dicho gen. Para ambos técnicas el resultado fue decepcionante (véase Tabla 5). Otro aspecto que se valoró fue la facilidad que ofrecían dos sustratos diferentes en la adherencia del cultivo celular, ya que generalmente las células de poríferos disociadas no se adhieren al cultivo firmemente (Pomponi 2006). Se utilizaron dos sustratos: uno con colágeno tipo 1 procedente de los tendones de la cola de rata y otro constituido con extracto de *Negombata sp.* En este campo tampoco se consiguió ningún avance, ya que en ninguno de los dos sustratos se dio adherencia. También se valoró el efecto de diferentes concentraciones de fosfato inorgánico sobre el cultivo. Tampoco se dio ninguna mejora, aunque en estudios previos realizados sobre células epidérmicas de ratones sí se había observado un aumento en la proliferación celular (Camalier *et al.*, 2010).

Los escasos éxitos obtenidos en los cultivos celulares de esponja han impulsado la revisión de los fundamentos básicos de éstos. Una de las grandes problemáticas en el cultivo *in vitro* es el alto riesgo de contaminación, ya que no hay zonas en ninguna esponja a partir de la cual se pueda obtener fácilmente un inóculo axénico (Pomponi 2006). Para ello Grasela y colegas (2012) buscaron la metodología a seguir para reducir al máximo este factor. Realizando el cultivo mediante embriones de esponja recién capturados se observaron las tasas de contaminación más bajas (40,7 %), seguidas del cultivo a partir del mesohilo de esponjas adultas (47,4%), es decir la capa intermedia entre el pinacodermo y el coanodermo. En cambio, los cultivos procedentes de tejido de esponja que contenía otras partes a excepción del mesohilo y de embriones previamente crioconservados, presentaron una tasa mucho más alta (90,1% y 98 % respectivamente). Sin embargo, la aplicación del antibiótico Percoll permitió eliminar la mayoría de microorganismos, aunque comprometió la viabilidad de las células. Además, la

Tabla 5. Resultados obtenidos en algunos estudios realizados recientemente en el campo del cultivo de esponjas *in vitro*. “N.d.”: no se facilita la información en el artículo original.

Objetivo	Medio	Utilidad potencial	Especie	Resultado	Referencia
Condiciones asépticas en el medio de cultivo	Leibowitz L15 (Ilan <i>et al.</i> , 1996)	Reducir lo máximo posible el riesgo de contaminación del cultivo de células de esponja	<i>Negombata magnifica</i>	El cultivo a partir de embriones recién recogidos presentó menor tasa de contaminación El uso de Percoll eliminó la mayoría de microorganismos, aunque también comprometió la viabilidad de las células cultivadas.	Grasela <i>et al.</i> , 2012
Cultivo de células disociadas y <i>primmorphs</i> de esponjas criopreservadas	Agua de mar filtrada	Permitir el intercambio mundial de material biológico vivo	<i>Petrosia ficiformis</i>	Las células criopreservadas tuvieron una alta viabilidad, no formaron <i>primmorphs</i> Los <i>primmorphs</i> criopreservados presentaron una viabilidad y nivel de proliferación similar a los no congelados	Mussino <i>et al.</i> , 2013
Exposición de las células de poríferos a diferentes concentraciones de fosfato inorgánico	Agua de mar filtrada	Conocer si el fosfato inorgánico promueve la proliferación del cultivo	N.d.	No se observó respuesta celular	Grasela <i>et al.</i> , 2012
Fusión celular: unir las células de la esponja con <i>Trichoplusia ni</i> (lepidóptero)	ExCell-420 + 10% serum bovino	Obtener heterocarions más adaptables al cultivo <i>in vitro</i>	<i>Haliclona sp.</i>	Se dio la fusión celular. Sin embargo, no se consiguió la replicación. Al cabo de dos semanas se contaminaron	Grasela <i>et al.</i> , 2012
Identificación del gen Ras y transfección de este mediante <i>Human cytomegalovirus</i> .	-	Conseguir la mutagénesis dirigida al gen Ras para así conseguir una línea celular de esponjas inmortal	<i>Geodia cydonium</i> , <i>Suberites domuncula</i> y <i>Haliclona sp.</i>	No hubo semejanzas significativas con ninguno de los genes Ras de esponja publicados. Tampoco se consiguió la transmisión de los genes de interés	Grasela <i>et al.</i> , 2012
Optimización del cultivo de <i>primmorphs</i>	RPMI	Conseguir un mayor rendimiento en el cultivo de <i>primmorphs</i>	<i>Petrosia ficiformis</i>	La retención de espículas endógenas junto a las células en la re-agregación aumentó la formación de <i>primmorphs</i> . Además, la adición de silicato y hierro en el medio RPMI, aumentó significativamente el crecimiento	Prozzolini <i>et al.</i> , 2014
Requerimientos nutricionales	Leibowitz L15 (Ilan <i>et al.</i> , 1996)	Conocer los nutrientes y suplementos nutricionales idóneos para el desarrollo del cultivo	<i>Negombata magnifica</i>	El extracto de embrión de pollo resultó ser el más eficaz. Además, el TPA y el ionóforo de calcio mejoraron el estado de los cultivos primarios	Grasela <i>et al.</i> , 2012
Adherencia de las células al sustrato	Leibowitz L15 (Ilan <i>et al.</i> , 1996)	Comprobar en qué sustratos se da mayor adherencia	<i>Negombata magnifica</i>	No se dio adherencia en ningún sustrato y las muestras se contaminaron o desintegraron a los pocos días	Grasela <i>et al.</i> , 2012

adición de antibióticos en el agua de mar podría matar la población bacteriana endógena de la esponja, viéndose así más expuesta a otros microorganismos patógenos (Sipkema *et al.*, 2003).

Los requerimientos nutricionales también han sido objeto de estudio. Grasela y colegas (2012) aplicaron extractos de diferente procedencia con el fin de determinar cuál de ellos resultaba más útil para el cultivo celular de esponjas. Se demostró que el extracto de embrión de pollo con una concentración final del 5% resultó ser eficaz. Además, la adición de los suplementos TPA, promotor tumoral (Krasagakis *et al.*, 1993), y ionóforo de calcio también contribuyeron en la optimización del cultivo. Por otro lado, Prozzolini y colegas (2014) investigaron la adición de suplementos en el cultivo de *primmorphs*, ya que previamente no se habían observado aumentos en la biomasa de este cultivo (Shippers *et al.*, 2012). El cultivo mostró un aumento significativo en el crecimiento al aplicar silicato, que dio una mayor espiculogénesis, hierro, que promovió la síntesis de colágeno y el medio de cultivo RPMI, generalmente utilizado para las células de mamíferos. En este mismo estudio también se comprobó que la re-agrupación de las células de poríferos se promovió cuando las células disociadas retuvieron espículas endógenas. Otro aspecto ventajoso que ofrecieron los *primmorphs* fue la capacidad de mantener unos niveles de viabilidad y proliferación celulares al ser criopreservados (Mussino *et al.*, 2013). Este hecho abrió la posibilidad de facilitar el intercambio mundial de poríferos vivos criopreservados.

4. CULTIVO DE SIMBIONTES DE ESPONJAS

Otro aspecto importante en la obtención de compuestos bioactivos de potencial médico es la comunidad de microorganismos asociados a esponjas, principalmente compuesta por bacterias. Además, éstas pueden estar acompañadas de arqueas, hongos, algas unicelulares o protozoos (Taylor *et al.*, 2007). Estas comunidades pueden ser grandes y diversas (Hooper *et al.*, 2002) pudiendo representar una fracción importante del volumen del tejido de la esponja (Hentschel *et al.*, 2006). Como ya se ha señalado anteriormente (apartado 1), una fracción importante de los metabolitos secundarios producidos por las esponjas son sintetizados, en parte o totalmente, por sus simbiontes. Estos metabolitos secundarios resultan ser interesantes para el descubrimiento de fármacos por la actividad antiinflamatoria, antibiótica, antitumoral, anticancerosa, antibacteriana y antimicótica encontrada en algunos de ellos (Piel, 2004; Molinski *et al.*, 2009). Por tanto, las diferentes técnicas de cultivo de estos simbiontes pueden ayudar a abastecer la demanda de ciertos compuestos bioactivos y facilitar el descubrimiento de otros.

En los últimos años se han publicado numerosas revisiones sobre el cultivo de simbiontes (Shippers *et al.*, 2012; Macintyre *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2016). Vista esta circunstancia, el presente trabajo únicamente pretende dar una visión general de algunas de las innovaciones que se han dado en este campo. En caso de que se desee un mayor aporte de información se recomienda leer las revisiones citadas previamente.

Tradicionalmente los microorganismos asociados a esponjas se han cultivado mediante placas en serie en diversos medios de cultivo selectivos. Sin embargo, tan solo se ha podido cultivar con éxito un 0,001- 1 % de éstos (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 2014). Este bajo porcentaje ha sido consecuencia de las condiciones altamente inestables, heterogéneas y oligotróficas propias del ambiente marino. Por tanto, son muchos los estudios que han pretendido optimizar los medios de cultivo con el fin de solventar o minimizar esta problemática modificando tanto su composición (fuente de carbono, aceptores de electrones o concentración de nutrientes, entre otros) como las condiciones de crecimiento (tamaño del inoculo, temperatura, pH, tiempo de incubación, entre otros) (Leal *et al.*, 2014). Tales optimizaciones han permitido aumentar de forma notable el porcentaje de microorganismos cultivables (Stewart, 2012). Sin embargo, para muchos microorganismos sigue siendo inviable su cultivo, debido en gran parte a la estrecha relación que establecen con su hospedador y el resto de la comunidad. Por tanto, como consecuencia de su contexto ecológico, se hace necesaria la interacción célula-célula, unos requerimientos nutricionales específicos y otras relaciones metabólicas no identificadas para poder obtener un cultivo óptimo (Osinga *et al.*, 2001). Es decir, aunque se consiguiera el crecimiento del

cultivo de simbioses simulando sus condiciones ambientales, cabría la posibilidad de que no se sintetizara el compuesto objetivo debido a la ausencia de las señales ambientales requeridas (Uria & Piel, 2009). A pesar de todo, algunos estudios han conseguido cultivar con éxito ciertos simbioses además de conseguir obtener los compuestos bioactivos de interés. Por ejemplo, Romano y colegas (2015) consiguieron con éxito el cultivo de *Pseudovibrio* de la cepa FO-BEG1, simbiote potencial de esponjas marinas. Se consiguió la producción del metabolito secundario TDA, un potente antibiótico, obtenido en los cultivos con baja concentración de fósforo, condición característica de muchas áreas del océano (Wu *et al.*, 2000; Thingstad *et al.*, 2005). También la aplicación de extractos de esponja en el cultivo de sus simbioses con el fin de ofrecer a los microorganismos un anfitrión artificial ha resultado ser beneficiosa (Shippers *et al.*, 2012). Un ejemplo exitoso de esta metodología de cultivo fue el estudio realizado por Keren y colegas (2016), donde se consiguió promover el crecimiento bacteriano de los numerosos cultivos de simbioses procedentes de *Theonella swinhoei* al incluir el esqueleto de la esponja hospedadora en el medio de cultivo. Los compuestos bioactivos producidos por estas bacterias no se pueden valorar ya que no fue el objetivo de estudio de esta última publicación.

Una alternativa que se ha aplicado al cultivo tradicional es el co-cultivo. Éste consiste en el cultivo simultáneo de dos o más especies de simbioses en un mismo lugar. Por medios de este método se ha tratado de simular la situación ecológica de coexistencia que se da en las comunidades microbianas complejas. De este modo se han conseguido resultados exitosos con simbioses anteriormente incultivables (Leal *et al.*, 2014). La competencia o antagonismo que experimentaron los simbioses durante los co-cultivos mejoró la producción de compuestos bioactivos, además de propiciar la aparición de metabolitos no detectados en cultivos axénicos (Marmann *et al.*, 2014). Un ejemplo exitoso de co-cultivo fue realizado por Shuai y colegas (2016) donde se cultivó el hongo simbiote *Aspergillus sp.* junto a *Bacillus subtilis*. La producción de compuestos bioactivos sintetizados por el hongo fue alta y diversa, obteniendo numerosos metabolitos no hallados en cultivos axénicos de esta especie. El co-cultivo también puede consistir en el cultivo simultáneo de células del porífero junto con algunos de sus simbioses. El cultivo de *primmorphs*, explicados en el apartado anterior, junto con ciertos simbioses de la esponja resultó ser prometedor. Se sintetizaron tanto metabolitos propios del porífero como de sus simbioses además de reducir considerablemente la contaminación del *primmorphs* por bacterias exógenas (Sipkema *et al.*, 2003).

Otro método de cultivo de simbioses con enorme potencial es el cultivo *in situ*. Para ello Ben-Dov y colegas (2009) utilizaron gotas de gel de agar (GMD) con una membrana polimérica polisulfónica. Esta doble capa es permeable a los nutrientes y señales ambientales, permitiendo así recrear de forma muy precisa las condiciones naturales de los simbioses en su hábitat natural. Por tanto, con este método resultó posible cultivar numerosos microorganismos anteriormente no cultivables. Sin embargo, no existe ninguna publicación de estudios donde se haya aplicado esta técnica en cultivo de simbioses propios de esponjas. En consecuencia, resultaría interesante aplicar esta técnica de cultivo en poríferos ya que parece ser que podría permitir aumentar considerablemente el número de simbioses cultivables y de este modo detectar nuevos compuestos bioactivos de interés.

En este campo es muy probable que en un futuro próximo siga habiendo un gran número de simbioses que resulten imposibles de cultivar debido a los requerimientos nutricionales, las complejas relaciones interespecíficas y la dificultad de recrear con exactitud las señales ambientales (Gomes *et al.*, 2016). Sin embargo, las alternativas al método tradicional de cultivo pueden permitir aumentar considerablemente el número de microorganismos de esponjas cultivables. En el co-cultivo se consiguen recrear en mayor o menor medida los rasgos propios de las comunidades, tales como la competencia, que pueden desencadenar la producción de ciertos metabolitos que no se sintetizarían en un cultivo tradicional. También el cultivo de simbioses *in situ* puede tener un gran potencial en este campo. Aunque no se ha aplicado en esponjas, si se halla la metodología apropiada, esta técnica permitiría al cultivo de microorganismos encontrarse en unas condiciones muy similares a las que se encuentran las poblaciones naturales y por tanto sería posible poder cultivar con éxito un mayor número de simbioses.

REFERENCIAS

- Abdo, D. A., Motti, C. A., Battershill, C. N., & Harvey, E. S. (2007). Temperature and spatiotemporal variability of salicylhalamide A in the sponge *Haliclona* sp. *Journal of Chemical Ecology*, 33(8), 1635-1645.
- Acosta, A. L., & Rodríguez, A. D. (1992). 11-Oxo-aerolithin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *Journal of natural products*, 55(7), 1007-1012.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Becerro, M. A., Turon, X., & Uriz, M. J. (1995). Natural variation of toxicity in encrusting sponge *Crambe crambe* (Schmidt) in relation to size and environment. *Journal of Chemical Ecology*, 21(12), 1931-1946.
- Becerro, M. A., Turon, X., & Uriz, M. J. (1997). Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *Journal of chemical ecology*, 23(6), 1527-1547.
- Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., & Kushmaro, A. (2009). An *in situ* method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS microbiology ecology*, 68(3), 363-371.
- Bergquist, P. R. (1978). Sponges University of California Press Berkeley. *CA Google Scholar*.
- Bergmann, W., & Feeney, R. J. (1951). Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *The Journal of Organic Chemistry*, 16(6), 981-987.
- Bergman, O., Mayzel, B., Anderson, M. A., Shpigel, M., Hill, R. T., & Ilan, M. (2011). Examination of marine-based cultivation of three demosponges for acquiring bioactive marine natural products. *Marine drugs*, 9(11), 2201-2219.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products. *Natural Product Reports*.
- Camalier, C. E., Young, M. R., Bobe, G., Perella, C. M., Colburn, N. H., & Beck, G. R. (2010). Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis. *Cancer prevention research*, 3(3), 359-370.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., & Markl, J. (1997). Biologie Spektrum Akademischer Verlag.
- Chapman, Arthur D. (2009). "Numbers of living species in Australia and the world.": 1-78.
- Ciminiello, P., Costantino, V., Fattorusso, E., Magno, S., Mangoni, A., & Pansini, M. (1994). Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis* forma fulva. *Journal of Natural Products*, 57(6), 705-712.
- Crawshaw, L. R. (1939). Studies in the market sponges I. Growth from the planted cutting. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 23(2), 553-574.
- Cruz, F., Quijano, L., Gómez-Garibay, F., & Rios, T. (1990). Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (Verongia) thiona*. *Journal of Natural Products*, 53(3), 543-548.
- De Goeij, J. M., van den Berg, H., van Oostveen, M. M., Epping, E. H., & Van Duyl, F. C. (2008). Major bulk dissolved organic carbon (DOC) removal by encrusting coral reef cavity sponges. *Marine Ecology Progress Series*, 357, 139-151.
- De Voogd, N. J. (2005). Indonesian sponges: biodiversity and mariculture potential. *Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED)*.
- De Voogd, N. J. (2007). The mariculture potential of the Indonesian reef-dwelling sponge *Callyspongia (Euplacella)* biru: growth, survival and bioactive compounds. *Aquaculture*, 262(1), 54-64.
- Delbeek, J. C., & Sprung, J. (1994). The reef aquarium. A comprehensive guide to the identification and care of tropical marine invertebrates (Volume 01). USA: Ricordea Publishing; ISBN 1 883693 12 8.
- Di Girolamo, J. A., Li, X. C., Jacob, M. R., Clark, A. M., & Ferreira, D. (2009). Reversal of fluconazole resistance by sulfated sterols from the marine sponge *Topsentia* sp. *Journal of natural products*, 72(8), 1524-1528.
- Duckworth, A. R. (2003). Effect of wound size on the growth and regeneration of two temperate subtidal sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 287(2), 139-153.

- Duckworth, A. R. (2009). Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: a review. *Marine Biotechnology*, 11(6), 669-679.
- Duckworth, A. R., & Battershill, C. N. (2003). Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, 217(1), 139-156.
- Duckworth, A. R., & Battershill, C. N. (2003). Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture*, 221(1), 311-329.
- Duckworth, A. R., Battershill, C. N., & Bergquist, P. (1997). Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture*, 156(3), 251-267.
- Duckworth, A. R., Battershill, C. N., & Schiel, D. R. (2004). Effects of depth and water flow on growth, survival and bioactivity of two temperate sponges cultured in different seasons. *Aquaculture*, 242(1), 237-250.
- Duckworth, A. R., & Peterson, B. J. (2013). Effects of seawater temperature and pH on the boring rates of the sponge *Cliona celata* in scallop shells. *Marine Biology*, 160(1), 27-35.
- Duckworth, A. R., & Pomponi, S. A. (2005). Relative importance of bacteria, microalgae and yeast for growth of the sponge *Halichondria melanadocia* (De Laubenfels, 1936): a laboratory study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323(2), 151-159.
- Duckworth, A. R., West, L., Vansach, T., Stubler, A., & Hardt, M. (2012). Effects of water temperature and pH on growth and metabolite biosynthesis of coral reef sponges. *Marine Ecology Progress Series*, 462, 67-77.
- Egami, Y., Wakimoto, T., & Abe, I. (2014). Phosphocalyculin C as a pyrophosphate protoxin of calyculin C in the marine sponge *Discodermia calyx*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(22), 5150-5153.
- Emsen, R. H. (1966). The reactions of the sponge *Cliona celata* to applied stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 18(4), 805-827.
- García Camacho, F., Chileh, T., García, M. C., Mirón, A. S., Belarbi, E. H., Chisti, Y., & Grima, E. M. (2006). A bioreaction–diffusion model for growth of marine sponge explants in bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(3), 525-532.
- Gallimore, W. A. (2013). Bioactive Brominated Metabolites from the Natural Habitat and Tank-Maintained Cuttings of the Jamaican Sponge *Aplysina fistularis*. *Chemistry & biodiversity*, 10(6), 1055-1060.
- Giannini, C., Debitus, C., Lucas, R., Ubeda, A., Payá, M., Hooper, J. N., & D'Auria, M. V. (2001). New sesquiterpene derivatives from the sponge *Dysidea* species with a selective inhibitor profile against human phospholipase A2 and other leukocyte functions. *Journal of natural products*, 64(5), 612-615.
- Gomes, N. G., Dasari, R., Chandra, S., Kiss, R., & Kornienko, A. (2016). Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. *Marine drugs*, 14(5), 98.
- Grasela, J. J., Pomponi, S. A., Rinkevich, B., & Grima, J. (2012). Efforts to develop a cultured sponge cell line: revisiting an intractable problem. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 48(1), 12-20.
- Hamada, Y., & Shioiri, T. (2005). Recent progress of the synthetic studies of biologically active marine cyclic peptides and depsipeptides. *Chemical reviews*, 105(12), 4441-4482.
- Hentschel, U., Usher, K. M., & Taylor, M. W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS microbiology ecology*, 55(2), 167-177.
- Hofrichter, R., & Sidri, M. (2001). ‘Ein Mittel für jeden Zweck: der Badeschwamm. *Das Mittelmeer Flora, Fauna, Ökologie, Hofrichter R, ed. Spektrum Verlag, Bd*, 608-809.
- Hogg, M. M., Tendal, O. S., Conway, K. W., Pomponi, S. A., Van Soest, R. W. M., Gutt, J., Krautter, M. & Roberts, J. M. (2010). Deep-seas Sponge grounds: reservoirs of biodiversity.
- Hooper, J. N., & Van Soest, R. W. (2002). Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. *Systema Porifera* (pp. 1-7). Springer US.
- Hooper, J. N., & Van Soest, R. W. (Eds.). (2012). Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. *Springer Science & Business Media*.
- Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S., & Rinkevich, B. (1996). Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *Journal of Marine Biotechnology*, 4, 145-149.

- Jones, W. C. (1994). Process-formation by aquarium-kept sponges and its relevance to sponge ecology and taxonomy. *Sponges in time and space*, Balkema Press, Rotterdam, 241-250.
- Keren, R., Lavy, A., & Ilan, M. (2016). Increasing the richness of culturable arsenic-tolerant bacteria from *Theonella swinhoei* by addition of sponge skeleton to the growth medium. *Microbial ecology*, 71(4), 873-886.
- Koopmans, M., Martens, D., & Wijffels, R. H. (2009). Towards commercial production of sponge medicines. *Marine drugs*, 7(4), 787-802.
- Koopmans, M., Martens, D., & Wijffels, R. H. (2010). Growth efficiency and carbon balance for the sponge *Haliclona oculata*. *Marine biotechnology*, 12(3), 340-349
- Krasagakis, K., Garbe, C., Krüger-Krasagakes, S., & Orfanos, C. E. (1993). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate not only modulates proliferation rates, but also alters antigen expression and LAK-cell susceptibility of normal human melanocytes in vitro. *Journal of investigative dermatology*, 100(5), 653-659.
- Krasko, A., Lorenz, B., Batel, R., Schröder, H. C., Müller, I. M., & Müller, W. E. (2000). Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *The FEBS Journal*, 267(15), 4878-4887.
- Lauckner, G. (1980). Diseases of Porifera. *Diseases of marine animals*, 1, 139-165.
- Leal, M. C., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, N. C., & Calado, R. (2012). Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting?. *PLoS One*, 7(1), e30580.
- Leal, M. C., Sheridan, C., Osinga, R., Dionísio, G., Rocha, R. J. M., Silva, B., Rosa R., & Calado, R. (2014). Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “supply problem” in the initial steps of drug discovery. *Marine drugs*, 12(7), 3929-3952.
- Lebouvier, N., Jullian, V., Desvignes, I., Maurel, S., Parenty, A., Dorin-Semlat, D., Doerig C., Sauvain M., & Laurent, D. (2009). Antiplasmodial activities of homogentisic acid derivative protein kinase inhibitors isolated from a Vanuatu marine sponge *Pseudoceratina sp.* *Marine drugs*, 7(4), 640-653.
- Leong, W., & Pawlik, J. R. (2010). Evidence of a resource trade-off between growth and chemical defenses among Caribbean coral reef sponges. *Marine Ecology Progress Series*, 406, 71-78.
- Macintyre, L., Zhang, T., Viegelmann, C., Martinez, I. J., Cheng, C., Dowdells, C., Usama R. A., Gernert, C., & Edrada-Ebel, R. (2014). Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts. *Marine drugs*, 12(6), 3416-3448.
- MacMillan, S. M., & Ladwig, J. (1996). Starting a successful commercial sponge aquaculture farm.
- Malve, H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 8(2), 83.
- Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation—A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*, 12(2), 1043-1065.
- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., & Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(1), 69.
- Moore, H. F. (1910). The commercial sponges and the sponge fisheries. *Bulletin of the Bureau of fisheries, volume XXVIII, 1908. Proceedings of the Fourth International fishery congress, Washington, 1908* (No. 667).
- Minale, L., Sodano, G., Chan, W. R., & Chen, A. M. (1972). Aeroplysinin-2, a dibromolactone from marine sponges *Aplysina (Verongia) aerophoba* and *Ianthella sp.* *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (11), 674-675.
- Mussino, F., Pozzolini, M., Valisano, L., Cerrano, C., Benatti, U., & Giovine, M. (2013). Primmorphs cryopreservation: a new method for long-time storage of sponge cells. *Marine biotechnology*, 15(3), 357-367.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of natural products*, 67(8), 1216-1238.
- Nickel, M., Leininger, S., Proll, G., & Brümmer, F. (2001). Comparative studies on two potential methods for the biotechnological production of sponge biomass. *Journal of biotechnology*, 92(2), 169-178.

- Nozeman, C. (1790). *Verhandeling over de inlandsche zoetwater-spongie, eene huisvesting der Maskers van puistenbijteren* (Vol. 1). by Dirk en Ary Vis.
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J. G., Hoffmann, F., Reitner, J., & Schumann-Kindel, G. (2001). Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 461(1-3), 55-62.
- Osinga, R., Kleijn, R., Groenendijk, E., Niesink, P., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2001). Development of in vivo sponge cultures: particle feeding by the tropical sponge *Pseudosuberites aff. andrewsi*. *Marine Biotechnology*, 3(6), 544-554.
- Osinga, R., Sidri, M., Cerig, E., Gokalp, S. Z., & Gokalp, M. (2010). Sponge aquaculture trials in the East-Mediterranean Sea: new approaches to earlier ideas. *The Open Marine Biology Journal*, 4, 74-81.
- Page, M. J., Handley, S. J., Northcote, P. T., Cairney, D., & Willan, R. C. (2011). Successes and pitfalls of the aquaculture of the sponge *Mycale hentscheli*. *Aquaculture*, 312(1), 52-61.
- Page, M. J., Northcote, P. T., Webb, V. L., Mackey, S., & Handley, S. J. (2005). Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Aquaculture*, 250(1), 256-269.
- Piel, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural product reports*, 21(4), 519-538.
- Pomponi, S. A. (2006). Biology of the Porifera: cell culture. *Canadian journal of zoology*, 84(2), 167-174.
- Pomponi, S. A. (2001). The Rogar Revelle Commemorative Lecture: The Oceans and Human Health: The Discovery and Development of Marine-Derived Drugs. *Oceanography*, 14(1), 78-87.
- Pozzolini, M., Mussino, F., Cerrano, C., Scarfi, S., & Giovine, M. (2014). Sponge cell cultivation: optimization of the model *Petrosia ficiformis* (Poiret 1789). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 454, 70-77.
- Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32(6), 639-655.
- Pronzato, R., & Manconi, R. (2008). Mediterranean commercial sponges: over 5000 years of natural history and cultural heritage. *Marine Ecology*, 29(2), 146-166.
- Romano, S., Schulz-Vogt, H. N., González, J. M., & Bondarev, V. (2015). Phosphate limitation induces drastic physiological changes, virulence-related gene expression, and secondary metabolite production in *Pseudovibrio sp.* strain FO-BEG1. *Applied and environmental microbiology*, 81(10), 3518-3528.
- Ruiz, C., Valderrama, K., Zea, S., & Castellanos, L. (2013). Mariculture and natural production of the antitumoural (+)-Discodermolide by the Caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Marine biotechnology*, 15(5), 571-583.
- Rützler, K., Macintyre, V. V., & Smith, K. T. (1990). New perspectives in sponge biology. In *International Conference on the Biology of Sponges 1985: Woods Hole, Mass.* Smithsonian Institution Press.
- Sankar, R. K., Chadha, N. K., Roy, S., Banerjee, P., Saharan, N., & Krishnan, P. (2016). Growth and survival of marine sponges, *Stylissa massa* (Carter, 1887) and *Liosina paradoxa* (Thiele, 1899) in sea and land based culture systems. *Indian J. Fish*, 63(4), 55-60.
- Sashidhara, K. V., White, K. N., & Crews, P. (2009). A Selective Account of Effective Paradigms and Significant Outcomes in the Discovery of Inspirational Marine Natural Products. *Journal of natural products*, 72(3), 588-603.
- Schiefenhövel, K., & Kunzmann, A. (2012). Sponge farming trials: survival, attachment, and growth of two Indo-Pacific sponges, *Neopetrosia sp.* and *Stylissa massa*. *Journal of Marine Biology*, 2012.
- Schippers, K. J. (2013). *Sponge cell culture*. Wageningen University.
- Schippers, K. J., Sipkema, D., Osinga, R., Smidt, H., Pomponi, S. A., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2012). Cultivation of Sponges, Sponge Cells and Symbionts: Achievements and Future Prospects. *Advances in marine biology*, 62, 273.
- Schmitz, F. J., Bowden, B. F., & Toth, S. I. (1993). Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. *Pharmaceutical and bioactive natural products* (pp. 197-308). Springer US.
- Sipkema, D., Franssen, M. C., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005a). Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7(3), 142-162.

- Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005b). Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: Sea, cell, or synthesis? *Biotechnology and Bioengineering*, 90(2), 201-222.
- Sipkema, D., Van Wielink, R., Van Lammeren, A. A. M., Tramper, J., Osinga, R., & Wijffels, R. H. (2003). Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *Journal of biotechnology*, 100(2), 127-139.
- Smith, F. G. (1941). Sponge disease in British Honduras, and its transmission by water currents. *Ecology*, 22(4), 415-421.
- Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*, 194(16), 4151-4160.
- Storr, J. F. (1957). The sponge industry of Florida. Marine Laboratory, University of Miami.
- Suna, H., Arai, M., Tsubotani, Y., Hayashi, A., Setiawan, A., & Kobayashi, M. (2009). Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(11), 3968-3972.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(2), 295-347.
- Thingstad, T. F., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Flaten, G. F., Groom, S., Herut, B., Kress, N., Law, C. S., Pasternak, A., Pitta, P., Psarra, S., Rassoulzadegan, F., Tanaka, T., Tselepides A., Wassmann, P., Woodward, E. M. S., Wexels Riser, C., Zodiatis, G., & Zohary, T. (2005). Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science*, 309(5737), 1068-1071.
- Thoms, C., Ebel, R., & Proksch, P. (2006). Activated chemical defense in *Aplysina sponges* revisited. *Journal of chemical ecology*, 32(1), 97-123.
- Umeyama, A., Matsuoka, N., Mine, R., Nakata, A., Arimoto, E., Matsui, M., Shoji N., Arihara S., Takei M., & Hashimoto, T. (2010). Polyacetylene diols with antiproliferative and driving Th1 polarization effects from the marine sponge *Callyspongia sp.* *Journal of natural medicines*, 64(1), 93.
- Uria, A., & Piel, J. (2009). Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochemistry reviews*, 8(2), 401-414.
- Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J. N. A.; Rützler, K.; de Voogd, N.J.; Alvarez de Glasby, B.; Hajdu, E.; Pisera, A.B.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L.; Rios Lopez, P. (2017). World Porifera database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2017-07-01.
- Voultsiadou, E. (2007). Sponges: an historical survey of their knowledge in Greek antiquity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(6), 1757-1763.
- Walker, R. P., Thompson, J. E., & Faulkner, D. J. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. *Marine Biology*, 88(1), 27-32.
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345(6270), 63-65.
- Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter, M., Kirchner, M., & Proksch, P. (1996). Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(1), 19-712.
- Wilkinson, C. R., & Cheshire, A. C. (1988). Growth rate of Jamaican coral reef sponges after Hurricane Allen. *The Biological Bulletin*, 175(1), 175-179.
- Wilkinson, C. R., & Vacelet, J. (1979). Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 37(1), 91-104.
- Wilson, H. V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 5(2), 245-258.
- Wu, J., Sunda, W., Boyle, E. A., & Karl, D. M. (2000). Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science*, 289(5480), 759-762.
- Zhang, H., Khalil, Z., Conte, M. M., Plisson, F., & Capon, R. J. (2012). A search for kinase inhibitors and antibacterial agents: bromopyrrolo-2-aminoimidazoles from a deep-water Great Australian Bight sponge, *Axinella sp.* *Tetrahedron Letters*, 53(29), 3784-3787.