

RÁPIDA CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA DE LOS PRODUCTOS DE CULTIVO DE 14 BACTERIAS DEL *PHYLUM* FIRMICUTES SIMBIONTES DEL OCTOCORAL *PSEUDOPTEROGORGIA ELISABETHAE* DE LA ISLA DE PROVIDENCIA (CARIBE SUR-OCCIDENTAL)

Hebelin Correa¹, Fabrice Berru², Brad Haltli², Carmenza Duque^{1,*}, Russell Kerr^{2,3*}

Resumen

Correa H., F. Berru², B. Haltli, C. Duque, R. Kerr: Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la isla de Providencia (Caribe Sur-occidental). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 337-348, 2011. ISSN 0370-3908.

El presente trabajo, describe el desarrollo de una estrategia metodológica para acelerar y simplificar la detección e identificación de los compuestos producidos en cuatro medios de cultivo diferentes, por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la Isla de Providencia, Caribe Sur-Occidental. El proceso involucró la miniaturización de los cultivos bacterianos, la extracción en fase sólida de los productos usando la resina Diaion™ HP-20, el análisis por UPLC-MS de los mismos y finalmente la generación de una librería que permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar 46 compuestos producidos por el total de las bacterias y la posterior identificación de 10 de ellos, haciendo uso de la base de datos Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación de las sustancias detectadas.

Palabras clave: librería de productos producidos por bacterias del *phylum* Firmicutes; *screening* químico de productos de cultivo de bacterias del *phylum* Firmicutes; Bacterias asociadas con *Pseudopterogorgia elisabethae*; UPLC-MS; Identificación por Antibase 2007™.

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Cra 30 # 45-03, Bogotá D.C, Colombia.

² Department of Chemistry, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

³ Department of Biomedical Sciences, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

* E-mails: rkerr@upei.ca (R.K.); cduqueb@unal.edu.co (C.D.)

Abstract

This paper describes a convenient strategy to accelerate and simplify the detection and identification of compounds produced in four different culture media, by 14 bacteria of the *phylum* Firmicutes, symbionts of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island, South-West Caribbean. The process involved: bacterial culture miniaturization, solid phase extraction of the products using the resin Diaion™ HP-20, the analysis by UPLC-MS of the products and finally the generation of the library, that allows to discard culture media components detecting 46 compounds produced by all bacteria and the subsequent identification of 10 of them, using the database Antibase 2007™ as a tool for dereplication of these substances.

Key words: library of the products produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; chemical screening of compounds produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; *Pseudopterogorgia elisabethae*-associated bacteria; UPLC-MS; Identification by Antibase 2007™.

Introducción

Desde el descubrimiento de la penicilina y su producción a gran escala durante la segunda guerra mundial, los microorganismos han sido objeto de múltiples estudios motivados por la gran variedad de compuestos y medicamentos que son producidos a partir de ellos (Berdy, 2005). Específicamente, para el caso de los microorganismos marinos, a pesar de que fueron inicialmente detectados en simbiosis con invertebrados desde hace muchos años, no fue sino hasta la década de los ochenta cuando el número de publicaciones de productos naturales a partir de ellos aumentó vertiginosamente, hasta el punto de igualar el número de compuestos publicados por año, al de los aislados a partir de cnidarios (Blunt *et al.* 2009), convirtiéndose además en una fuente renovable de sustancias con estructura química novedosa, sin contraparte con los reportados para otros organismos marinos o terrestres, y con un alto potencial biomédico e industrial (Blunt *et al.* 2011; Newman y Hill 2006; Piel, 2006).

Generalmente, los microorganismos marinos pueden encontrarse en forma libre o en organizaciones simbióticas con invertebrados, desarrollando adaptaciones más especializadas, estables, y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Egan *et al.* 2008), allí son en gran parte los responsables del ciclo de nutrientes, así como también de la producción de moléculas bioactivas, las cuales pueden estar involucradas en la prevención de la depredación y colonización del holobionte por otros microorganismos y macroorganismos (Mydlarz *et al.* 2010; Mouchka *et al.* 2010).

Actualmente, el estudio de obtención de compuestos naturales a partir microorganismos comprende inicialmente su cultivo en lo posible en diferentes condiciones, seguido de la extracción y fraccionamiento de los compuestos

producidos, su identificación y posterior conservación tanto de mezclas como de los compuestos puros en librerías (Penesyan *et al.* 2010), las cuales son mucho más diversas en cuanto a la clase de compuestos presentes en ellas (posibles nuevos compuestos, diferentes tipos de esqueleto de carbono y diferente estereoquímica), en comparación a las librerías existentes de compuestos sintéticos (Ito *et al.* 2011). Sin embargo, con el fin de evitar el largo proceso de aislamiento e identificación de compuestos con estructuras nuevas o conocidas y con actividad biológica, que se presenta como uno de los principales retos a enfrentar por parte de los científicos de productos naturales, se prefiere utilizar la combinación cultivos microbianos miniaturizados con técnicas de análisis como UPLC-MS (Cromatografía líquida de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas) para la construcción de dichas librerías, como un procedimiento de derreplicación mucho más rápido y conveniente que solo hasta ahora se está empezando a usar para la identificación temprana de fuentes alternas de compuestos nuevos o conocidos con actividad biológica (Berrue *et al.* 2011). Sin embargo, es importante anotar que la investigación tradicional partiendo del escalamiento del cultivo, seguido de extracción, aislamiento por métodos cromatográficos convencionales y determinación estructural por los métodos espectroscópicos usuales, sigue siendo el único método para la identificación inequívoca de las sustancias producidas por microorganismos.

Por otro lado, en el estudio de microorganismos marinos simbióticos, la cercana asociación metabólica entre los microorganismos y su hospedero hace difícil revelar cuál es el organismo u organismos responsables de la producción de un determinado metabolito, en algunos casos se ha demostrado que muchos de los productos bioactivos, atribuidos previamente a los invertebrados, son producidos

dos por sus microorganismos asociados (Flatt *et al.* 2005; Ridley *et al.* 2005; Hildebrand *et al.* 2004). Por ejemplo en el caso del briozoo *Bugula neritina* productor del macrólido briostatina, potente agente anticáncer comercial, se ha establecido que es en realidad su bacteria simbionte *Endobugula serluta* quien produce el metabolito bioactivo (Sudek *et al.* 2007). Otro ejemplo es Yondelis® un medicamento antitumoral, descubierto en el tunicado colonial *Ecteinascidia turbinata*, el cual es actualmente sintetizado a partir del precursor biosintético la ciano-safracina B producida por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Mayer *et al.* 2010). También vale la pena mencionar el aislamiento de la kahalalida F, un agente anticáncer muy próximo a ser aprobado como droga comercial, a partir del cultivo de la bacteria *Vibrio* sp., este compuesto inicialmente fue aislado del molusco *Elysia rufescens* (Hill *et al.* 2007).

En el caso del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, el cual ha sido fuente de más de 100 compuestos diferentes con estructura química novedosa y con diversas actividades biológicas (Marrero *et al.* 2010; Heckrodt y Mulzer, 2005) y particularmente el recolectado por nosotros en la Isla de Providencia (Caribe Colombiano, Sur-Occidental), del cual aislamos los compuestos PsP-V, PsG, PsK, seco-PsJ y seco-PsK (Duque *et al.* 2004, 2006) con actividades antiinflamatoria, citotóxica y antimicrobiana promisorias (Correa *et al.* 2009, 2011a), éstos no han podido continuar en fases posteriores de bioprospección para su implementación como drogas, debido a problemas de suministro, convirtiéndose éste en la mayor limitación para su posible aplicación en la industria farmacéutica y cosmética (Mayer *et al.* 2010; Newman y Hill, 2006). Por esta razón el estudio de sus microsimbiontes como posible fuente de los compuestos bioactivos mencionados resulta ser una tarea inaplazable.

Así, el presente trabajo describe el desarrollo de una estrategia o aproximación metodológica para acelerar y simplificar la identificación de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiontes del octocoral *P. elisabethae*, previamente caracterizadas morfológica y filogenéticamente usando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA (Correa *et al.* 2011b), generando una librería de los compuestos producidos por dichas bacterias cultivadas en cuatro medios diferentes. Este trabajo involucró varias etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado de las bacterias en placas multipozos de 5 ml b) extracción de los compuestos producidos en los cultivos c) *screening*-químico rápido de los extractos que contiene los compuestos producidos por las bacterias por UPLC-MS y d) análisis posterior por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™.

Parte experimental

Recolección de *P. elisabethae*

Fragmentos del octocoral *P. elisabethae* fueron recolectados en la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental, Colombiano) mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 20 y 30 m en mayo de 2008 e identificados por la profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Especímenes de referencia codificados como INV CNI 1612-1616, se encuentran en la colección de invertebrados del Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR).

Bacterias simbiontes de *P. elisabethae*

Del cnidario mencionado se aislaron las bacterias simbiontes cultivables, por técnicas tradicionales de cultivo y se identificaron morfológica y filogenéticamente estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA de acuerdo a la metodología descrita por Correa *et al.* 2011b. De las 40 bacterias simbiontes aisladas, 14 bacterias del *phylum* Firmicutes pertenecientes a las familias Bacillaceae: *Bacillus firmus* (RKHC-13), *Bacillus horneckiae* (RKHC-68A), *Bacillus licheniformis* (RKHC-21), *Bacillus mojavensis* (RKHC-37), *Bacillus pumilus* (RKHC-57A), *Bacillus anthracis* (RKHC-13), *Bacillus cereus* (RKHC-9) *Oceanobacillus profundis* (RKHC-62B) y *Oceanobacillus iheyensis* (RKHC-82A); Paenibacillaceae: *Paenibacillus glucanolyticus* (RKHC-8); y Staphylococcaceae: *Staphylococcus epidermidis* (RKHC-78A), *Staphylococcus warneri* (RKHC-78B), *Staphylococcus equorum* (RKHC-54) y *Staphylococcus auricularis* (RKHC-48), fueron utilizadas en este trabajo. Estas bacterias hacen parte de la colección de referencia codificada como RKHC (Código interno), disponible en el laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, cuya clasificación y números de acceso en el GenBank (JQ282814-JQ282828) están reportadas en Correa *et al.* 2011b. Las bacterias fueron cultivadas en medio marino (Difco 2216) semisólido y en medio marino (Difco 2216) /glicerol (1:1) y conservadas a 4°C y a -80°C, respectivamente.

Preinóculo

Cada una de las bacterias arriba mencionadas fueron cultivadas en placas de agar sólido marino (Difco 2216) por un tiempo no mayor a 48 h, luego fueron utilizadas para realizar su correspondiente inóculo en 10 ml de medio (Difco 2216) y posteriormente incubadas en condiciones aeróbicas por un período de 48 h, a 200 rpm y a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, el preinóculo de

cada bacteria sirvió como medio de alimentación para los posteriores cultivos.

Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron seleccionados de acuerdo a la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato, además de la concentración de los mismos, con el fin de estimular la producción de metabolitos secundarios, éstos fueron caldo marino (**MB**: Peptona 5,0 g/l, Extracto de levadura 1,0 g/l, Citrato férrico 0,1 g/l, NaCl 19,45 g/l, MgCl₂ 5,9 g/l, MgSO₄ 3,24 g/l, CaCl₂ 1,8 g/l, KCl 0,55 g/l, NaHCO₃ 0,16 g/l, KBr 0,08 g/l, SrCl₂ 0,034 g/l, Ácido bórico 0,022 g/l, Silicato de sodio 0,004 g/l, NaF 0,0024 g/l, NH₄NO₃ 0,0016 g/l, Na₂HPO₄ 0,008 g/l), caldo marino mínimo (**MMB**: Glutamato de sodio 2,0 g/l, NaCl 20,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 7,0 g/l, MgCl₂ 5,3 g/l, CaCl₂ 1,25 g/l, K₂HPO₄ 0,075 g/l, FeSO₄ 0,025 g/l, CuSO₄ 0,005 g/l, y Tris 6,1 g/l), caldo Takashi (**TAK**: Almidón 30,0 g/l, Dextrosa 5,0 g/l, Peptona 10,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l, Na₂HPO₄·12H₂O 0,5 g/l, y KH₂PO₄ 0,2 g/l) y caldo nutritivo dilución a diez (**NB/10**: Peptona 0,5 g/l y Extracto de carne 0,3 g/l). Todos los medios fueron preparados con agua desionizada y esterilizados junto con la resina Diaion™ HP-20.

Todos los cultivos se realizaron en presencia de la resina Diaion™ HP-20, la cual fue previamente activada con MeOH grado HPLC (1/2 p/v), durante un período de 4 h, a 300 rpm a temperatura ambiente, paso seguido la resina fue filtrada y lavada tres veces con agua Milli Q. Finalmente, la resina fue filtrada y agregada a los caldos de cultivo previo a su posterior esterilización.

El cultivo de las 14 bacterias se realizó en placas de poliestireno de 24 pozos de 10 ml. Doscientos cincuenta microlitros del preinóculo fueron puestos por triplicado en cada uno de los cuatro medios de cultivo empleados, paso seguido a la inoculación, las placas fueron cubiertas con una membrana transpirable estéril adhesiva de nylon, e incubadas aeróbicamente durante 96 h (**MB** y **TAK**) ó 144 h (**MMB** y **NB/10**), a 200 rpm y a 30°C. En todos los casos el volumen total de cultivo fue de 5 ml y en presencia de la resina Diaion™ HP-20 a una concentración final de 10% p/v. En todos los casos se empleó un blanco correspondiente a los medios de cultivo sin inocular, el cual sirvió como control de crecimiento y de posibles componentes del medio retenidos en la resina.

Extracción

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se dejaron decantar con el fin de eliminar con ayuda de una micropipeta, la mayor cantidad de caldo de cultivo

y biomasa sobrenadante, posteriormente la resina Diaion™ HP-20 fue lavada tres veces con 5 ml de agua estéril desionizada, agitando las placas de cultivo a 200 rpm a temperatura ambiente por un período mínimo de 2 h entre cada lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y de medio retenidos en la resina. Paso seguido se realizó la extracción por duplicado con 5 ml de alcohol grado histológico (AcOEt/EtOH/MeOH 5:90:5). Para la primera extracción se dejó la resina en contacto con el solvente por un período de 3 h y la segunda durante la noche. Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas a presión reducida y pesadas con el fin de determinar la cantidad de extracto obtenido para cada cultivo.

Análisis por UPLC-MS

A partir del extracto crudo de cada uno de los cultivos, se prepararon diluciones de las muestras en el rango de 1-5 mg/ml con MeOH grado HPLC, para el análisis en UPLC-MS en placas de 96 pozos de 2 ml. En todos los casos se analizaron en las mismas condiciones los extractos crudos de los medios de cultivo sin inocular y un blanco de solvente (MeOH grado HPLC).

La cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se realizó en un cromatógrafo Thermo Scientific Accela equipado con un automuestreador Accela que permite el análisis de muestras contenidas en placas de 96 pozos. Como detectores se emplearon el detector Accela PDA (Photodiode Array) monitoreando en un rango de longitudes de onda entre 200-600 nm, el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), Sedere, Sedex LT-ELSD Modelo 80LT a una temperatura de 35°C, y finalmente un MS (Mass Spectrometer), espectrómetro de masas lineal de trampa de iones Thermo Scientific LTQ en modo de ionización química a presión atmosférica (APCI), utilizando como gas nebulizador nitrógeno. Se detectaron iones positivos con masas entre 50 y 2000 u. La columna cromatográfica empleada fue una ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm. Se inyectaron en todos los casos 20 µl de muestra, utilizando como fase móvil un gradiente discontinuo de polaridad con MeOH modificado con ácido fórmico al 0.1% (SOL 1) y agua modificada con ácido fórmico al 0.1% (SOL 2). Se empleó el siguiente programa: tiempo 0.0 min, SOL 1/SOL 2 5:95; flujo 500 µl/min; 1.20 min, SOL 1/SOL 2 95:5, 500 µl/min; 5.00 min, SOL 1 100%, 500 µl/min; 5.20 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.50 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.70 min, SOL 1 100%, 600 µl/min; 8.90 min, SOL 1/SOL 2 5:95, 900 µl/min; 9.00 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min y 10 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min.

Análisis de los cromatogramas

Una vez que todas las muestras (extractos de las 14 bacterias en 4 medios diferentes por triplicado, junto con los controles de medios y de MeOH. Total: 192 inyecciones) fueron analizadas por UPLC-MS, se procedió a buscar en cada uno de los cromatogramas sustancias que presentaran señal tanto en el ELSD como en el detector de masas, registrando su tiempo de retención junto con el ion $[M+H]^+$ del espectro de masas, y anotando en cada caso si el compuesto era también visible en el detector PDA, debido a grupos cromóforos en su estructura. En total se lograron identificar 593 señales distintas en los cromatogramas para todo el conjunto de inyecciones, éstas sirvieron para generar el primer insumo de la base de datos aquí reportada haciendo uso del software Xcalibur™, del equipo de UPLC-MS, el cual realiza la búsqueda simultánea de determinada sustancia con un tiempo de retención y una masa establecida, en todos los cromatogramas, y genera una gráfica en tres dimensiones, donde se relaciona, la muestra (bacterias, medios sin inocular y metanol) vs. medios de cultivo, vs. el área bajo la curva. El haber realizado el cultivo de cada bacteria por triplicado, sirvió para descartar posibles falsos positivos. El análisis de las gráficas permitió establecer cuáles de las 593 señales corresponden a ruido en el equipo (presente en todos los cromatogramas), a contaminación de la columna (presente en los cromatogramas del MeOH) y a componentes del medio remanentes en la resina HP-20 (presente en los cromatogramas del medio). Así, se logró determinar que de las 593 señales, tan solo 46 correspondían a verdaderos productos naturales producidos por las bacterias de manera selectiva. Paso seguido se verificó para cada una de las 46 señales que el ión inicialmente observado correspondía realmente al ión $[M+H]^+$.

Aunque el proceso de selección del ión molecular no es fácil, éste se hizo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones (Ardrey, 2003): i) la técnica de ionización fue APCI y ésta favorece la formación de especies moleculares con muy poca fragmentación, ii) Se añadió a la fase móvil el modificador ácido fórmico, el cual ayuda a la protonación de las especies moleculares, favoreciendo la formación de iones $[M+H]^+$ intensos, iii) Luego de seleccionar alguno de los iones presentes en el espectro como ión molecular, se buscaron iones correspondientes a pérdidas lógicas o a iones aductos lógicos, entre ellos $[M+H+Na]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H+K]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na+K]^+$, $[M+H+CH_3OH]^+$, $[M+Na+CH_3OH]^+$, $[M+HCOOH]^+$, típicos en este tipo de análisis, iv) Se buscó la ayuda del software Xcalibur™ con la opción de hacer la reconstrucción de los cromatogramas de cada uno de los iones que no coincidie-

ran con pérdidas o aductos lógicos a partir del ión molecular seleccionado (RICs, por sus siglas en inglés de Reconstructed ion chromatograms), para descartar si eran productos del ruido de fondo, v) Se verificó que las pérdidas lógicas encontradas en el espectro de masas fueran congruentes con los iones de fragmentación encontrados en los espectros hijos del ión seleccionado como $[M+H]^+$. Si bien este análisis se hizo con la mayor rigurosidad, es importante aclarar que el ion seleccionado como $[M+H]^+$, mostrado en la Tabla 1, es solo aquel que mayor probabilidad tiene de serlo.

Análisis por derreplicación usando Antibase 2007™

Para los 46 productos naturales detectados se realizó una búsqueda en la base de Datos Antibase 2007™ (contiene información espectroscópica de los diferentes compuestos aislados a partir de algas, microorganismos y hongos mayores incluyendo levaduras, ascomicetos, basidomicetos, y líquenes) de sustancias reportadas en la literatura con igual $[M+H]^+$, estableciendo en cada caso cuantos de esas reportes vienen de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*.

Resultados y análisis de resultados

La detección e identificación rápida (*screening* químico) de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae* se realizó utilizando una estrategia metodológica que involucra las siguientes etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado en placas de 24 pozos con un volumen de 5 ml b) extracción en fase sólida de los compuestos producidos en los cultivos c) Análisis por UPLC-MS de los extractos obtenidos en el paso b y d) Análisis por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™. Con esta información se construyó una librería que consta de los productos de cultivo del conjunto de bacterias estudiadas en cuatro medios diferentes y la posterior identificación por derreplicación de algunas de las sustancias previamente reportadas, así como también una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias presentes en la librería.

Cultivo miniaturizado de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes y extracción de los productos

La realización de 180 cultivos miniatura en paralelo (volumen de 5 ml en placas de 24 pozos) de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, en cuatro medios diferentes por triplicado además del blan-

co de cultivo (medio sin inocular), permitió reducir significativamente el tiempo, gasto de reactivos y ahorro de esfuerzo. Adicionalmente, con el fin de maximizar la cantidad de sustancias adsorbidas una vez liberadas por las bacterias al medio, los cultivos se llevaron a cabo en presencia de la resina Diaion™ HP-20, un adsorbente poliaromático selectivo para compuestos hidrofóbicos (Li y Chase, 2010), que además los separa de las sales presentes en el medio; su principal ventaja frente a otras resinas es su gran área superficial (~500 m²/g) lo que le confiere una mayor capacidad de adsorción. Los rendimientos de extracción variaron dependiendo del medio de cultivo empleado, así para medios ricos en nutrientes, MB y TAK se obtuvieron rangos de cantidad de extracto entre 3-10 mg y 5-15 mg respectivamente, mientras que para los cultivos en medios bajos en nutrientes, NB/10 y MMB los rangos estuvieron entre 0-1 mg y 1-2 mg respectivamente.

En la fase del cultivo se manejó como única variable la composición del medio, usando dos ricos en nutrientes (MB y TAK) y dos bajos en nutrientes (MMB y NB/10) y se mantuvieron constantes factores tales como la temperatura y aireación (agitación). Es importante anotar que en nuestro diseño experimental, la selección del tiempo de incubación estuvo más encaminada a garantizar que el tiempo empleado fuera el necesario para que las bacterias llegaran a su fase exponencial de crecimiento (mayor rendimiento de productos), particularmente en los medios bajos de nutrientes (MMB y NB/10) donde se necesitó un mayor tiempo de incubación.

La extracción en fase sólida utilizada en esta aproximación metodológica permitió mayores rendimientos y menores costos en el proceso total, debido a que los compuestos de interés fueron retenidos selectivamente en la resina. Al comparar esta metodología con la que utiliza extracción con solventes se evidencia que en esta última son necesarios pasos adicionales para eliminar impurezas tales como sales y componentes del medio de cultivo.

Análisis de los compuestos presentes en los extractos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes usando UPLC-MS e identificación por derreplicación usando Antibase 2007™

El análisis químico simultáneo a partir de extractos crudos de un número elevado de muestras sólo recientemente ha sido posible con el advenimiento de la tecnología UPLC-MS que permite el análisis de un gran número de muestras en un período corto, al tiempo que la sensibilidad y resolución de la técnica ha aumentado (Toyo'oka, 2008; Yao *et al.* 2010). Si bien, el proceso de preparación de medios, preinóculo y cultivo *per se*, implican varios días de traba-

jo, la inyección de las muestras y el análisis de los datos obtenidos por UPLC-MS es el paso crucial de esta metodología aunque su tiempo de análisis sea menor. Por ejemplo en este trabajo se pudo analizar por UPLC-MS una placa de 96 pozos en menos de un día empleando aproximadamente 10 min por muestra en el instrumento, esta rápida detección química de los productos de cultivo de las bacterias es uno de los mayores aportes realizados con este diseño experimental.

Una vez todos los cultivos fueron extraídos, los extractos fueron dispuestos en las placas de 96 pozos a una concentración entre 1-5 mg/ml usando como disolvente MeOH grado HPLC, a un volumen final de 1 ml y analizados por UPLC-MS, en una micro columna de alta resolución en fase reversa. Las separaciones fueron monitoreadas con dos detectores universales: ELSD y MS y un detector específico PDA para sustancias con grupos cromóforos en el rango de 200-600 nm. En total se analizaron 192 muestras (168 extractos de los cultivos de las 14 bacterias en cuatro medios por triplicado más 12 extractos de los controles de los cuatro medios por triplicado y 12 blancos de solvente), un ejemplo particular de estos resultados se muestra en la Figura 1.

La Figura 1 muestra el análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. Para claridad de presentación de resultados la Figura 1 está dividida en cinco secciones: **1A**: muestra el perfil cromatográfico del extracto de los productos de cultivo monitoreado por los tres detectores empleados PDA, ELSD y MS. **1B** y **1C**: Muestran los espectros de masas en modo APCI de los compuestos con tiempo de retención 4.37 min y 5.24 min, con [M+H]⁺ en *m/z* 491.2 y 373.3, respectivamente. Finalmente en **1D** y **1E**: muestran las gráficas generadas por Xcalibur™ para estos dos compuestos, mostrando en el eje X los medios utilizados MB, TAK, MMB y NB/10 por triplicado, en el eje Y las 14 bacterias cultivadas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente y en el eje Z el área bajo la curva de la señal de la sustancia estudiada.

Cada una de las 192 muestras fue estudiada en búsqueda de los productos de cultivo de las bacterias, en la manera descrita anteriormente. Así, se pudieron detectar 593 compuestos en total, sin embargo, para verificar que éstos correspondían realmente a sustancias producidas selectivamente por las bacterias, se generó la librería de los compuestos producidos por las bacterias del *phylum* Firmicutes a través del software Xcalibur™, teniendo en cuenta el tiempo de retención y el ión [M+H]⁺ de cada uno de los compuestos detectados. Una vez generada dicha librería,

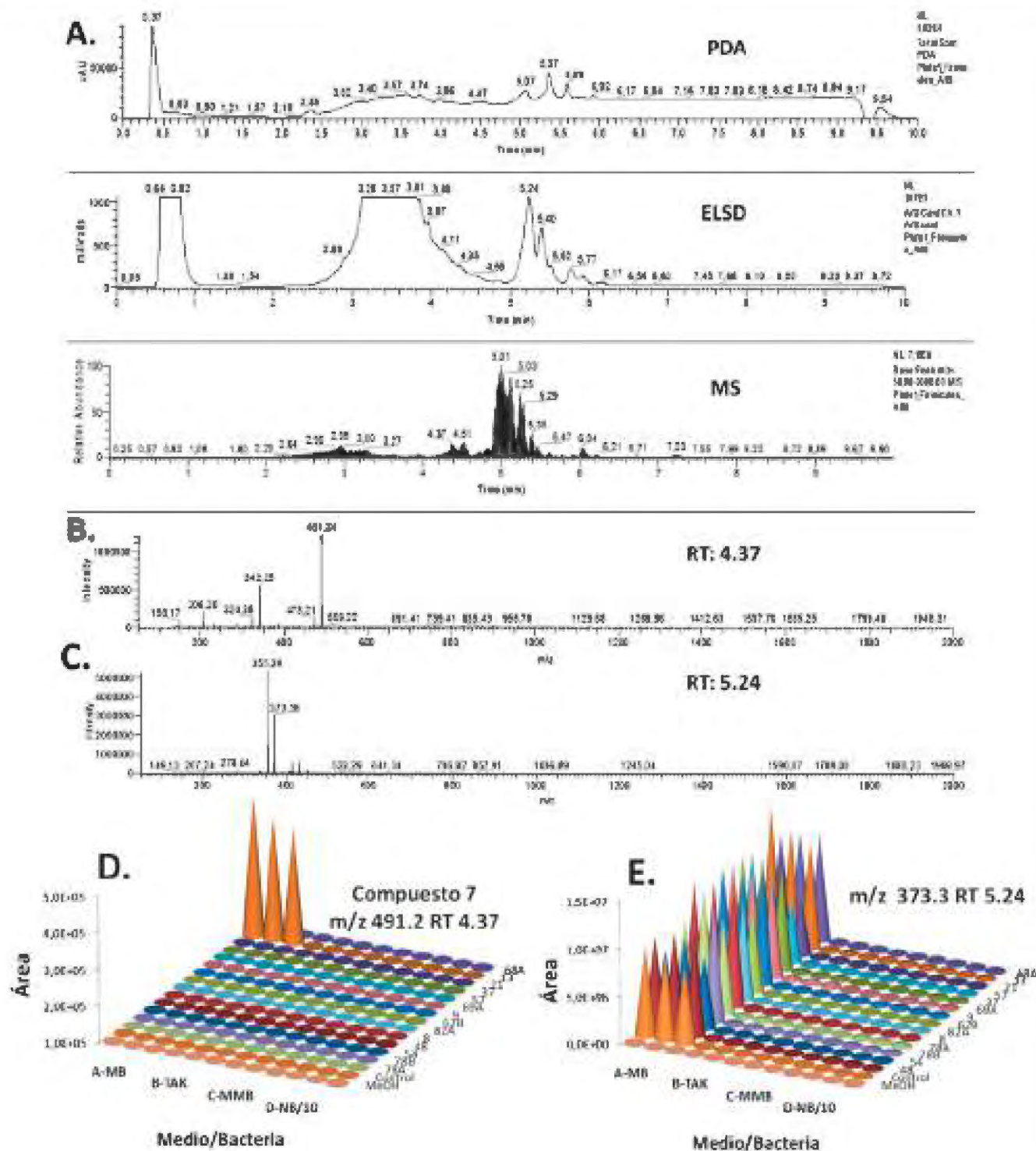


Figura 1. Análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. **1A:** Perfil cromatográfico (detectores PDA, ELSD y MS) de los productos de cultivo. **1B.** Espectro de masas en modo APCI del compuesto 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2. **1C.** Espectro de masas en modo APCI del compuesto con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. **1D.** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2. **1E.** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

el software es capaz de buscar en todos los cromatogramas la presencia de cada señal a través de la detección del ion $[M+H]^+$ con un tiempo de retención determinado, de manera cuantitativa a través de la medición del área bajo la curva de la señal en los cromatogramas, permitiendo al usuario visualizar de manera sencilla que bacteria y en qué condiciones son producidos cada uno de los 593 compuestos.

La Figura 1D muestra cómo la sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con $[M+H]^+$ en m/z 491.2 es producida únicamente por la bacteria *B. firmus* (RKHC-13) en medio MB, mientras que la sustancia con tiempo de retención 5.24 min con $[M+H]^+$ en m/z 373.3 (Figura 1E) fue detectada en todos los extractos de todos los cultivos en MB de las 14 bacterias así como también en el extracto del control del medio, pero no en los blancos de solvente ni en los extractos de los cultivos realizados en otros medios, indicando que esta sustancia corresponde a un componente del medio MB.

Al analizar cada una de las 593 gráficas generadas por el software Xcalibur™, se logró determinar cuáles sustancias corresponden a componentes del medio (gráficas similares a la Figura 1E) y cuales corresponden a sustancias producidas selectivamente por las bacterias (gráficas similares a la Figura 1D) logrando detectar en total 46 diferentes productos naturales.

La Tabla 1 muestra la librería de compuestos detectados como productos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes aisladas del octocoral *P. elisabethae*, mostrando en cada caso, su tiempo de retención, el ión $[M+H]^+$, la bacteria o bacterias que producen dicho compuesto y el medio o medios en que fue producido. Adicionalmente, para cada una de las sustancias detectadas se realizó la búsqueda de su ión $[M+H]^+$ en la base de datos Antibase™ 2007, suministrando para cada sustancia el número total de compuestos reportados en la literatura y el número de compuestos reportados para los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con igual ión $[M+H]^+$, sin considerar el tiempo de retención como criterio de acotamiento. Es importante aclarar que la búsqueda se puede realizar con otros iones pseudomoleculares o aductos tales como $[M-H]^-$ y $[M+Na]^+$ de los compuestos de origen microbiano.

Para la mayoría de las sustancias presentes en la librería existen más de 10 compuestos en total reportados con el mismo ión $[M+H]^+$, por esta razón llegar a aseverar cuál de esos compuestos corresponde a cada una de las sustancias detectadas con la información hasta este punto es una tarea imposible. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos de bacterias del mismo género y revisando la bi-

bliografía se puede llegar a una primera aproximación acerca de la estructura de la sustancia o del tipo de sustancia detectada. Un ejemplo, es el caso de la sustancia 5 detectada como producto en los cultivos de las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en MB, TAK y NB/10, que presenta un ión $[M+H]^+$ en m/z 425.3, para la cual hay reportados en total 99 compuestos, pero de ellos solo 2 han sido aislados a partir de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y específicamente uno de ellos la amicoumacina B (Figura 2) fue aislada previamente del cultivo en MB de la cepa *B. pumilus* (SP21), encontrada en sedimentos recolectados en Las Bahamas (Berrue *et al.* 2009). De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que la sustancia 5 fue detectada en nuestra cepa *B. pumillus* (RKHC-57) podríamos sugerir que ésta corresponde a la amicoumacina B.

De esta manera sugerimos la estructura para 10 de los 46 compuestos (Figura 2) encontrados en nuestra librería, no obstante vale la pena aclarar que hasta no realizar la comparación con patrones de referencia, y el escalamiento y posterior aislamiento e identificación de dichas sustancias no se llegará a la identificación inequívoca de las mismas. Trabajos en esta dirección están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio. Sin embargo, esta primera aproximación se convierte en una ventaja ingente en la identificación preliminar del tipo de sustancias que son producidas por cada una de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes estudiadas y qué medios de cultivo favorecen la producción de las mismas.

Otra ventaja de construir este tipo de librerías, es conocer bajo qué condiciones son producidas las sustancias presentes en ella. Un par de ejemplos se presentan en la Figura 3. El primero se refiere a la producción del compuesto 16 con tiempo de retención de 5.74 min con un ion $[M+H]^+$ en m/z 853.4, el cual es producido únicamente por la bacteria *B. pumillus* (RKHC-57) en los medios MB, TAK y NB/10, siendo mayor su producción en medio MB y NB/10 (Figura 3A). Al parecer, la producción de este metabolito no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio, debido a que fue producido en un medio con baja concentración de nutrientes como NB/10, por el contrario su producción si dependerá de que tan fácilmente sean digeridas sus fuente de carbono, en este caso los medios MB y NB/10 utilizan extracto de levadura y de carne respectivamente, mientras que TAK utiliza como fuente de carbono almidón soluble el cual es poco digerible. Adicionalmente, la adición de peptona es un factor crucial en la producción de la sustancia 16, debido a que ésta no fue detectada en el medio MMB que no contiene peptona (Figura 3A).

Tabla 1. Librería de compuestos detectados como productos de cultivo en los medios MB, TAK, MMB y NB/10 de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

Compuesto Nº	[M+H] ⁺ m/z	RT	<i>Bacillus</i>						<i>Oceanobacillus</i>		<i>Paenibacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>				Nº compuestos reportados en Antibase			
			21	68A	13	9	57	69 ^a	37	62B	82A	8	54	48	78A	78B	Totales ^a	Genero ^b	
1	226.2	2.78				MMB										10	0		
2	226.2	3.15			MMB	MMB					MMB					10	0		
3	619.2	3.81		MB	MB	MB			MB TAK	MB TAK	TAK	TAK				46	0		
4	424.4	4.05														23	3		
5	425.3	4.13						MB MB TAK NB/10								99	2		
6	799.3	4.18									MB					9	0		
7	491.2	4.37			MB											29	0		
8	411.0	4.5	MB TAK	MB TAK												106	1		
9	256.2	4.98	MB TAK	MB TAK												15	0		
10	419.3	4.6	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10		MB TAK NB/10				67	0		
11	419.2	4.75	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10		MB TAK NB/10				67	0		
12	186.2	5.04						TAK NB/10		TAK NB/10						12	0		
13	274.4	5.31	MMB	MMB												14	0		
14	724.4	5.34							TAK							12	0		
15	478.2	5.55									MB					35	0		
16	853.4	5.74						MB TAK NB/10								18	0		
17	1036.6	5.76						MB		MB						15	10		
18	1080.6	5.76						MB		MB						6	0		
19	1050.6	5.83						MB								13	7		
20	1078.5	6.05						MB								11	0		
21	1072.8	5.86						MB NB/10								15	4		
22	737.6	5.89						MB								11	0		
23	758.6	6.07						MB TAK NB/10								15	0		
24	1036.6	6.16						MB MMB		MMB						15	10		
25	551.6	7.17					TAK	TAK		TAK						46	1		
26	537.4	7.53			TAK											43	0		
27	531.2	2.66	TAK	MB TAK	MB	MB				MB						74	0		
28	600.2	2.7	TAK	TAK						MB						20	0		
29	527.2	2.93	TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB						52	0		
30	222.2	3.89	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB				14	1		
31	543.3	3.59	TAK	TAK												19	1		
32	343.4	4.22	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB				89	1		
33	206.3	4.48	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10	MB	MB			MB	MB		MB				16	0		
34	291.0	3.98							MB TAK					TAK	TAK	101	0		
35	308.1	3.98							MB TAK					TAK	TAK	27	0		
36	463.0	4.50							MB TAK					TAK	TAK	45	2		
37	463.2	4.29							MB TAK					TAK	TAK	45	2		
38	549.2	4.52							MB TAK					TAK	TAK	48	1		
39	549.0	4.65							MB TAK					TAK	TAK	48	1		
40	635.0	4.78							MB TAK					TAK	TAK	27	2		
41	721.0	4.91							MB TAK					TAK	TAK	8	0		
42	1065.0	5.11							MB TAK					TAK	TAK	8	7		
43	807.0	4.92							MB TAK					TAK	TAK	14	0		
44	675.3	5.12							TAK		TAK NB/10	TAK NB/10		NB/10	NB/10	NB/10	19	0	
45	495.6	8.43	TAK	TAK					TAK		TAK	TAK		TAK	TAK	56	0		
46	1094.8	5.88						MB TAK NB/10			MB	MB		MB	MB	MB	MB	7	0

^a. Número total de compuestos reportados en la base de datos Antibase 2007.

^b. Número de compuestos reportados para especies a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. Medios de cultivo: MB: Caldo marino, TAK: Caldo Takashi, MMB: Caldo mínimo marino y NB/10: Caldo nutritivo dilución a diez.

Otro caso es el de sustancia **5** con tiempo de retención 4.13 min con un ion [M+H]⁺ en m/z 425.3, la cual es producida por las bacterias *B. pumilus* (RKHC-57) y *B. mojavensis* (RKHC-37) en tres de los cuatro medios utilizados, siendo *B. pumillus* (RKHC-57) cultivada en MB donde mayor can-

tidad de sustancia fue detectada. Al parecer, la producción de este metabolito por *B. pumilus* (RKHC-57) al igual que en el ejemplo anterior no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio y si de la adición de peptona en el medio de cultivo. Además, la adición de sa-

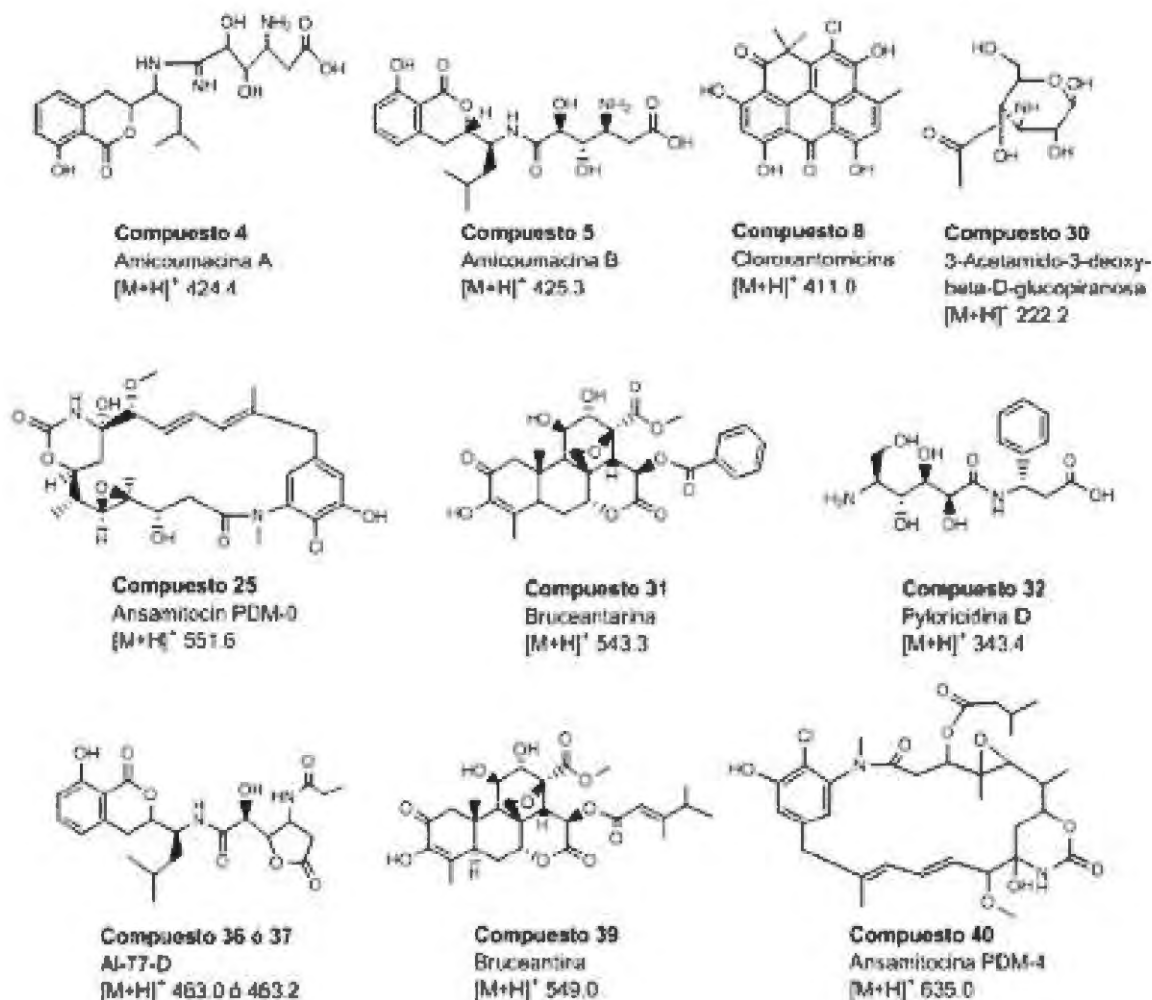


Figura 2. Estructuras propuestas para 10 de los compuestos encontrados en la librería de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

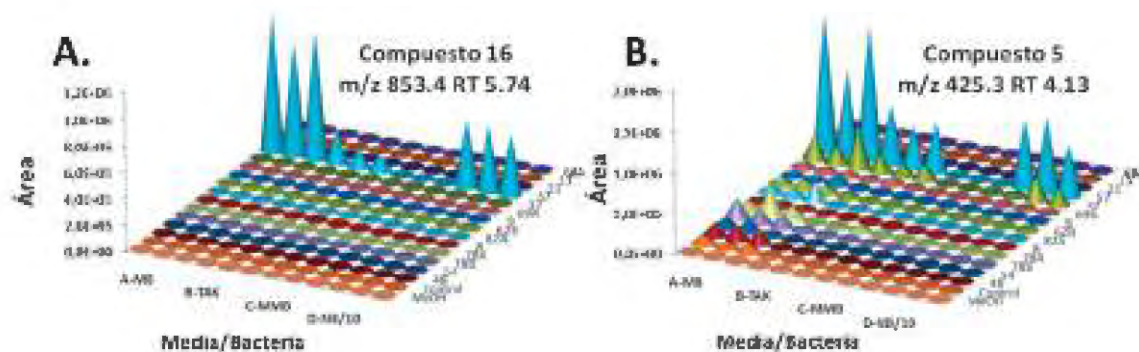


Figura 3. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la producción selectiva de algunas sustancias presentes en la librería. A. Compuesto 16 con tiempo de retención 5.74 min y un ión [M+H]⁺ en m/z 853.4 producido únicamente por la bacteria *Bacillus pumilus* (RKHC-57) en varios medios. B. Compuesto 5 con tiempo de retención 4.13 min con un ión [M+H]⁺ en m/z 425.3 producido por las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en varios medios. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

les en el medio de nutrientes si pareciera afectar la producción de dicho metabolito, debido a que MB es un medio rico en sales en comparación al medio TAK (Figura 3B).

Como conclusión del presente trabajo vale la pena mencionar que la miniaturización de los cultivos en cuatro medios diferentes de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, junto con la extracción en fase sólida y el uso de la tecnología de UPLC-MS como herramienta química para la detección rápida de compuestos producidos y de Antibase 2007TM como herramienta de derreplicación, se tradujo en altos rendimientos de análisis y en la generación de una librería, la cual permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar todos los compuestos producidos por todas las bacterias ensayadas y la posterior identificación de algunas de las sustancias, previamente reportadas, así como también el avanzar en el proceso de identificación de sustancias desconocidas. Otra de las grandes ventajas de la librería generada fue realizar una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y de las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias que componen nuestra librería. Esta información será muy útil en la selección racional de algunas de las bacterias y del medio de cultivo más conveniente para el posterior escalamiento del cultivo y aislamiento e identificación de los compuestos producidos usando los métodos cromatográficos y espectroscópicos comúnmente utilizados en productos naturales.

Así, los resultados mostrados en este trabajo se convierten en el punto de partida para la planeación del escalamiento a nivel de laboratorio y posteriormente a nivel industrial de estas sustancias a partir de las bacterias empleadas. Aunque en este momento no se ha determinado la actividad biológica de estos compuestos, la determinación de su potencial de aplicación si representa un área muy interesante por explorar.

Todos los resultados anteriores soportan la preferencia por el análisis preliminar de librerías por UPLC-MS, en comparación con el *screening* bioguiado, como herramienta para la detección temprana en los extractos de posibles sustancias con estructura química novedosa (en dado caso que no existieran reportes en la base de datos Antibase) y de sustancias conocidas, las cuales en un *screening* bioguiado requerirían de una alta inversión de tiempo y recursos para llegar a la identificación de las mismas.

Adicionalmente este artículo se constituye en un reporte importante acerca del empleo de aproximaciones metodológicas que permiten identificar compuestos en bacterias de manera simplificada, convirtiéndose así, en

consulta de primera mano para diferentes investigadores interesados en la producción de metabolitos a partir de microorganismos, quienes se ven enfrentados a la difícil tarea de realizar cultivos con gran cantidad de material y/o con bajos rendimientos hasta encontrar las mejores condiciones para la producción de determinada sustancia. Es por ello que este trabajo destaca desde el punto de vista biológico, el reducir los ensayos para probar varias condiciones que inducen la síntesis de compuestos en sistemas vivos y desde el punto de vista químico, el lograr en un tiempo corto una librería de compuestos para analizar y evaluar su potencial como sustancias con interés químico o potencial farmacológico.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por el permiso para recolección de las muestras en la Isla de Providencia (SW Caribe) (permiso No. 4 of 10/02/2010). RK, FB, BH y HC agradecen el soporte financiero de Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), Canada Research Chair Program, University of Prince Edward Island, Atlantic Innovation Fund, y Jeanne and Jean-Louis Lévesque Foundation.

Bibliografía

- Ardrey RE.** 2003. Liquid chromatographic-mass spectrometry: An introduction. John Wiley & Sons Ltda. Chichester, England. ISBN: 0-471-49801-7.
- Berdy J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58:1-26.
- Berrue F, Ibrahim A, Boland P, Kerr R.** 2009. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21). A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. *Pure Appl. Chem.* 81:1027-1031.
- Berrue F, Withers ST, Haltli B, Withers J, Kerr R.** 2011. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar Drugs* 9:369-381.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2009. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26:170-244.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2011. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 28:196-268.
- Correa H, Valenzuela AL, Ospina LF, Duque C.** 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J Inflamm* 6:doi: 10.1186/1476-9255-6-5.
- Correa H, Aristizabal F, Duque F, Kerr R.** 2011a. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterins and seco-

- pseudopterins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar Drugs* 9:334-344.
- Correa H, Haldi B, Duque C, Kerr R.** 2011b. Bacterial community associated with the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island (SW Caribbean sea). En preparación.
- Duque C, Puyana M, Narvaez G, Paz A, Osorno O, Hara N, Fujimoto Y.** 2004. Pseudopterins P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* 60:10627-10635.
- Duque C, Puyana M, Castellanos L, Arias A, Correa H, Osorno O, Asai T, Hara N, Fujimoto Y.** 2006. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron* 62:4205-4213.
- Egan S, Thomas T, Kjelleberg S.** 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 11:219-225.
- Flatt P, Gautschi J, Thacker R, Musafija-Girt M, Crews P, Gerwick W.** 2005. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea (Lamellodysidea) herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* by CARD-FISH analysis. *Mar Biol* 147:761-774.
- Heckrodt TJ, Mulzer J.** 2005. Marine natural products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. In *Natural products synthesis II*. Volumen 244. 1st edition. Edited by Mulzer J. New York: Springer Berlin Heidelberg 1-41.
- Hildebrand M, Waggoner LE, Lim GE, Sharp KH, Ridley CP, Haygood MG.** 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat Prod Rep* 21:122-142.
- Hill RT, Enticknap JJ, Peraud O, Anderson MA, Kasanah N, Rao KV, Bowling JJ, Hamann MT.** 2007. Microbial symbionts of marine invertebrates: Implications for drug discovery. Conference Programme and Proceedings. Manapro XII, Auckland, New Zealand.
- Ito T, Odake T, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki M.** 2011. High-Throughput profiling of microbial extracts. *J Nat Prod* 74:983-988.
- Li J, Chase HW.** 2010. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat Prod Rep* 27:1493-1510.
- Marrero J, Rodriguez II, Rodriguez AD.** 2010. The natural products chemistry of the gorgonian genus *Pseudopterogorgia* (Octocorallia:Gorgoniidae). In *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. 1st edition. Edited by Mander L, Liu H-W. Oxford: Elsevier, p. 363-428.
- Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts B, Shuster DE.** 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci* 31:255-265.
- Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD.** 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr Comp Biol* 50:662-674.
- Mydlarz LD, McGinty ES, Harvell CD.** 2010. What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease?. *J Exp Biol* 213:934-945.
- Newman D, Hill R.** 2006. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:539-544.
- Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S.** 2010. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8:438-459.
- Piel J.** 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* 13:39-50.
- Ridley CP, Bergquist PR, Harper MK, Faulkner DJ, Hooper JNA, Haygood MG.** 2005. Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont *Oscillatoria spongelliae*. *Chem Biol* 12:397-406.
- Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, Hildebrand M, Anderson C, Liu H, Patel A, Sherman DH, Haygood MG.** 2007. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus *Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* 70:67-74.
- Toyo'oka T.** 2008. Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabolomics, and metabolomics. *J Chromatogr Sci* 46:233-247.
- Yao S, Wu T, Li X, Tu B, Song H.** 2010. Ten years of research into phytomedicines analysis-an era in new technologies and methods. *Curr Pharm Anal* 6:269-288.

Recibido: agosto 7 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.