



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de
bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en
Baja California Sur**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Gregorio Rodríguez Valdez

La Paz, Baja California Sur Octubre 2017

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 22 del Mes de Septiembre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur"

Presentada por el alumno:

Gregorio Rodríguez Valdez

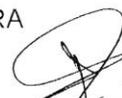
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



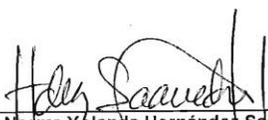
Dr. Carlos Ellud Angulo Valadez
Director de Tesis



Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo
Co-Tutor



Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de comités

Comité tutorial

Director: Dr. Carlos Eliud Angúlo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-Tutor: Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo

Instituto Tecnológico de La Paz

Co-Tutor: Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

Universidad Autónoma de Baja California

Comité revisor de tesis

Dr. Carlos Eliud Angúlo Valadez

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

Jurado de exámen

Dr. Carlos Eliud Angúlo Valadez

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

Suplente

Dr. Rogelio Ramirez Serrano

Resumen

El uso inapropiado de antibióticos ha ocasionado un aumento de bacterias resistentes. Entre las alternativas se encuentran: la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes. Aunado a esto, las bacterias de ambientes marinos extremos han sido reportadas como productoras de compuestos bioactivos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar y evaluar la actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. Para esto se aislaron bacterias de la salina marina en Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro y en una ventila marina hidrotermal en Bahía Concepción. Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*. Por otra parte, la actividad inmunoestimulante se evaluó por la producción de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, actividad fagocítica, actividad antioxidante y la viabilidad en leucocitos de bazo de ratón. En total se obtuvieron 340 aislados de los cuales 15 presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una de las bacterias patógenas. Particularmente, el aislado *Bacillus hisashii* VSF 459C, obtenido de sedimento de la ventila hidrotermal, inhibió el crecimiento de todas las cepas patógenas. En cuanto a la actividad inmunoestimulante, 10 aislados indujeron la producción de óxido nítrico en leucocitos de ratón; de los cuales 5 no disminuyeron la viabilidad de los leucocitos y aumentaron la actividad fagocítica, las especies reactivas de oxígeno y la actividad antioxidante. En conclusión, las bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* y *A. hydrophila*. Además, presentaron actividad inmunoestimulante en leucocitos de ratón. Es necesario realizar más estudios para caracterizar las actividades antimicrobiana e inmunoestimulante de los aislados en ensayos preclínicos y/o clínicos.

Palabras clave: Bacterias, ambientes marinos extremos, actividad antimicrobiana, actividad inmunoestimulante.

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angúlo Valadez

Summary

Inappropriate use of antibiotics has led to an increase in bacterial resistance. Among the alternatives to treat infections caused by these bacteria are: the search for new antimicrobial compounds and immunostimulants. In addition, bacteria from extreme marine environments have been reported as producers of bioactive compounds. Therefore, the aim of this work was to identify and evaluate the antimicrobial and immunostimulating activity of bacterial isolates from extreme marine environments in Baja California Sur. Bacteria were isolated from a marine solar saltern in Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro and from a shallow marine hydrothermal vent in Bahía Concepción. Then the antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Aeromonas hydrophila*. On the other hand, immunostimulatory activity was evaluated by the production of nitric oxide (NO), reactive oxygen species, phagocytic activity, antioxidant activity and viability of mouse spleen leukocytes. In total, 340 isolates were obtained and 15 presented antimicrobial activity against at least one of the pathogenic bacteria. Particularly the isolate identified as *Bacillus hisashii* VSF 459C, obtained from sediment samples from the hydrothermal vent, inhibited the growth of all strains of pathogenic bacteria. On the other hand, 10 isolates induced the production of NO in mouse leukocytes. Particularly 5 isolates did not decrease the viability of treated leukocytes and increased the phagocytic activity, reactive oxygen species production and antioxidant activity. In conclusion, bacteria isolated from extreme marine environments in Baja California Sur presented antimicrobial activity against pathogenic strains of *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* and *A. hydrophila*. In addition, the isolates showed immunostimulatory activity in mouse spleen leukocytes. Further studies are needed to characterize the antimicrobial and immunostimulatory activities of the isolates in preclinical and / or clinical trials.

Keywords: Bacteria, extreme marine environments, antimicrobial activity, immunostimulatory activity.

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angúlo Valadez

Dedicatoria

*A mi padre
Gregorio Rodríguez Rodríguez*

Agradecimientos

Académicos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. Por haberme recibido en su programa de maestría, además de todas las facilidades e infraestructura brindadas.

Al CONACyT por la beca nacional otorgada No 589393

Al Proyecto Problemas Nacionales-CONACYT PDCPN2014-01 (No. 248033): Conservación y aprovechamiento de la biodiversidad de microorganismos marinos.

Al Proyecto CONACYT-INFR-2014-01/225924: Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia Una Sola Salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema.

Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez por su dirección en este proyecto de tesis y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Además, gracias por brindarme gran parte de su tiempo y dedicación.

A la Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo por sus asesorías y consejos, los cuales me permitieron desarrollarme académica y profesionalmente.

Al Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto por todas las atenciones y asesorías prestadas para la realización de esta tesis.

Al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle por su disponibilidad y accesibilidad para hacer uso de la infraestructura, material, reactivos y equipo del Laboratorio de Patogénesis Microbiana.

A la Dra. Martha Reyes Becerril por su apoyo en las técnicas inmunológicas, cultivos primarios de células y análisis de citometría.

A la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes por hacer posible trabajar la parte de microbiología en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular. Se le agradece la accesibilidad y flexibilidad brindada para la realización de esta tesis.

Al M. C. Ángel Enrique Carillo García por apoyarme en las técnicas de aislamiento y cultivo de bacterias.

A la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, técnico responsable del Laboratorio de Genómica Funcional y Fisiología Comparada, por brindarme su apoyo en las técnicas de conteo celular y cinéticos de crecimiento bacteriano

Al Dr. Rogelio Ramírez Serrano por toda la atención, asesorías y tiempo dedicado al presente trabajo.

A la M. C. Crystal Alejandra Guluarte Vélez por toda la asesoría en las técnicas inmunológicas y de cultivo *in vitro* de células.

pIBQ. Kevyn Martin Guerra Contreras por toda la ayuda brindada en el cultivo y preservación de las bacterias aisladas y las bacterias patógenas.

Al Dr. Mario Rojas Arzaluz por los consejos y asesorías, tan amablemente brindadas, en el análisis de resultados y escritura del documento de tesis.

Personales

A mi padre Gregorio Rodríguez Rodríguez por haberme criado y educado con tanto cariño, amor y dedicación. Gracias por haber cuidado tanto de nuestra familia, no tengo palabras que puedan expresar el orgullo y gratitud que tengo de ser su hijo, y de haber pasado esos 10 años tan gratos junto a él. A pesar de lo sucedido, él siempre estará en la mente y en el corazón de nuestra familia. Finalmente, sé que uno de sus sueños era realizarse académicamente pero no logró finalizar su tesis de maestría, sin embargo, ya no tiene de que preocuparse, yo la termine por él.

A mi madre Dalia Valdez Macías por alentarme y apoyarme de manera incondicional.

A mi prometida Janeth Alejandra Valdez Rodríguez por cuidarme y quererme en todo momento.

A mi hermana Dalia Rodríguez Valdez por apoyar y alentar mis decisiones.

Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez por alentarme, apoyarme, aconsejarme de manera académica y personal.

A la Dra. Reyna por darme tan buenos y útiles consejos de vida, además gracias por toda la paciencia y atención que me ha brindado a lo largo de estos pocos, pero gratos años de conocerla.

A mis compañeros Nancy Alarcón y Kevyn Guerra por permitirme ser parte de su grupo de ponsoña y por brindarme gratos momentos de diversión y camaradería.

A mis vecinos (de cubículos), Mario y Bety por los momentos agradables que me brindaron en este tiempo.

Finalmente a Miguelito, Nancy II y Kevyn II, que contribuyeron en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

Resumen	iii
Summary	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Bacterias patógenas resistentes a antibióticos.....	3
2.2 Alternativas	4
2.3 Nuevos compuestos antimicrobianos.....	4
2.4 Nuevos Inmunoestimulantes	5
2.5 Bacterias marinas como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes	6
2.5.1 Bacterias de ambientes marinos hipersalinos como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes.....	8
2.5.2 Bacterias de ambientes marinos térmicos como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes.....	11
2.6 Baja California Sur, México como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes	13
2.6.1 Salina marina en Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro	14
2.6.2 Ventila marina hidrotermal somera en Bahía Concepción.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Muestreo.....	23
6.2 Aislamiento de bacterias	25
6.3 Metodología para objetivo particular 2.	26

6.3.1 Bacterias patógenas	26
7.3.2 Obtención del sobrenadante de aislados.....	26
6.3.3 Curva de crecimiento de bacterias patógenas en los medios de aislamiento	27
7.3.4 Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución líquido.....	28
6.3.5 Identificación de los aislados con act. Antimicrobiana.....	29
6.3.6 Actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena.....	30
6.3.7 Curvas de inhibición de aislados seleccionados contra bacterias patógenas.....	31
6.4 Metodología para objetivo particular 3	32
6.4.1 Preparación e inactivación de aislados.....	32
6.4.2 Obtención de leucocitos de bazo de ratón.....	32
6.4.3 Ensayo de producción de óxido nítrico	33
6.4.4 Evaluación de citotoxicidad	33
6.4.5 Evaluación de la actividad fagocítica.....	34
6.4.6 Evaluación de explosión respiratoria	34
6.4.7 Evaluación de enzimas antioxidantes.....	35
6.5 Análisis estadísticos	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Aislamiento de bacterias	37
7.2 Resultados para objetivo particular 2.....	38
7.2.1 Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas en los medios de aislamiento	38
7.2.2 Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución líquido.....	43
7.2.3 Identificación de aislados seleccionados con act. Antimicrobiana	45
7.2.4 Actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena.....	53
7.2.5 Curvas de inhibición de aislados seleccionados contra bacterias patógenas.....	55
7.3 Resultados para objetivo particular 3.....	59
7.3.1 Evaluación de producción de óxido nítrico.....	59
7.3.2 Identificación de aislados seleccionados con act. Inmunoestimulante.....	60
7.3.3 Evaluación de la citotoxicidad	64
7.3.4 Evaluación de la actividad fagocítica.....	65
7.3.5 Evaluación de explosión respiratoria	66
7.3.6 Evaluación de enzimas antioxidantes.....	67
8. DISCUSIÓN	70

9. CONCLUSIONES.....	88
10. LITERATURA CITADA	90

Lista de figuras

Figura 1. Placas tectónicas de la república Mexicana	17
Figura 2. Sistema de fallas geológicas en Bahía Concepción	17
Figura 3. Contribución relativa de filos en ventilas de Bahía Concepción	20
Figura 4. Mapa de los ambientes marinos extremos en Baja California Sur.....	24
Figura 5. Mapa de Laguna Ojo de Liebre.....	24
Figura 6. Mapa de Bahía Concepción.....	25
Figura 7. Curvas de crecimiento de bacterias patógenas	42
Figura 8. Extracciones de ADN genómico	45
Figura 9. Productos de amplificación del gen 16S ARNr.	46
Figura 10. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen 16S ARNr de aislados con actividad antimicrobiana.....	48
Figura 11. Tincion de Gram de aislados con actividad antimicrobiana	51
Figura 12. Curvas de inhibición de las bacterias patógenas con <i>B. hisashii</i> VSF 459C	58
Figura 13. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen 16S ARNr de aislados con actividad inmunoestimulante	61
Figura 14. Tinciones de Gram de aislados con actividad inmunoestimulante.	63
Figura 15. Viabilidad de leucocitos tratados con células inactivadas de los aislados	65
Figura 16. Actividad fagocítica <i>in vitro</i> de leucocitos tratados con células inactivadas de los aislados	66
Figura 17. Explosión respiratoria <i>in vitro</i> de leucocitos tratados células inactivadas de los aislados.....	67
Figura 18. Actividad de SOD <i>in vitro</i> de leucocitos tratados con células inactivadas de los aislados.....	68
Figura 19. Actividad MPX <i>in vitro</i> de leucocito tratados con células inactivadas de los aislados.....	69
Figura 20. Actividad de CAT <i>in vitro</i> de leucocitos tratados con células inactivadas de los aislados.....	69

Lista de tablas

Tabla I. Bacterias de ambientes marinos hipersalinos con actividad antimicrobiana	9
Tabla II. Bacterias de ambientes marinos térmicos con actividad antimicrobiana	12
Tabla III. Bacterias de ambientes marinos térmicos con actividad inmunoestimulante	13
Tabla IV. Número de aislados obtenidos de la salina marina.....	37
Tabla V. Número de aislados obtenidos de la ventila hidrotermal	38
Tabla VI. Tiempos de fase exponencial tardía de las bacterias patógenas	39
Tabla VII. Parámetros estadísticos de los modelos de regresión no lineal	40
Tabla VIII. Parámetros cinéticos de las curva de crecimiento ajustadas	41
Tabla IX. Actividad antimicrobiana de los aislados contra al menos una bacteria patógena.	44
Tabla X. Análisis de similitud de la secuencia parcial del gen 16S ARNr de los aislados con act. Antimicrobiana.	47
Tabla XI. Género y especie asignado para cada aislado con actividad antimicrobiana	52
Tabla XII. Actividad antimicrobiana de aislados que inhibieron 4 especies de bacterias patógenas.	53
Tabla XIII. Actividad antimicrobiana de aislados que inhibieron 3 especies de bacterias patógenas	54
Tabla XIV. Actividad antimicrobiana de aislados que inhibieron 2 especies de bacterias patógenas	54
Tabla XV. Actividad antimicrobiana de aislados que inhibieron 1 especie de bacteria patógena.	55
Tabla XVI. Aislados que indujeron la producción de NO en leucocitos de bazo de ratón	59
Tabla XVII. Análisis de similitud de la secuencia parcial del gen 16S ARNr de los aislados con act. Inmunoestimulante.	60
Tabla XVIII. Género y especie asignado para cada aislado que indujo la producción de NO en leucocitos de ratón	64

1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de antibióticos en la medicina, agricultura, acuicultura y ganadería ha ocasionado un aumento de bacterias resistentes a los antibióticos actualmente utilizados (Gelband *et al.*, 2015). Particularmente, bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus* están siendo investigadas debido a su potencial para desarrollar, adquirir o transmitir resistencia en diferentes sectores (Okesola, 2011). Entre las alternativas actuales se encuentra la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos y compuestos inmunoestimulantes. En este sentido, actualmente no existen nuevas clases de antibióticos, por el contrario las compañías farmacéuticas se han dedicado a desarrollar derivados sintéticos de las clases ya conocidas y con los mismos mecanismos de acción (Nigam, *et al.*, 2014). Sin embargo, actualmente ya se han reportado nuevos compuestos con estructuras y mecanismos de acción diferentes, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos se encuentra orientada en esta dirección (Holms *et al.*, 2016). Por otro lado, la administración de compuestos, partículas, células o componentes celulares que estimulen la respuesta inmune para proteger y controlar las enfermedades infecciosas bacterianas también se encuentra en desarrollo (Tsai *et al.*, 2012). Esta estrategia posee diversas ventajas sobre el uso de antibióticos, ya que actúa directamente sobre las bacterias patógenas y elude el desarrollo de resistencia, también permite ampliar las opciones de tratamiento para pacientes inmunocomprometidos y ofrece un amplio espectro de actividad contra virus, hongos y bacterias; además, proporciona tratamientos de emergencia no específicos en el caso de la aparición de un nuevo agente patógeno (Tallafa *et al.*, 2013).

La mayoría de los antibióticos e inmunoestimulantes que se utilizan actualmente son obtenidos de microorganismos de ambientes terrestres. En este sentido, uno de los principales problemas en el descubrimiento de nuevos compuestos es el continuo aislamiento de compuestos ya conocidos. Para evitar este problema, una de las estrategias es realizar la búsqueda en ecosistemas menos explorados. Particularmente, los ecosistemas marinos han sido menos explorados en comparación con los ecosistemas terrestres (Hamedí

et al., 2013). Aunado a esto Berdy *et al.* (2005) reportaron que sólo en 2013 se registraron 1,163 nuevos compuestos de origen marino con diversas actividades biológicas y más de la mitad eran de origen bacteriano. Estos compuestos bioactivos fueron aislados principalmente de especies marinas de los filos *Actinobacteria* y *Cyanobacterias*, del orden *Myxobacteria* y de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Wilson *et al.*, 2014). Entre ellos, el 45% fueron aislados del filo *Actinobacteria* (Subramani *et al.*, 2013). En particular las bacterias de ambientes marinos hipersalinos y ambientes marinos térmicos están siendo estudiados no sólo desde una perspectiva taxonómica y ecológica, sino también por la producción de nuevos compuestos bioactivos como: antimicrobianos, antitumorales e inmunoestimulantes (Dharmaraj *et al.*, 2010).

Por tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar y evaluar la actividad antimicrobiana contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimuirum* y *Aeromonas hydrophila*. Además de identificar y evaluar la actividad inmunoestimulante en leucocitos de ratón, de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. El conocimiento que se genere será de gran importancia para el desarrollo de más trabajos de investigación acerca del potencial biotecnológico de microorganismos de ambientes marinos extremos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias patógenas resistentes a antibióticos

El uso indebido de antibióticos en la medicina, agricultura, acuicultura y ganadería ha ocasionado un aumento en el número de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos. Particularmente, bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus* están siendo profundamente investigadas debido a su potencial para desarrollar, adquirir o transmitir resistencia a los antibióticos en diferentes sectores (Okesola, 2011). *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo implicado en infecciones nosocomiales generalizadas, principalmente en el tracto urinario y es una de las principales bacterias implicadas en la transferencia de plásmidos con genes de resistencia. El perfil de resistencias que presentan diferentes cepas de *E. coli* es muy variado. Existen informes que reportan que el 11% de todas las cepas es resistente a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Además, entre 2 - 3% son resistentes a carbapenem y productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (CDDEP, 2015; Edrington *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2012; Ikram *et al.*, 2015). Otra importante bacteria es *Salmonella typhimurium*, este bacilo Gram negativo es un patógeno que causa infecciones generalizadas, principalmente gastrointestinales (gastroenteritis) y fiebre tifoidea. Preethi (2016) reporta cepas de *S. typhimurium* resistentes a quinolonas y fluoroquinolonas (CDDEP, 2015; Preethi *et al.*, 2016). Otra bacteria importante es *Aeromonas hydrophila*, este bacilo Gram negativo es patógeno de humanos y de organismos acuáticos, además es una bacteria oportunista que infecta a organismos inmunocomprometidos; ocasiona infecciones del tracto biliar, piel, tejidos blandos y es la principal bacteria implicada en peritonitis bacteriana. Diversos reportes indican que esta bacteria es resistente a fluoroquinolonas (ciprofloxacina y flumequina), tetraciclina, trimetoprima y aminoglucósidos (Castillo *et al.*, 2015; Skwor *et al.*, 2014; Shak *et al.*, 2011). Por último, la bacteria más conocida por su resistencia a múltiples antibióticos es *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Este coco Gram positivo agrupado en racimos (Stafilo) es el principal patógeno implicado en infecciones

nosocomiales y en las vías respiratorias (CDDEP, 2015). Okesola (2011) reporta que esta cepa es resistente a los aminoglucósidos, macrólidos, tetracélinas, cloranfenicol, y linocosamidas.

A través de la evolución microbiana aunada al uso excesivo de antibióticos las bacterias han desarrollado diversos tipos de mecanismos de resistencia. Algunos de los mecanismos son la exocitosis mediada por bombas de eflujo, degradación de antibióticos por medio de enzimas hidrolíticas, modificación del sustrato y/o estructura del antibiótico por medio de enzimas de modificación y el cambio en la composición de la membrana (Gabani *et al.*, 2012). Estos mecanismos pueden aparecer en una cepa a través de mutaciones de genes (Breidenstein *et al.*, 2011; Cantón y Morosini, 2011) o por medio de fuentes exógenas, tales como plásmidos transferibles que contienen una variedad de genes de resistencia (Rice, 2012).

2.2 Alternativas

Actualmente existen diversas alternativas para reducir la resistencia de bacterias patógenas o para reemplazar los antibióticos actuales. Las alternativas incluyen probióticos, endolisinas, bacteriófagos y bacteriocinas. Algunas de las más prometedoras son nuevos compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes aislados de ambientes menos explorados (Czaplewski *et al.*, 2016; Nigam *et al.*, 2014).

2.3 Nuevos compuestos antimicrobianos

La necesidad de nuevos compuestos antimicrobianos se ve reflejada en el intervalo de tiempo de casi 40 años que existe entre 1962 cuando se introdujeron la nueva clase molecular de antibióticos fluoroquinolonas y el 2000 cuando se introdujeron las oxazolidinonas (Walsh, 2003). Actualmente no existen nuevas clases de antibióticos, por el contrario las compañías farmacéuticas se han dedicado a desarrollar derivados sintéticos de las clases de antibióticos ya conocidas, sin embargo, los mecanismos de acción son los mismos (Nigam *et al.*, 2014). En este sentido ya se han reportado nuevos compuestos con

estructuras y mecanismos de acción diferentes. Por ejemplo, la manipulación e interrupción de los sistemas de señalización celular bacteriana (Dong *et al.*, 2001; Williams, 2002). Otro mecanismo interesante es inhibir enzimas implicadas en la generación de ATP (Andries *et al.*, 2005). Otro ejemplo es la disrupción de la membrana celular bacteriana por medio de péptidos catiónicos, los cuales poseen un mecanismo de acción único. Este se basa en la interacción con la bicapa lipídica de la membrana. Debido a su polaridad catiónica (+) se insertan en la membrana e interaccionan con los grupos fosfatos (polaridad negativa (-)) de los fosfolípidos y forman agregados que a la vez crean poros, liberando el citoplasma al medio extracelular. Este mecanismo tiene la gran ventaja de reducir el desarrollo de resistencia, ya que sería demasiado costoso o requeriría demasiados eventos mutacionales en una bacteria para cambiar la composición u organización de los lípidos de membrana con el fin de evitar estas interacciones (Straus *et al.*, 2006). Debido a estos nuevos mecanismos que se han reportado, la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos se encuentran orientada en esta dirección. Adicionalmente, para aumentar las probabilidades de encontrar un nuevo compuesto, la búsqueda se está realizando en ecosistemas poco explorados.

2.4 Nuevos Inmunoestimulantes

Adicionalmente a los nuevos compuestos antimicrobianos, actualmente se encuentra en desarrollo la estrategia de administrar compuestos, partículas, células o componentes celulares que estimulen la respuesta inmune del hospedero para proteger o controlar las enfermedades infecciosas bacterianas. A estos compuestos o componentes se les llama inmunoestimulantes y al proceso de inducir una respuesta inmune en el hospedero se le conoce como inmunoestimulación. Esta estrategia posee diversas ventajas sobre el uso directo de antibióticos o antimicrobianos. En primer lugar los inmunoestimulantes no actúan directamente sobre las bacterias patógenas por lo que se puede eludir el desarrollo de resistencia; en segundo lugar, permiten ampliar las opciones de tratamiento para los pacientes inmunocomprometidos, en los que los antimicrobianos generalmente han disminuido su eficacia; en tercer lugar, ofrecen un amplio espectro de actividad contra

virus, hongos y bacterias y en cuarto lugar, pueden proporcionar opciones para tratamientos de emergencia no específicos en el caso de la aparición de un nuevo agente patógeno (Tallafa *et al.*, 2013).

El mecanismo de inmunoestimulación se da a través del reconocimiento de las sustancias, partículas, células o componentes celulares a través de patrones moleculares conservados, designados como “patrones microbianos asociados a patógenos” (PAMPs, por siglas en inglés). Todos los PAMPs son específicamente reconocidos por receptores de reconocimiento de patógenos (PRRS, por siglas en inglés), tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD, dectin-1 o helicasas RIG. Estos se encuentran predominantemente en las células del sistema inmune innato. Este reconocimiento se considera crítico en la señalización y activación de distintos subconjuntos de células T cooperadoras (Tallafa *et al.*, 2013). Los inmunoestimulantes también inducen la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-10 (IL-10) e interleucina 1 β (Christensen *et al.*, 2002; Cruce, 2002; Maassen *et al.*, 2000; Nagafuchi *et al.*, 1999; Perdigon *et al.*, 1999). Además, aumentan la actividad en los mecanismos de inmunidad innata como la fagocitosis y la presentación de antígenos por células presentadoras de antígenos (APC, por siglas en inglés) (Aderem & Underhill, 1999).

A pesar de las ventajas que poseen los inmunoestimulantes sobre el uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas, aún se encuentran en fase de desarrollo y al igual que los nuevos compuestos antimicrobianos la búsqueda de estos se deberá de realizar en ecosistemas poco explorados para aumentar la posibilidad de encontrar nuevos compuestos con mejores propiedades inmunoestimuladoras.

2.5 Bacterias marinas como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes

La mayoría de los antimicrobianos (antibióticos) e inmunoestimulantes que se utilizan actualmente son aislados de microorganismos de ambientes terrestres. Uno de los principales problemas en el descubrimiento de nuevos compuestos es el re-aislamiento de

compuestos ya conocidos. Para evitar este problema se ha considerado dos estrategias: la primera es el uso de técnicas que permitan diferenciar los compuestos conocidos de los no conocidos dentro de una solución (nuevas técnicas de bioprospección) y la segunda es la búsqueda y aislamiento en ecosistemas menos explorados y explotados. Esta segunda estrategia comprende los ecosistemas marinos que han sido menos explorados en comparación de los ecosistemas terrestres (Hamedi *et al.*, 2013).

Los ecosistemas marinos poseen una gran diversidad de organismos, especialmente en el mundo microbiano y existen diversos reportes que evidencian esta diversidad. La primera expedición del proyecto “Exploración Del Genoma Oceánico” (Global Ocean Sampling expedition, 2003) ha llevado a la identificación de 1.2 millones de nuevos genes y se ha duplicado el número de secuencias de proteínas en el NIH de GenBank (Yooseph *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009). Berdy (2005) reporta que sólo en 2013 se registraron 1,163 nuevos compuestos de origen marino con actividades antimicrobianas, antivirales, antitumorales e inmunoestimulantes, y más de la mitad de los compuestos eran de origen bacteriano. Estos metabolitos bioactivos fueron aislados de especies microbianas marinas representativas del filo *Actinobacteria* y *Cyanobacterias*, del orden *Myxobacteria* y de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Wilson *et al.*, 2014). Entre ellos, el 45% fueron producidos por *Actinobacteria* (Subramani *et al.*, 2013).

Las bacterias marinas se distribuyen ampliamente en diversos microambientes. Se les puede encontrar como parte de la microbiota natural de peces, moluscos, esponjas y algas marinas, además habitan en agua y sedimento marino, o en ecosistemas como bosques de manglar. En particular las bacterias que habitan ambientes hipersalinos (altas concentraciones de solutos, principalmente sales) y ambientes marinos térmicos (altas temperaturas) están ganando importancia, no sólo desde una perspectiva taxonómica y ecológica, sino también por su producción de nuevos compuestos bioactivos tales como agentes antimicrobianos (antibióticos), antitumorales e inmunoestimulantes, así como enzimas, inhibidores de enzimas y pigmentos (Dharmaraj, 2010).

2.5.1 Bacterias de ambientes marinos hipersalinos como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes.

Las bacterias que habitan en ambientes marinos hipersalinos han desarrollado una gran diversidad genómica y metabólica, por tanto los esfuerzos deben dirigirse hacia la exploración de estas bacterias como fuente para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (Eftekharzadeh *et al.*, 2010). Esta diversidad se debe a que poseen múltiples mecanismos de adaptación para contrarrestar la presión osmótica del medio hipersalino. Cuando existe una mayor concentración de solutos en el medio extracelular, las bacterias inducen transitoriamente cientos de genes localizados en las regiones centrales del cromosoma. Estos genes codifican proteínas de choque térmico, enzimas del metabolismo de carbohidratos y metabolismo de proteínas, los cuales forman parte del mecanismo de adaptación llamado “solutos compatibles”. Los solutos compatibles ayudan a estabilizar las proteínas, organelos, y membranas celulares, además aumentan la osmolaridad intracelular (Singer y Lindquist 1998) y actúan como protectores de macromoléculas biológicas ante otros tipos de estrés como alta temperatura, desecación y congelación (Nieto y Vargas 2002). Por lo general los solutos compatibles son aminoácidos, péptidos, hidratos de carbono y polioles, por ejemplo, glicina, betaína, ectoína, sacarosa, trehalosa y glicerol. Sin embargo, estas moléculas no solo poseen esta actividad protectora sino también se ha reportado que poseen actividad antimicrobiana e inmunoestimulante, entre otras actividades (Ventosa *et al.*, 1998). En la tabla I se presentan algunos ejemplos de bacterias de ambientes marinos hipersalinos con actividad antimicrobiana. Un estudio en particular es el realizado por Velmurugan *et al.* (2013), donde aislaron la bacteria *Halomonas solifodinae* de una salina solar en India y por medio de cromatografía en columna y espectrometría de masas, extrajeron e identificaron el compuesto 1-butyl-2-ethyl-1,10-Biphenyl]-3-amine que tenía actividad antimicrobiana contra *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*, las cuales eran cepas patógenas aisladas de camarones y peces infectados.

Tabla I. Bacterias de ambientes marinos hipersalinos con actividad antimicrobiana.

Bacteria	Ambiente (concentración de sales)	Compuesto	Espectro antimicrobiano	Referencia
<i>Verrucosipora sp.</i>	Sedimento del mar de Japón (40 UPS)	Abyssomicin C	<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptomyces sp.</i>	Sedimento marino en isla Hainan, sur de China (35 UPS)	Cultivo completo	<i>Vibrio spp.</i>	You <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces griseus</i>	Agua de mar, norte de Alemania (35 UPS)	Frigocyclinone	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
<i>Marinispora sp.</i>	Sedimento marino de la costa de San Diego, California (35 UPS)	Lynamicina	<i>MR-Staphylococcus aureus</i> <i>VR-Enterococcus faecium</i>	McArthur <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces spp.</i>	Sedimento de la costa, sedimento y agua en bosque de manglar en Tamil Nadu, Bengal. (20 UPS)	Cultivo completo	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	Ramesh <i>et al.</i> , 2009
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	Sedimento de bosque de manglar en el mar del sur de China (35 UPS)	Extracto metanólico del sobrenadante	<i>MR-Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Huang <i>et al.</i> , 2009
<i>Micromonospora sp.</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i>	Sedimento de bosque de manglar en Danzhou, Haikou, Sanya. (35 UPS)	Extracto metanólico del sobrenadante		Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Sedimento marino en Trondheim Fjord, Noruega (35 UPS)	TP-1161	<i>VR-Enterococcus faecium</i> <i>MDR- Candida albicans</i>	Engelhardt <i>et al.</i> , 2010
<i>Salinispora arenicola</i>	Bosque de manglar en Sweetings Cay, isla Grand Bahama (35 UPS)	Arenimycina	<i>Mycobacterium bacille</i> <i>VR-Enterococcus faecium</i> <i>RMR-Staphylococcus aureus</i> <i>MR-Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Asolkar <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces sp.</i>	Sedimento marino de las costas del mar de Royapuram, Muttukadu. (35 UPS)	Sobrenadante	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	Valli <i>et al.</i> , 2012
<i>Halomonas salifodinae</i>	Salina solar, India (230 UPS)	1-butyl-2-ethyl-1,10-Biphenyl]-3-amine	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	Velmurugan <i>et al.</i> , 2013

Bacteria	Ambiente (concentración de sales)	Compuesto	Espectro antimicrobiano	Referencia
<i>Streptomyces radiopugnans</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Streptomyces sporocinereus</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Kocuria palustris</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Micromonospora sp.</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Vibrio cholerae</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Staphylococcus citreus</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Kocuria sp.</i>	Estanques cristalizadores en salina Ribandar en Goa, India (50 UPS)	Sobrenadante	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ballav <i>et al.</i> , 2014
<i>Salinoactinospora qingdaoensis</i>	Sedimento de la bahía en Valparaíso, Chile (40 UPS)	Cultivo completo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Claverías <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	Sedimento de la bahía en Valparaíso, Chile (40 UPS)	Cultivo completo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Claverías <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces janthinus</i>	Sedimento de la bahía en Valparaíso, Chile (40 UPS)	Cultivo completo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Claverías <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces sp.</i>	Bahía de Bengal (35 UPS)	Sobrenadante	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	John <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces sp.</i>	Costa de Egipto (35 UPS)	Cultivo completo	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Rashad <i>et al.</i> , 2015

2.5.2 Bacterias de ambientes marinos térmicos como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes.

Las bacterias no solamente tienen la capacidad de habitar en ambientes hipersalinos, sino también en ambientes con altas temperaturas. Estos ambientes incluyen aguas termales, biorreactores, pozos de petróleo, plantas geotérmicas profundas, pilas de carbón, composta, fuentes hidrotermales marinas y otros ambientes subterráneos (por ejemplo, minas de oro). A estas bacterias se llama "termófilos" cuando habitan en ambientes térmicos que van desde aproximadamente 61 °C hasta 79 °C, "hipertermófilos" cuando habitan a temperaturas superiores a 80 °C, y "moderadamente termófilos" a temperaturas de 50 y 60 °C (Ramírez *et al.*, 2006). El principal mecanismo de adaptación que han desarrollado es modificar la composición de la membrana plasmática. Estos microorganismos poseen una gran diversidad metabólica que les permite sintetizar diferentes compuestos (lípidos de cadena larga con enlaces éter, nucleósidos y poliaminas, entre otros.) que utilizan como protectantes de organelos, biomoléculas y otros, estos se insertan en la membrana plasmática proporcionando rigidez en altas temperaturas.

En la última década, los análisis de metagenómica han demostrado diversas comunidades de termófilos que prosperan en estos ambientes, sin embargo sólo unos pocos metabolitos secundarios nuevos se han aislado. A pesar de esto, los termófilos han sido de gran ayuda en diversos procesos industriales que poseen etapas que se realizan en altas temperaturas, incluyendo procesos fermentativos anaerobios para tratamiento de agua, producción de combustible, así como la eliminación de azufre del petróleo crudo (Giddings y Newman, 2015). Además, las bacterias termófilas ya se han reportado como productoras de compuestos con actividad antimicrobiana e inmunoestimulante y algunos ejemplos se presentan en las tablas II y III. Un estudio en particular es el realizado por Deepa *et al.* (2013), en el cual aislaron la bacteria *Thermoactinomyces* sp. de sedimento marino en las costas de Tamil Nadu en la India en donde la temperatura del ambiente es de 55°C. El sobrenadante de esta bacteria se fraccionó y las diferentes fracciones presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y bacterias Gram negativas como *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus*

faecalis. Por otra parte, en la tabla III se muestran dos especies de *Bacillus* y una especie de *Geobacillus thermodinitrificans* aisladas de diferentes ambientes térmicos y cuyos sobrenadantes y extractos etanólicos presentan actividad inmunoestimulante. El mecanismo de inmunoestimulación es similar, ya que inducen la producción de citocinas que corresponden a una respuesta inmune tipo Th1.

Tabla II. Bacterias de ambientes marinos térmicos con actividad antimicrobiana.

Bacteria	Ambiente (Temperatura)	Compuesto	Espectro antimicrobiano	Referencia
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Sedimento geotermal (50 °C)	Dihydrogranat icina 3	<i>Bacillus cereus</i> Gram-positive Gram-negative	Pyrek <i>et al.</i> , 1977
<i>Pseudomonas akbaalia</i>	Parque Nacional Yellowstone (45 °C)	Pyochelina 7	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Phoebe <i>et al.</i> , 2001 Combie <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lago geotermal en la Península de Kamchatka, Russia. (55 °C)	2,3dihydroxybenzoyl-glycyl-treonina	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Temirov <i>et al.</i> , 2003 Esikova <i>et al.</i> , 2002
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	Lago geotermal en el Oeste de Anatolia en Turquía (55 °C)	Sobrenadante	MR- <i>Staphylococcus aureus</i>	Uzel <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	Lago geotermal en el Oeste de Anatolia en Turquía (55 °C)	Sobrenadante	MR- <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Uzel <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Sedimento marino en Tamil Nadu, India (45 °C)	Extractos de dietil-eter	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Deepa <i>et al.</i> , 2013

MR: Resistente a metacilina.

Tabla III. Bacterias de ambientes marinos térmicos con actividad inmunoestimulante.

Bacteria	Ambiente (Temperatura)	Compuesto	Actividad inmunoestimulante	Referencia
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ventila hidrotermal somera en Copahue, Argentina. (60 °C)	2-hydroxyethyl-trisulfido	Estimuló la citotoxicidad mediada por macrófagos mediante la producción de óxido nítrico, TNF- α , IL-1 y prostaglandinas E2.	Kohama <i>et al.</i> 1993
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Ventila hidrotermal somera en Isla Volcán, Italia. (65 °C)	Sobrenadante y extractos etanólicos.	Estimuló la producción de altos niveles de IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-18 en células PBMC.	Arena <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ventila hidrotermal somera en la Isla Panarea (50 °C)	Sobrenadantes y extractos etanólicos.	Estimuló la producción de citocinas tipo Th1 en células PBMC.	Gugliandolo, 2013
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ventila hidrotermal somera en Isla Volcán, Italia. (45 °C)	Sobrenadante y extractos etanólicos.	Estimuló la producción de IL-12, IFN- γ , IFN- α , TNF- α e IL-18, pero suprimió la producción de IL-4.	Arena <i>et al.</i> , 2006 Spano <i>et al.</i> , 2015

2.6 Baja California Sur, México como fuente de compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes

México, junto con China, India, Colombia y Perú se encuentra entre los cinco países llamados "megadiversos", que en conjunto representan entre el 60% y el 70% de la biodiversidad conocida en el planeta, de la cual México representa el 12%. Esto se debe principalmente a la compleja topografía, geología, y diversos climas y microclimas que se encuentra en todo el territorio (CONABIO, 2012). Además, esta diversidad también se ve reflejada en la diversidad microbiana, que es particularmente alta en dos lugares, el Golfo de México y el Golfo de California.

En el caso del Golfo de California existen sitios caracterizados por ser ecosistemas marinos costeros con abundantes recursos biológicos, un alto nivel de endemismo y condiciones ambientales "diferentes" (hipersalino y térmico) al resto de ecosistemas costeros. Uno de los sitios es una ventila hidrotermal somera debajo de un bosque de manglar en Bahía Concepción (ambiente térmico). El otro sitio es "Laguna Ojo de Liebre" en Guerrero Negro (ambiente hipersalino). Las condiciones que presentan estos lugares permiten la exploración y explotación de microorganismos productores de diferentes compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes.

2.6.1 Salina marina en Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro

En la laguna “Ojo de Liebre”, Guerrero Negro se encuentra una salina solar marina con una superficie de más de 300 km², la cual es utilizada por la empresa Exportadora de Sal S. A. (ESSA) para la producción de sal.

El agua salada es bombeada lentamente desde la laguna hasta una serie de estanques (también llamados basos o lagunas) con un área > 1 km², poco profundos (~1 m de profundidad) y que se encuentran interconectados. Los estanques muestran un gradiente de composición química en forma de sales precipitadas (CaSO₄ o yeso, NaCl, MgCl, CaCl, KCl, SrCl, HCO₃⁻, entre otras) a medida que aumenta la evaporación del agua a través de los estanques (Javor, 1983). Esto ocasiona que existan gradientes espaciales químicos y físicos, que incluyen variaciones extremas de temperatura y salinidad en distancias relativamente cortas (Dillon *et al.*, 2009; Miller y Castenholz, 2000; Nübel *et al.*, 2001), además, los niveles de nutrientes son relativamente bajos y se ha clasificado como un ambiente oligotrófico (Javor, 1983, 1989). Estas condiciones ambientales influyen directamente en la estructura de la comunidad microbiana local ocasionando la formación de múltiples microambientes con una alta biodiversidad microbiológica (Dillon *et al.*, 2009; Miller y Castenholz, 2000; Nübel *et al.*, 2001).

Los microambientes que se han estudiado son: los tapetes microbianos presentes en los estanques concentradores y cristalizadores, y las formaciones de halita y yeso llamadas evaporitas. Los tapetes microbianos están formados por más de un millón de toneladas métricas de biomasa (~ 17 km² por ~ 6 cm por 1,2 g / cm³) que cubren el suelo de los estanques 4 y 5 en forma de una alfombra microbiana fotosintética laminada de entre 4 y 6 cm de grueso. En los primeros 2 a 3 mm de profundidad se forma una zona óxica durante el día debido a la fotosíntesis oxigénica. Entre los 3 y 6 mm de profundidad se forma una zona de baja concentración (<1.6 µM) de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y finalmente después de los 6 mm una zona con alta concentración de sulfuro de hidrógeno (> 2 µM) formado por la reducción de sulfatos. Por la noche el tapete microbiano se convierte completamente en anóxico debido al cese de la fotosíntesis. En consecuencia, la mayor parte de la actividad biológica está soportada por fermentaciones de productos fotosintéticos o por el

metabolismo del hidrógeno derivado de las fermentaciones, como la metanogénesis o la reducción de sulfatos. Por tanto, en la zona fótica se encuentran las menores concentraciones de ATP y en la superficie las mayores concentraciones de ATP, indicando que es el estrato bioquímicamente más activo (Robertson *et al.*, 2009). En este microambiente se puede encontrar una gran diversidad microbiológica. Lanza *et al.* (2013) encontraron que la cantidad de secuencias de rRNA representativas de cianobacterias (especialmente *Lyngbya spp.*, que contribuye a la fijación de N₂ (Woebken *et al.*, 2015)) debajo de los primeros 2 mm son superadas 3:1 por secuencias de bacterias verdes no del azufre principalmente del género *Chloroflexus* (bacterias filamentosas fototróficas anoxigénicas) (Nubel *et al.*, 2001), también encontraron que inmediatamente debajo de esta capa, se encuentra una zona anóxica donde encontraron secuencias de bacterias anaerobias pertenecientes a las clases δ -*Proteobacterias* y *Clostridia*, y al filo *Espirochaetes*. Además, Lanza *et al.* (2003) encontraron que algunos filotipos bacterianos parecen migrar dentro del tapete microbiano dependiendo la disponibilidad de luz. Por ejemplo, la clase δ -*Proteobacteria* (bacterias anaeróbicas reductoras de sulfatos) están presentes en la capa superior durante el día, pero están ausentes en la noche y lo contrario se presenta en las clases α -*Proteobacteria* y γ -*Proteobacteria*. Por otra parte, Javor (1984) aisló diferentes especies de bacterias halófilas como *Halobacterium* y diferentes especies de arqueas halófilas como *Haloarcula* y *Halococcus*, realizó pruebas de crecimiento en diferentes hidratos de carbono, ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, y medios complejos, demostrando que los halófilos crecen en una amplia gama de sustratos. Además, encontró que las altas concentraciones de Na⁺ y Mg₂⁺ o MgSO₄ encontradas en los estanques cristalizadores limita el crecimiento bacteriano, a diferencia del K⁺ y MgCl₂ que no tuvieron efecto (Javor *et al.*, 1986). Por otra parte, la diversidad de arqueas es aproximadamente proporcional a la profundidad. La máxima diversidad se presenta dentro de los primeros mm (zona óxica) y consiste principalmente de los miembros de la *Euryarchaeota* (actualmente no cultivables), las cuales dominan hasta una profundidad de ~26 mm (Robertson *et al.*, 2009). Sin embargo también se encuentran presentes algunos metanógenos tanto de *Euryarchaeota* como *Crenarchaeota* (Lanza *et al.*, 2003). García-Maldonado *et al.* (2015) encontraron que la comunidad de metanógenos está dominada por

el género *Methanohalophilus*, adicionalmente realizaron análisis filogenéticos del gen *mcrA* (metil coenzima-M reductasa) correspondiente a metanógenos hidrogenotróficos relacionado con el orden *Methanomicrobiales*. Dillon *et al.* (2013) encontraron la presencia de secuencias de bacterias del filo *Verrucomicrobia* y la clase *Gammaproteobacteria*, en el estanque 9. Mientras que en el estanque 11 encontraron que el 27% de las secuencias de 16S pertenecían a bacterias del filo *Bacterioidetes*, que incluían a los generos *Psychroflexus*, *Sediminibacterium*, *Owenweeksia*, y *Salinibacter*. El estanque 12 era muy similar al 11, solo difería en tener un mayor número de secuencias de bacterias sulfatoreductoras de la clase *Deltaproteobacteria*.

2.6.2 Ventila marina hidrotermal somera en Bahía Concepción

La actividad geotermal en el golfo de california se debe a una serie de fallas y fracturas geológicas ocasionadas por la interacción entre la placa de Norteamérica y la placa del Pacífico (Fig. 1). Esto ocasiona la presencia de ventilas hidrotermales profundas (>200 m de profundidad) en el Pacifico y el Golfo de California. Adicionalmente, ventilas hidrotermales someras (<200 m de profundidad) han sido reportadas en Punta Banda (Baja California), Bahía Concepción (Baja California Sur) y Punta Mita (Nayarit) (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). Particularmente, en Bahía Concepción se encuentra un sistema de fallas geológicas distribuidas de forma lineal que dan lugar a ventilas hidrotermales someras y manantiales hidrotermales (Fig. 2).

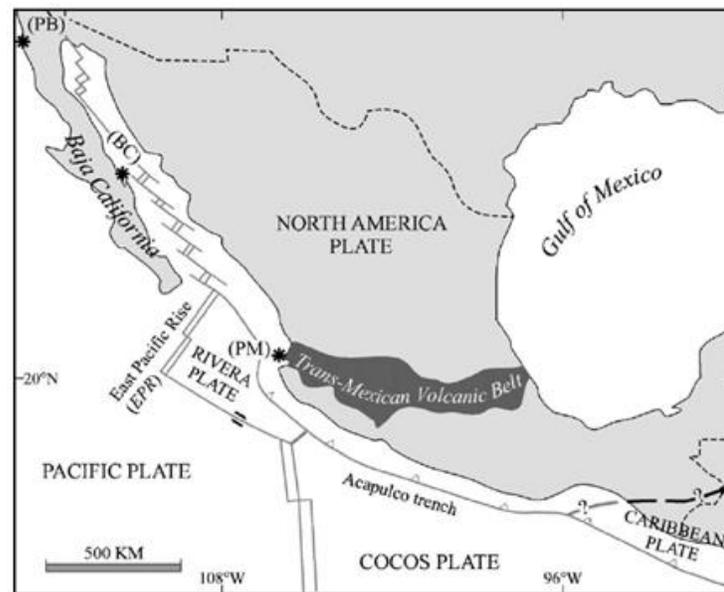


Figura 1. Placas tectónicas de la república Mexicana. Se muestran con líneas continuas el sistema de fallas sobre la costa del océano pacifico (Prol-Ledesma *et al.*, 2004).

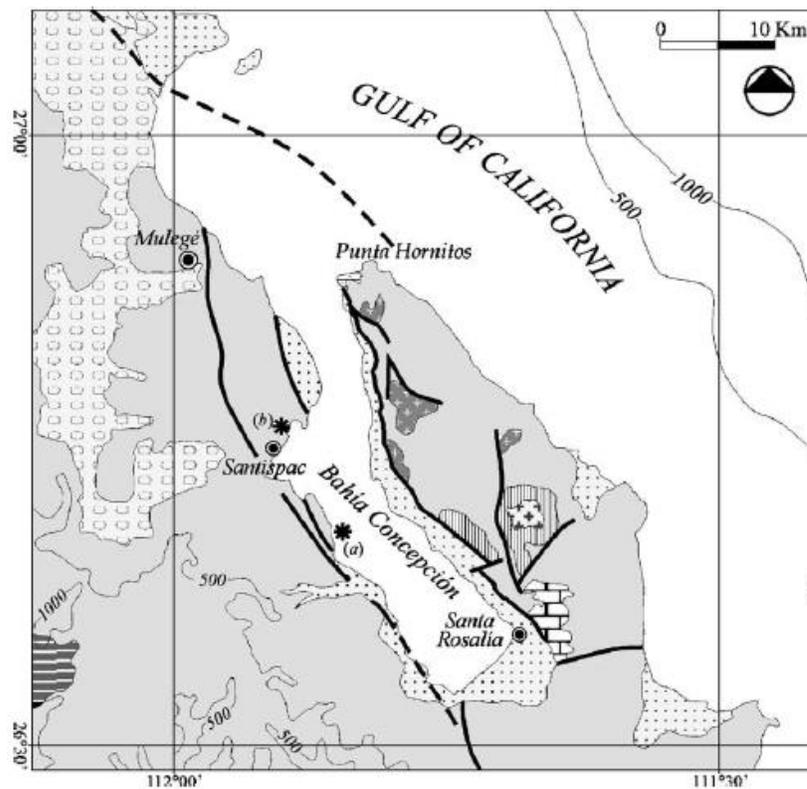


Figura 2. Sistema de fallas geológicas en Bahía Concepción (Prol-Ledesma *et al.*, 2004).

Estas ventilas liberan gases y agua termal a través del sedimento marino, el cual alcanza los 87 °C a 10 cm dentro del sedimento y los 50 °C en la superficie del fondo marino. El gas está compuesto principalmente de CO₂ (44 %) y de N₂ (54 %) con menores cantidades de CH₄ (2.2 %), Ar (0.7 %), He (0.04 %), H₂ (0.007 %) y O₂ (0.2%) (Forrest *et al.*, 2005; Prol-Ledesma *et al.*, 2004). Análisis químicos revelan que el agua esta enriquecida con Ca, As, Hg, Mn, Ba, HCO₃, Li, Sr, B, I, Cs, Fe y Si, además tiene bajas concentraciones de Cl, Na, SO₄ and Br en comparación con el agua de mar (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). El ambiente oxidante es de Eh >0.5V y está asociado a los depósitos de óxidos de hierro y manganeso (Canet *et al.*, 2005). Adicional a las ventilas, se desarrollan descargas de líquido termal (manantiales) a 62 °C a un costado de playa Santispac. El agua de mar cubre el manantial durante la marea alta (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). En este ambiente se han reportado altas concentraciones de As (13-111 mg/Kg) y Hg (0.55-25.2 mg/Kg) en muestras de sedimento. Estas altas concentraciones disminuyen rápidamente en el manglar adyacente, hasta alcanzar niveles basales (0.7-2.6 mg/Kg y 6-60 µg/Kg respectivamente) (Leal-Acosta *et al.*, 2010).

Por otra parte, las ventilas hidrotermales de entre 5 y 15 m de profundidad que se encuentran en la costa oeste de Bahía Concepción, ocasionan dos depósitos termales de forma irregular de carbonato de sílica, llamados estromatolitos (Canet *et al.*, 2005). Estos se forman en las zonas de descarga de aguas termales cloradas neutras o alcalinas, y están compuestas principalmente de sílica opalina (Rodgers *et al.*, 2004). Sin embargo, los estromatolitos de opalina también se pueden formar en manantiales ácidos con grandes cantidades de sulfuro (Jones *et al.*, 2000). Adicionalmente, una capa de carbonato de sílica fósil de 75 m ocurre a lo largo de un acantilado, adyacente al área de ventilas (Canet *et al.*, 2004). Los depósitos de carbonato están ampliamente reportados en manantiales termales subaéreos y se forman de aguas alcalinas termales que están sobresaturadas de calcita y no pueden precipitarse en condiciones ácidas (Jones *et al.*, 2000). Por otra parte, es muy extraño encontrar estos dos tipos de depósitos juntos (Campbell *et al.*, 2002). Sin embargo, en Bahía Concepción ambos depósitos (estromatolitos) están adyacentes y se encuentran finamente laminados con forma columnar, bulbosa, ondulada y con 10 cm de grosor. La

presencia de microorganismos preservados (diatomeas y posiblemente microorganismos filamentosos) permanece en ambos depósitos, lo que refleja la actividad biológica en estos lugares (Canet *et al.*, 2004). Anteriormente, el papel de los microorganismos había sido considerado pasivo en la precipitación de sílica, asumiendo que era un proceso inorgánico fisicoquímico. Sin embargo, los microorganismos favorecen la fijación y nucleación de sílica. En muchos casos, la precipitación de sílica puede ser atribuida a mecanismos bióticos y abióticos. De la misma manera, la cristalización de calcita en manantiales termales puede ser mediada por microorganismos (Canet *et al.*, 2004).

Cada uno de los ambientes que se encuentran en Bahía Concepción, genera condiciones fisicoquímicas que promueven el desarrollo de diversos microorganismos. Becerril-Espinoza *et al.* (2013) tomaron muestras de Bahía Concepción a menos de 1 km de la costa y a una profundidad de 15 m. De cada muestra obtuvieron en promedio 4.5 actinobacterias, las cuales pertenecían a los generos *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Saccharomonospora*, *Salinispora*, *Streptomyces* y *Verrucosipora*. Además, realizaron análisis filogenéticos de dominios ketosintasa asociados a genes de poliketido sintasa y encontraron secuencias de entre 55-99 % de identidad con genes de rutas metabólicas asociadas a síntesis de metabolitos secundarios. Adicionalmente, López-Cortez *et al.* (2001) describieron 4 nuevos morfotipos de cianobacterias marinas epilíticas, 2 de ellas presentes en Bahía concepción; *Dermocarpa* sp. y *Hyella* sp. Además, reportaron que los dos morfotipos más abundantes de cianobacterias pertenecían a los géneros de *Leptolyngbya* y *Synechococcus*. Po otro lado, Torres-Beltran *et al.* (2012) encontraron que el 96% de las cepas de actinobacterias que aislaron de Bahía Concepción, pertenecían al género de *Streptomyces*, y en menor proporción aislaron los generos *Micromonospora*, *Verrucosipora* y *Salinispora*. Además, realizaron extracciones acuosas/orgánicas de los sobrenadantes de los cultivos, y encontraron que tenían actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y actividad citotóxica contra células cancerígenas MCF7.

Por otra parte, Davila-Ramos *et al.* (2015) reportaron por primera vez las poblaciones bacterianas presentes en sedimentos de las ventilas hidrotermales en Bahía Concepción y las representaron en la figura 3.

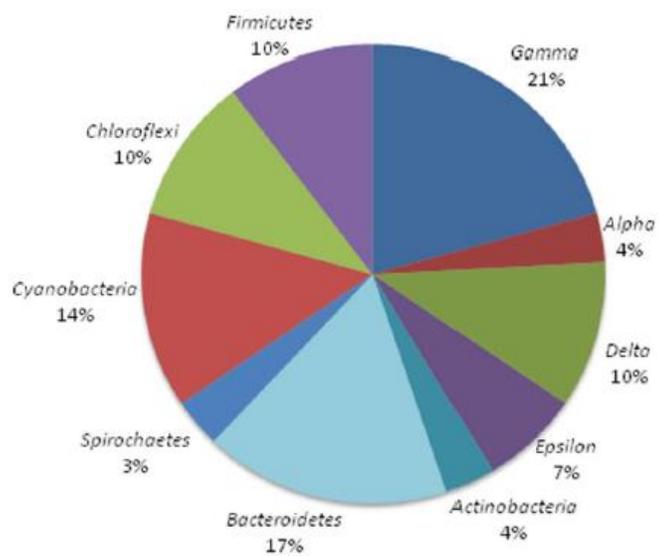


Figura 3. Contribución relativa de filos en ventilas de Bahía Concepción (Davila-Ramos *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe la necesidad de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas resistentes a los antibióticos actualmente utilizados. Por tanto, identificar y evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas drógo-resistentes y/o actividad inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos sentara la base para la creación de un cepario de bacterias con potencial biotecnológico. Estas bacterias podrán ser utilizadas en estudios posteriores de evaluación *in vivo*, purificación y caracterización de compuestos activos o ensayos de fase preclínica.

4. HIPÓTESIS

Si bacterias de ambientes marinos extremos presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas drógo-resistentes y/o actividad inmunoestimulante, entonces, bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur inhibirán el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila* y/o estimularán *in vitro* la producción de óxido nítrico, fagocitosis, especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes, sin causar citotoxicidad en leucocitos de bazo de ratón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas drógo-resistentes y actividad inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur.

5.2 Objetivos particulares

1. Aislar bacterias de ambientes marinos extremos en Baja California Sur.
2. Identificar y evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*.
3. Identificar y evaluar *in vitro* la actividad inmunoestimulante de las bacterias aisladas, en leucocitos de bazo de ratón.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Muestreo

Las muestras se tomaron en julio de 2014, diciembre de 2014, noviembre de 2015 y mayo 2016. En cada fecha se muestrearon 2 estanques de evaporación, uno a 40 ups (estación de bombeo) y otro a 80 ups (estanque No. 4) en una salina solar marina dentro de ESSA S.A. En Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México (Figs. 4 y 5). De ambos estanques se tomaron un total de 3 muestras de sedimento y 3 muestras de agua. Las muestras de sedimento se tomaron dentro de los primeros 2 cm del suelo y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml estériles. La temperatura del agua fue registrada en cada muestreo, y esta varió de 25 a 30 °C. Por otra parte, se muestreo una ventila marina hidrotermal somera situada en un bosque de manglar en Bahía Concepción, Baja California Sur, México (Figs. 4 y 6). En este lugar, se tomaron 3 muestras de sedimento a una profundidad de 1, 15 y 30 cm, y 3 muestras de la columna de agua. Adicionalmente, la temperatura se registró en cada muestreo y esta permaneció constante a 55 °C. Finalmente todas las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio para el aislamiento y cultivo de bacterias. Las muestras de la salina marina se transportaron hielo y las de la ventila hidrotermal en termos para mantener la misma temperatura (Maragvey *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 201).



Figura 4. Localización de los ambientes marinos extremos muestreados en Baja California Sur. En Laguna Ojo de Liebre (cuadro negro) se encuentra la salina solar marina y en Bahía Concepción (cuadro rojo) se encuentran las ventilas marinas hidrotermales someras.



Figura 5. Mapa de Laguna Ojo de Liebre. Se muestra la localización de la salina solar marina (cuadro rojo).



Figura 6. Mapa de Bahía Concepción. A) Playa Santispac (cuadro blanco) localizada dentro de Bahía Concepción. B) Zona de manglares y descargas termales (cuadro blanco) a un costado de playa Santispac.

6.2 Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento se tomó 1 g (sedimento) o 1 mL (agua) de cada muestra y se colocó en 9 mL de solución salina (3.5 u 8% NaCl dependiendo de la salinidad de la muestra). Esta solución fue considerada como una dilución 10^{-1} . Una segunda y tercera dilución (10^{-2} y 10^{-3}) fueron preparadas para cada muestra. Las tres diluciones fueron utilizadas para inocular (con 100 μ L) los medios de cultivo para el aislamiento de bacterias. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Medio marino (ATCC 2216) (Difco, 212 185), medio extracto de levadura y malta (ISP2) (Sigma, Y3127) (Hong *et al.*, 2009), medio M2 (glicerol 6 mL / mL, arginina 1 g / L, K_2HPO_4 1 g / L, $MgSO_4$ 0,5 g / L) (Mincer *et al.*, 2002), medio M4 (L-asparagina 0.1 g / L, K_2HPO_4 0.5 g / L, $FeSO_4$ 0.001 g / L, $MgSO_4$ 0.1 g / L, peptona 2 g / L, propionato de sodio 4 g / L) (Zhang *et al.*, 2009), medio M6 (almidón 20 g / L, $CaCO_3$ 2 g / L, K_2HPO_4 0,5 g / L, $MgSO_4$ 0,5 g / L) (Yong *et al.*, 2013), medio mínimo mineral (M9) (Sigma, M6030) (Zhing *et al.*, 2014), medio Sagel y Gibbons (SG) (KCl 2 g / L, $MgSO_4$ 20 g / L, citrato de sodio 3 g / L, casaminoácidos 7,5 g / L, extracto de levadura 10 g / L) (Javor *et al.*, 1984), medio luria bertani (Difco, 24023)

(Hamaki *et al.*, 2005; Selva *et al.*, 2013), medio soya y tripticaseína (TSA o TSB) (Mobio, 12114-05) (Montero *et al.*, 2012), y medio almidón-caseína (SC) (Hong *et al.*, 2009).

Las placas inoculadas se incubaron a 30 °C durante 96 h y 55 °C durante 96 h, para las muestras de la salina marina en Laguna Ojo de Liebre y la ventila hidrotermal en Bahía Concepción respectivamente. Los aislados se seleccionaron con base en sus características morfológicas macroscópicas mediante el uso de un microscopio estereoscopio. Posteriormente se tomó cada aislado y se colocó en una nueva placa con el medio correspondiente. Los aislados puros (axénicos) fueron sub-cultivados y crio preservados en 15% de glicerol a -80 °C (Ramesh *et al.*, 2009).

6.3 Metodología para objetivo particular 2.

Identificar y evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*.

6.3.1 Bacterias patógenas

Staphylococcus aureus resistente a meticilina RM01 fue donado del Laboratorio Estatal de Salud Pública de BCS. Ambas cepas, *Salmonella typhimurium* UG03 y *Escherichia coli* enterotoxigénica UG01 se obtuvieron de la colección de la Universidad de Guadalajara y *Aeromonas hydrophila* 135 se obtuvo de la colección de CIBNOR.

7.3.2 Obtención del sobrenadante de aislados

Los aislados se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contenía 1 mL de medio (el mismo que se utilizó para el aislamiento de cada bacteria) y se incubó a 200 rpm en un ángulo de 45° durante 96 h a su respectiva temperatura de aislamiento. Posteriormente cada cultivo se centrifugó a 5000xg por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a -80 °C

hasta su uso (Ballav *et al.*, 2014; Balouiri *et al.*, 2016; Graca *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2009; Selvin *et al.*, 2009).

6.3.3 Curva de crecimiento de bacterias patógenas en los medios de aislamiento

Una colonia del cultivo de cada bacteria patógena se inoculó en caldo de Mueller-Hinton (Difco) y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración celular se ajustó a 1×10^8 células / mL comparando con una solución de 0,5 McFarland y se diluyó 1:40 para obtener una concentración de 2.5×10^6 células / mL. De la suspensión resultante, 20 μ L se colocaron en una microplaca NUNC-C con 80 μ L de medio de cultivo líquido (medio (s) que se utilizó (aron) para cultivar los aislados). La concentración inicial de células fue 5×10^5 células/mL. Posteriormente, se incubó la microplaca y se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm durante 24 h en intervalos de 1 h en un lector de microplacas. Como control se utilizó medio Muller-Hinton sin bacterias patógenas. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se representaron gráficamente (tiempo contra densidad óptica a 600 nm) con los promedios y desviaciones estándar para cada tiempo. Posteriormente, se identificó visualmente el tiempo de fase exponencial tardía para medir la actividad antimicrobiana. Una vez medida la actividad antimicrobiana, se ajustó la tendencia de las curvas (únicamente de los medios de cultivo de los aislados seleccionados) con los siguientes modelos de regresión no lineal:

Modelo de Richardz (Zwietering *et al.*, 1990)

$$L(t) = L\alpha \left(1 + \frac{1}{D} * \exp^{-k*(T-t)} \right)^{-D} \quad [1]$$

Modelo Logístico (Zwietering *et al.*, 1990)

$$L(t) = L\alpha \left(1 + \exp^{-k*(T-t)} \right)^{-1} \quad [2]$$

Se evaluó el ajuste de las curvas, calculando la suma de cuadrados de los residuos (SCR) y el coeficiente de determinación (R^2). Con base en los parámetros cinéticos de la curva que presentó el mejor ajuste se seleccionó el tiempo de medición para corroborar el ensayo de actividad antimicrobiana (CLSI, 2012; Hong *et al.*, 2009).

7.3.4 Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución líquido

La actividad antimicrobiana de los aislados se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina RM01, *Escherichia coli* enterotoxigénica UG01, *Salmonella typhimurium* UG03 y *Aeromonas hydrophila* 135. Una colonia de cada especie de bacteria patógena se inoculó en caldo de Mueller-Hinton (Difco) y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración celular se ajustó a 1×10^8 células / mL con una solución de 0,5 McFarland y se diluyó 1:40 para obtener una concentración de 2.5×10^6 células / mL. De la suspensión resultante, 20 μ L se colocaron en una microplaca NUNC-C con 80 μ L del sobrenadante de los aislados. La concentración inicial de células fue 5×10^5 células/mL. Posteriormente, se incubó la microplaca y se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un lector de microplacas Varioskan (Thermo Fisher Scientific) al tiempo de fase exponencial tardía identificado para cada especie de bacteria patógena en las curvas de crecimiento de la sección anterior. Como control negativo se utilizó la suspensión ajustada de bacterias patógenas mas medio de cultivo (el mismo en el que se encuentren los sobrenadantes) y como control positivo gentamicina 6.25 μ g/mL. El ensayo se realizó por triplicado (CLSI, 2012). Los resultados se presentaron como la media más la desviación estándar. Los aislados cuyos sobrenadantes inhibieron la mayor cantidad de especies de bacterias patógenas fueron seleccionados para la identificación molecular.

6.3.5 Identificación de los aislados con act. Antimicrobiana

6.3.5.1 Amplificación del gen 16S ARNr

Se realizó la extracción del ADN genómico de cada aislado seleccionado, por el método fenol:cloroformo:isoamil alcohol. El ADN obtenido se cuantificó en un NanoDrop 2000 y se evaluó su pureza con las relaciones 260/280 y 260/230. Posteriormente, se ajustó la concentración a 100 ng/ μ L. La secuencia del gen 16S ARNr se amplificó utilizando pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') como cebador forward y pH* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') como cebador reverse (Hutson *et al.*, 1993). La mezcla de reacción para PCR consistió en buffer 1x PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs mix, 0.5 μ M de cada cebador, 0.03 U/ μ L de Taq polimerasa (Kit Invitrogen) y 0.25 μ L de 100 ng/ μ L de ADN. El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C durante 4 min; 30 ciclos de 94 °C durante 45 s, 56 °C durante 45 s, y 72 °C durante 1 min; y una etapa de extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR y las extracciones de ADN genómico se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X a 100 V con un tiempo de corrida de 45 min. Las bandas se visualizaron con un foto documentador (Biorad). El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó (~ 1,6 Kb) utilizando el marcador molecular de ADN 1 kb plus estándar (Norgen BioTek Corporation, Canadá) y se mandaron a secuenciar (Genewiz). Las secuencias del gen 16S RNAr se analizaron por medio de un análisis de identidad con la herramienta BLASTn de NCBI, seleccionando las secuencias con mayor porcentaje de identidad y puntaje del alineamiento (Broda *et al.*, 1999).

6.3.5.2 Análisis filogenético del gen 16 ARNr

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S RNAr por Clustal W con el programa MEGA versión 7.0. Posteriormente, se construyó un árbol filogenético con el método estadístico de Neighbor joining, el cual fue evaluado con un análisis bootstrap de

1000 réplicas. La matriz de distancias se generó con el modelo de 2 parámetros de Kimura y como raíz se utilizó la secuencia parcial del gen 16S ARNr de *Halobacterium salinarum* JCM 8978 (Hong *et al.*, 2009).

6.3.5.3 Tinción de Gram

Se tomó una colonia de cada aislado y se realizó un frotis en un portaobjetos de vidrio. Posteriormente, se tiñó con cristal violeta y lugol por 1 min, enjuagando entre cada solución. Después, se decoloro con alcohol:acetona (1:1) y se tiñó con safranina como colorante de contraste. Se dejó secar al mechero y se observó en un microscopio óptico (Javor *et al.*, 1986).

Con base en los resultados de la identificación molecular, características morfológicas macroscópicas y microscópicas se realizó la asignación taxonómica para cada aislado seleccionado. Aquellos aislados que no estaban reportados como bacterias patógenas fueron seleccionados para evaluar su actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena.

6.3.6 Actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena.

Se tomó una colonia de cada bacteria patógena, se inoculó en caldo de Mueller-Hinton (Difco) y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración celular se ajustó a 1×10^8 células/mL comparando con una solución de 0,5 McFarland y se diluyó 1:40 para obtener una concentración de 2.5×10^6 células/mL. De la suspensión resultante, 20 μ l se colocaron en una microplaca NUNC-C con 80 μ L de sobrenadante de los aislados seleccionados. La concentración inicial de células fue 5×10^5 células/mL. Posteriormente, se incubó la microplaca a 37 °C por 24 h y se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific). Como control negativo se utilizó la suspensión ajustada de bacterias patógenas más medio de cultivo (el mismo en el que se encontraban los sobrenadantes) y como control positivo gentamicina 6.25 μ g/mL. El ensayo se realizó por triplicado (CLSI, 2012). Los aislados cuyos sobrenadantes inhibieron la mayor cantidad de

cepas de cada bacteria patógena y que presentaron el mayor porcentaje de inhibición fueron seleccionados para realizar curvas de inhibición para evaluar el comportamiento de los patógenos en presencia de los sobrenadantes, a través del tiempo.

6.3.7 Curvas de inhibición de aislados seleccionados contra bacterias patógenas

Se tomó una colonia de cada bacteria patógena, se inoculó en caldo de Mueller-Hinton (Difco) y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración celular se ajustó a 1×10^8 células/mL comparando con una solución de 0,5 McFarland y se diluyó 1:40 para obtener una concentración de 2.5×10^6 células/mL. De la suspensión resultante, 20 µL se colocaron en una microplaca NUNC-C con 80 µL de sobrenadante de los aislados seleccionados. La concentración inicial de células fue 5×10^5 células/mL. Posteriormente, se incubó la microplaca a 37 °C y se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm por 24 h en intervalos de 2 h en un lector de microplacas Varioskan (Thermo Scientific). Como control negativo se utilizó la suspensión ajustada de bacterias patógenas más medio de cultivo (el mismo en el que se encontraban los sobrenadantes) y como control positivo gentamicina 6.25 µg/mL. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se graficaron: tiempo (t) contra concentración celular (células/mL) (CLSI, 2012). Para realizar el conteo celular se utilizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de *Escherichia coli* y se graficó contra densidad óptica.

6.4 Metodología para objetivo particular 3

Identificar y evaluar *in vitro* la actividad inmunoestimulante de las bacterias aisladas, en leucocitos de ratón.

6.4.1 Preparación e inactivación de aislados

Las células de los aislados se obtuvieron por centrifugación a 5000xg por 10 min a 4 °C. El pellet se lavó dos veces con PBS (pH 7.2) y se resuspendió en 500 µL de PBS. Posteriormente se ajustó la concentración celular a 1×10^8 células/mL con una solución 0.5 Estándar de Mcfarland. Finalmente, se inactivaron las células a 80 °C por 1 h y se almacenaron a 4 °C hasta la realización de los ensayos (Kamilya *et al.*, 2015).

6.4.2 Obtención de leucocitos de bazo de ratón

Los ratones que se utilizaron fueron *Mus musculus* (ratón blanco). Estos se colocaron en una cámara de gas con cloroformo 100% por 2 min. Posteriormente, se obtuvo el bazo con ayuda del equipo de disección y se homogenizó/filtró en medio RPMI/Heparina 11.42 Ug/mL dentro de un tubo Falcon (50 mL) con un filtro de 100 µm y con la ayuda del embolo de una jeringa hasta un volumen de 10 ml. Las células de bazo se centrifugaron a 700xg durante 10 min a 10 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento (pellet) obtenido se re suspendió en 5 ml de ACK (cloruro de amonio/Base Trizma) y se incubó a 4 °C (hielo) por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 700xg/10 min/ 10 °C y el sedimento (pellet) se resuspendió en 10 mL de medio RPMI/suero fetal bovino 10 %. La suspensión de leucocitos obtenida se cuantificó por exclusión con azul de tripano. Para esto, se mezclaron 10 µL de azul de tripano con 10 µL de la suspensión de leucocitos y se colocaron en un TC20 (Biorad). Finalmente, se ajustó la concentración celular a 2×10^6 células/mL para los ensayos *in vitro* (Rachmawati *et al.*, 2014).

6.4.3 Ensayo de producción de óxido nítrico

Para evaluar el potencial inmunoestimulante de los aislados, se cuantificó la producción de óxido nítrico (ON) de leucocitos de bazo de ratón, tratados con los aislados. Se mezclaron 100 μL de leucocitos de bazo ajustados a 2×10^6 células/mL con 40 μL de las células inactivadas de los aislados y ajustadas a 1×10^8 células/mL. Se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% CO_2 . Posteriormente, se mezclaron en otra microplaca, 100 μL de los leucocitos tratados más 100 μL del reactivo de Griess (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm usando un lector de microplacas Varioskan (Thermo Scientific). La absorbancia obtenida se interpoló en una curva estándar de nitrito de sodio (NaNO_2) y se obtuvo la concentración de ON. Como control negativo se utilizó PBS (pH 7.2). El ensayo se realizó por triplicado (Kmoní'ckova *et al.*, 2007).

Los aislados que indujeron la mayor producción de ON en los leucocitos de bazo de ratón fueron seleccionados para su identificación molecular por amplificación del gen 16S del ARNr. Una vez realizada la identificación, aquellos aislados que estaban reportados como patógenos fueron descartados. Los que no se descartaron fueron seleccionados para evaluar su posible citotoxicidad en los leucocitos de ratón.

6.4.4 Evaluación de citotoxicidad

Para determinar el efecto de los aislados seleccionados en la viabilidad (citotoxicidad) de los leucocitos se utilizó el ensayo colorimétrico MTT. Los leucocitos de bazo de ratón se cultivaron con los aislados seleccionados, por 24 h a 37 °C en 5 % CO_2 . Posteriormente, se mezcló 10 μL de MTT 5 mg/mL y se incubó por 4 h a 37 °C en 5 % CO_2 . Después, se añadieron 100 μL de HCl-isopropanol y se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de micro placas Varioskan (Thermo Scientific). Como control negativo se utilizó PBS (pH 7.2) y como control positivo DMSO 100%. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de células viables con respecto al control negativo (Arena *et al.*, 2006; Mosman *et al.*, 1983).

Los aislados que no disminuyeron la viabilidad de los leucocitos de bazo de ratón con respecto al control negativo (PBS pH 7.2) fueron seleccionados para evaluar la actividad fagocítica, explosión respiratoria y enzimas antioxidantes de los leucocitos tratados.

6.4.5 Evaluación de la actividad fagocítica

La fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* por los leucocitos de bazo de ratón tratados con las células inactivadas de los aislados seleccionados se evaluó por citometría de flujo. Se mezclaron 100 μL de leucocitos de bazo ajustados a 2×10^6 células/mL con 40 μL de células de los aislados y ajustadas a 1×10^8 células/mL. Se incubaron por 24 h a 37°C con 5% CO_2 . Posteriormente, se mezclaron 100 μL de los leucocitos tratados con 60 μL de levaduras marcadas con DTAF en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugó a $700 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente y después se incubó 25 min a 25°C en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se filtró en tubos FACS con filtros de $40 \mu\text{m}$ y se agregó 400 μL de PBS (pH 7.2) frío para detener la fagocitosis. Finalmente se agregó 50 μL de azul de tripano filtrado y se leyó en un citómetro de flujo (Biorad). Alícuotas de referencia de *S. cerevisiae* marcadas con DTAF y leucocitos de bazo se incluyen en cada ensayo de fagocitosis (Reyes-Becerril *et al.*, 2011); el ensayo se realizó por triplicado. Como control negativo se utilizó PBS (pH 7.2) y como control positivo 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS de *E. coli*.

6.4.6 Evaluación de explosión respiratoria

Para evaluar la explosión respiratoria se mezclaron 100 μL de células de bazo ajustadas a 2×10^6 cel/mL con 40 μL de células de los aislados inactivadas y ajustadas a 1×10^8 cel/mL. Se incubaron por 24 h a 37°C con 5% CO_2 . Las células tratadas se centrifugaron a $1000 \times g$ por 1 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 100 μL de reactivo NBT (1 mg/mL) y se dejó incubando por 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez incubado, se centrifugó en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Se añadió 100 μL de metanol 70 % y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó nuevamente (mismas condiciones) y se añadió 120

μL de KOH 2M y 140 μL de DMSO. Finalmente, se colocaron 200 μL en una microplaca y se leyó la absorbancia a 655 nm. Como control negativo se utilizó PBS y como control positivo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *E. coli*; el ensayo se realizó por triplicado (Sankar *et al.*, 2016).

6.4.7 Evaluación de enzimas antioxidantes

6.4.7.1 Evaluación de superóxido dismutasa (SOD)

Se mezclaron 100 μL de células de bazo ajustadas a 2×10^6 cel/mL con 40 μL de células de los aislados inactivadas y ajustadas a 1×10^8 cel/mL. Se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% CO_2 . La actividad de la enzima superóxido dismutasa en las células tratadas se evaluó con el kit SOD Determination Kit (Sigma 19160). El cual se basa en la reducción del reactivo WST-1 (sal de tetrasolio soluble en agua) por el anión superóxido, que tiene un máximo de absorbancia a 450 nm en estado reducido. Como control negativo se utilizó PBS y como control negativo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS de *E. coli*; el ensayo se realizó por triplicado (19160 SOD Kit Sigma).

6.4.7.2 Evaluación de mieloperoxidasa

Se mezclaron 100 μL de células de bazo ajustadas a 2×10^6 cel/mL con 40 μL de células de los aislados inactivadas y ajustadas a 1×10^8 cel/mL. Se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% CO_2 . Posteriormente, se mezcló 20 μL de las células tratadas con 100 μL de TMB (1 pastilla en 40 mL de H_2O destilada más 10 μL de H_2O_2 37 %) en oscuridad. Se incubó 30 min y se detuvo la reacción con 50 μL de H_2SO_4 2M y se leyó rápidamente en el espectro a 450 nm. Como control negativo se utilizó PBS y como control negativo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS de *E. coli*; el ensayo se realizó por triplicado.

6.4.7.3 Evaluación de catalasa

Se mezclaron 100 μL de células de bazo ajustadas a 2×10^6 cel/mL con 40 μL de células de los aislados inactivadas y ajustadas a 1×10^8 cel/mL. Se incubaron por 24 h a 37°C con 5% CO_2 . Posteriormente, se mezclaron 50 μL de las células tratadas con 25 μL de buffer diluted (Buffer de fosfatos pH 7 diluido 1:10 en agua grado HPLC), 25 μL de metanol absoluto y 5 μL de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (diluido en agua grado HPLC) en oscuridad. Se incubó 20 min a temperatura ambiente y en agitación. Después, se agregó 25 μL de KOH 10M y 50 μL de reactivo de purpald 46 mM y se incubó 10 min a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo, se agregó 25 μL de KIO_4 192 mM para incubarse 5 min a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se leyó la absorbancia a 655 nm. Como control positivo se utilizó PBS y como control negativo 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS de *E. coli*; el ensayo se realizó por triplicado.

6.5 Análisis estadísticos

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro y pruebas de homogeneidad de varianzas por Fligner. Posteriormente, se aplicaron análisis varianza (ANOVA) de una vía y pruebas de comparación de medias por Tukey con α : 0,05. El software utilizado fue Sigmaplot. Particularmente, para las curvas de crecimiento de los patógenos en los medios de cultivo se el ajuste, calculando la suma de cuadrados de los residuos (SCR) y el coeficiente de determinación (R^2).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de bacterias

El número total de aislados fue de 340 de los cuales 267 se obtuvieron de la salina marina y 73 de la ventila hidrotermal. En la salina marina se obtuvieron más aislados del estanque a 40 ups (146) que del estanque a 80 ups (121). Así mismo, el medio de cultivo con mayor número de aislados fue el medio 2216 con 60, seguido del medio ISP2 con 39. En contraste, el medio con menor número de aislados fue M4 con 6, seguido de M9 con 14. Cabe destacar, que en ambos sitios se obtuvieron más aislados en sedimento que en agua (Tabla IV).

En la ventila hidrotermal, se obtuvieron más aislados en las muestras de sedimento que en las muestras de agua. Además, en las 3 muestras de sedimento se obtuvo un número similar de aislados. En lo que respecta a los medios de cultivo, el medio donde se obtuvieron más aislados fue TSB (34) y el medio con menos aislados fue M2 (0) (Tabla V).

Tabla IV. Número de aislados obtenidos de la salina marina.

Sitio de muestreo	Salinidad (ups)	No. *	Medios de cultivo									
			Número de aislados									
			2216	ISP2	M2	4M	M6	M9	SG	SC	Lb	M4
Estación de bombeo ^A	40	64	10	7	11	8	12	3		9	4	
Estación de bombeo ^S	40	82	18	13	9	7	4	8		9	8	6
Área 4 ^A	80	35	12	15			4		4			
Área 4 ^S	80	86	20	4		9	7	3	24	11	8	
Total		267	60	39	20	24	27	14	28	29	20	6

^SMuestra de sedimento; ^AMuestra de agua; *Número de aislados.

Tabla V. Número de aislados obtenidos de la ventila hidrotermal.

Muestra (Profundidad)	No.*	Medios de cultivo				
		Número de aislados				
		2216	ISP2	M2	TSB	Lb
Sedimento (30 cm)	22	4	1		13	4
Sedimento (15 cm)	17	2	2		9	4
Sedimento (1cm)	23	5	3		12	3
Agua	11	6	5			
Total	73	17	11	-	34	11

*Número de aislados

7.2 Resultados para objetivo particular 2.

Identificar y evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*.

7.2.1 Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas en los medios de aislamiento

Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de los aislados por la técnica de microdilución en líquido, fue necesario realizar curvas de crecimiento de las bacterias patógenas en los medios donde se cultivaron los aislados. En total se realizaron 116 curvas de crecimiento, las cuales incluyeron 29 medios de cultivo y las 4 especies de bacterias patógenas. En los medios ISP2 (8% NaCl), M4 (8% NaCl), M6 (8% NaCl), M9 (8% NaCl) y SC (8% NaCl) no creció ninguna de las bacterias patógenas. Por tanto, los aislados que se obtuvieron de estos medios no se evaluaron en el ensayo de actividad antimicrobiana. Cabe destacar que todas las bacterias, excepto *S. aureus* RM01 mostraron un patrón de crecimiento similar, ya que no pudieron crecer en los medios ajustados a 8% NaCl a excepción del medio 2216. Por otra parte, en los medios Lb y SG (8% NaCl) solo pudo crecer *S. aureus* RM01, por tanto los aislados que se obtuvieron de estos dos medios únicamente se pudieron evaluar contra *S. aureus* RM01.

Tabla VI. Tiempos de fase exponencial tardía de las bacterias patógenas.

Medio de cultivo	NaCl (%)	Bacterias patógenas			
		<i>S. aureus</i> <i>RM01</i>	<i>E. coli</i> <i>UG01</i>	<i>S. typhimurium</i> <i>UG03</i>	<i>A. hydrophila</i> <i>135</i>
2216	3.5	E	24	24	24
2216	4	E	24	24	24
2216	8	22	24	24	N
ISP2	3.5	N	12	18	E
ISP2	4	N	12	18	E
ISP2	8	N	E	N	N
Lb	3.5	24	18	16	E
Lb	4	24	18	16	E
Lb	8	19	E	N	N
M2	4	16	20	18	18
M4	4	E	24	16	16
M4	8	N	N	N	N
M6	4	24	12	24	E
M6	8	E	N	N	N
M9	4	E	16	16	16
M9	8	E	N	N	N
SC	4	20	24	18	E
SC	8	N	N	N	N
SG*	8	20	N	N	N
TSB	-	16	16	24	16

*Medios que solo se probarán con un patógeno; Negritas: Medios que no se probarán; E: crecimiento escaso menor a 0.1 de D.O; N: no creció.

Los tiempos de fase exponencial tardía de la tabla VI se establecieron como los tiempos de incubación para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes, como prueba de tamizaje. Después de realizar el tamizaje y seleccionar los sobrenadantes, se ajustaron las tendencias de las curvas de las bacterias patógenas para corroborar el ensayo de actividad antimicrobiana, únicamente se ajustaron las curvas de los medios Lb (3.5% NaCl), M4 (4% NaCl), SC (4% NaCl), 2216 (8% NaCl) y TSB, ya que corresponden a los medios donde se obtuvieron los aislados que presentaron actividad antimicrobiana. En la tabla VII se presentan los parámetros estadísticos de los modelos de regresión no lineal que se aplicaron para el ajuste. Con base en estos parámetros, se seleccionó el modelo que presentó un mejor ajuste de los datos. Cabe destacar que la mayoría de las curvas presentaron un mejor ajuste con el Modelo de Richardz, ya que mostraron los valores más altos del coeficiente de determinación (R^2) y menor suma de cuadrados de los residuales (SCR). Particularmente

las curvas de *S. aureus* RM01 en medio Lb y *A. hydrophila* 135 en medio Lb y M4 (4% NaCl) se ajustaron mejor con el Modelo logístico.

Tabla VII. Parámetros estadísticos de los modelos de regresión no lineal.

Medio (NaCl)	Modelo	Parámetro	<i>S. aureus</i> RM01	<i>E. coli</i> UG01	<i>S. typhimurium</i> UG03	<i>A. hydrophila</i> 135
Lb (3.5%)	R	R ²	0.9638	0.9925	0.9955	0.9914
		SCR	0.0155	0.0143	0.0108	0.0363
	L	R ²	0.9738	0.9914	0.9924	0.9942
		SCR	0.0112	0.0164	0.0184	0.0241
M4 (4%)	R	R ²	0.9734	0.9834	0.9794	0.9664
		SCR	0.005	0.018	0.0213	0.02
	L	R ²	0.9645	0.9805	0.9738	0.9774
		SCR	0.006	0.0212	0.0272	0.0134
2216 (8%)	R	R ²	0.9282	0.9741	0.9722	-
		SCR	0.0715	0.0147	0.0118	-
	L	R ²	0.9283	0.9733	0.9719	-
		SCR	0.0716	0.0151	0.0119	-
SC (4%)	R	R ²	0.9874	0.9855	0.9952	0.9758
		SCR	0.0131	0.0152	0.0073	0.0085
	L	R ²	0.9869	0.985	0.9895	0.9748
		SCR	0.0137	0.0157	0.0163	0.0088
TSB	R	R ²	0.9884	0.9909	0.9763	0.9984
		SCR	0.015	0.0642	0.1067	0.0125
	L	R ²	0.9774	0.9877	0.965	0.9983
		SCR	0.031	0.0864	0.1578	0.0135

R: Modelo de Richardz, L: Modelo logístico, R²: Coeficiente de determinación, SCR: Suma de cuadrados de residuales. Valores en negritas representan el modelo con mejor ajuste.

Los parámetros cinéticos de las curvas se muestran en la tabla VIII, en donde las bacterias a excepción de *S. aureus* RM01 presentaron un comportamiento similar, ya que presentaron mayor crecimiento poblacional (asíntota superior o L_{α}) en los medios Lb y TSB, los cuales no se suplementaron con NaCl, que en los medios que se suplementaron con 4 y 8% de NaCl. Adicionalmente, el tiempo al que se alcanzó la fase exponencial tardía (punto de inflexión en las curvas o “t”) fue menor en las curvas de los medios Lb y TSB, y mayor en los medios suplementados con 4 y 8% de NaCl. En cuanto a *S. aureus* RM01, presentó

mayor crecimiento poblacional y menor tiempo de fase exponencial tardía en los medios 2216 (8% NaCl) y SC (4% NaCl).

Tabla VIII. Parámetros cinéticos de las curva de crecimiento ajustadas.

Medio	Parámetros	<i>S. aureus</i> RM01	<i>E. coli</i> UG01	<i>S. typhimurium</i> UG03	<i>A. hydrophila</i> 135
Lb	$L\alpha$	0.316	0.633	0.879	0.831
	k	0.267	0.269	0.131	0.648
	t	10.614	5.813	9.409	7.593
	D	-	60561	60560	-
M4 (4% NaCl)	$L\alpha$	0.203	0.526	0.425	0.380
	k	0.595	0.173	8.309	0.268
	t	16.275	9.095	15.704	13.714
	D	0.170	6.964	0.020	-
2216 (8% NaCl)	$L\alpha$	0.435	0.454	0.414	-
	k	0.253	0.264	0.178	-
	t	9.399	15.963	11.42	-
	D	0.841	0.409	0.699	-
SC (4% NaCl)	$L\alpha$	0.468	0.466	0.524	0.298
	k	0.356	0.359	0.841	0.248
	t	11.073	10.941	13.249	6.422
	D	0.641	0.650	0.235	2.003
TSB	$L\alpha$	0.423	1.185	1.001	1.163
	k	1.572	0.240	0.152	0.466
	t	14.715	7.482	10.784	8.344
	D	0.120	10.09	3.870	1.335

$L\alpha$: Asíntota superior, k: Constante de crecimiento, t: Punto de inflexión en X, D: Punto de inflexión en y.

De igual manera, las curvas de crecimiento de la figura 7 muestran el mismo comportamiento observado en la tabla VIII. Las bacterias a excepción de *S. aureus* RM01, muestran mayor crecimiento poblacional en los medios Lb y TSB que en los medios suplementados con NaCl. Particularmente, en el medio TSB fue donde se observó mayor crecimiento. Además, *S. aureus* RM01 (Fig. 7A) presentó mayor crecimiento en los medios 2216 (8% NaCl), SC (4% NaCl) y TSB. Por otra parte, en la mayoría de las curvas a excepción de *S. typhimurium* UG03 en medio M4 (4% NaCl) y *A. hydrophila* 135 en los medios TSB y Lb, las fases típicas de una curva de crecimiento no están bien definidas.

Debido a esto, el punto de inflexión calculado con los modelos de regresión no lineal (Tabla VIII) muestra un tiempo menor al que se observa en las curvas (Fig. 7). Por tanto, el tiempo que se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana fue de 24 horas, es decir el momento al que se alcanzó la asíntota superior (máximo crecimiento) mas no en el punto de inflexión (fase exponencial tardía).

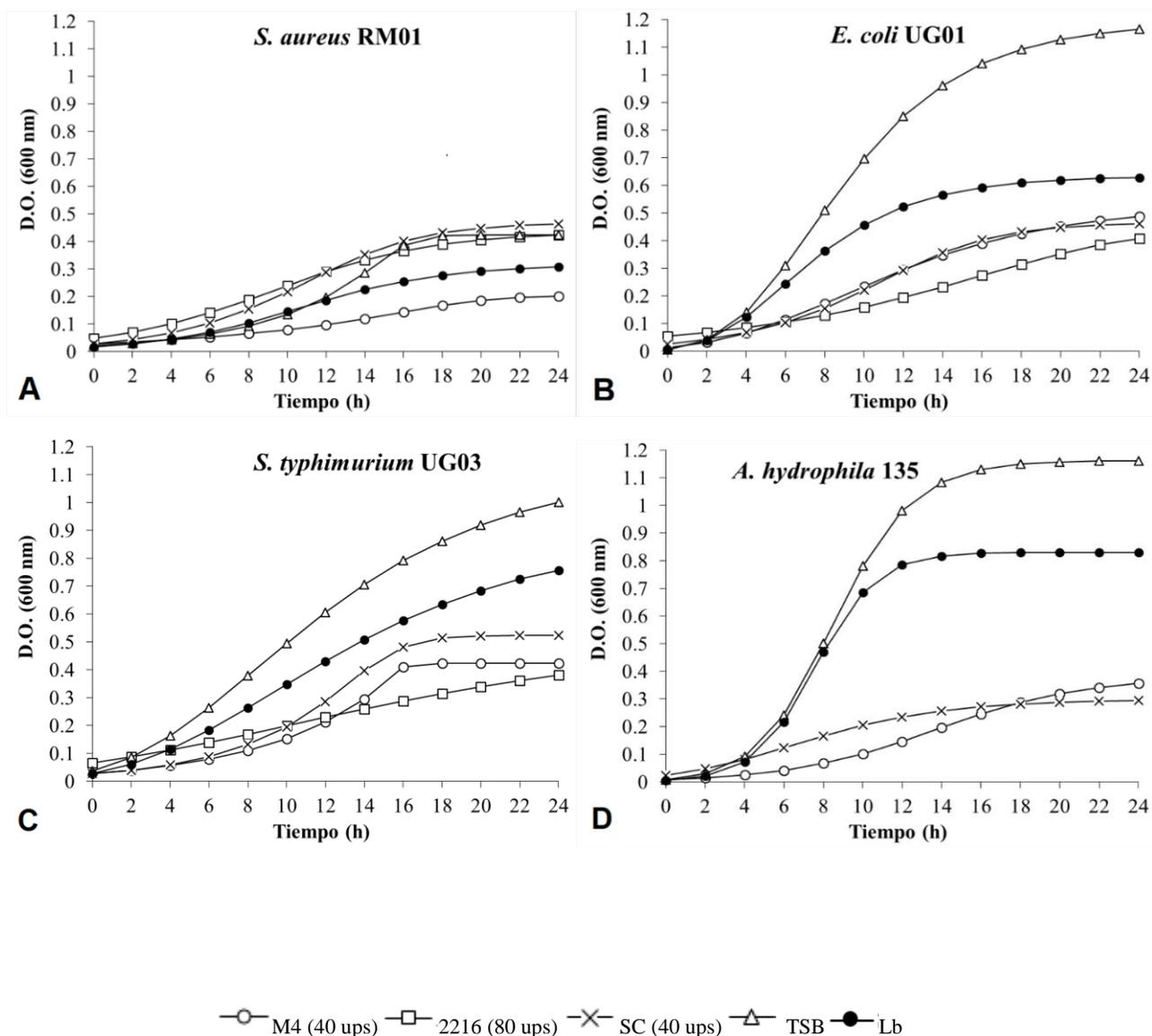


Figura 7. Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas.

7.2.2 Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución líquido

De los 267 aislados evaluados, 15 presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una de las cuatro bacterias patógenas (Tabla IX). Particularmente, los sobrenadantes de los aislados VSF 383A, VSF 383B, VSF 459A y VSF 459B cultivados por 168 horas lograron inhibir a las 4 especies de bacterias patógenas. Específicamente los aislados VSF 383A, VSF 383B y VSF 459B inhibieron más del 90 % del crecimiento de las 4 especies de bacterias patógenas. Por otro lado, los aislados VSM 475A, VSM 475B, SA4 57A, SA4 57B y SA4 29 inhibieron el crecimiento de 3 especies de bacterias patógenas, entre ellas: *S. aureus* RM01, *S. typhimurium* UG03 y *A. hydrophila* 135; A excepción del aislado SA4 29 que no inhibió a *A. hydrophila* 135 pero si a *E. coli* UG01. En cambio, los aislados SA4 36B y SEB 706 inhibieron el crecimiento de 2 especies de bacterias patógenas: *S. aureus* RM01 y *A. hydrophila* 135. Finalmente, los aislados SA4 36A, SA4 40, SEB 735 y SEB 727 inhibieron el crecimiento de una especie de bacteria patógena.

Tabla IX. Actividad antimicrobiana de los aislados contra al menos una bacteria patógena.

Aislado	Tiempo (h) ^A	Bacterias patógenas			
		<i>S. aureus</i> RM01	<i>E. coli</i> UG01	<i>S. typhimurium</i> UG03	<i>A. hydrophila</i> 135
VSF 383A	96	54.24 ± 27.45	-	36.12 ± 0.34	99.5 ± 0.25
	168	99.44 ± 0.82	92.8 ± 11.84	92.67 ± 7.04	100.2 ± 0.14
VSF 383B	96	75.61 ± 29.42	48.44 ± 33.1	61.34 ± 8.41	99.72 ± 0.04
	168	96.96 ± 3.95	90.09 ± 15.2	90.53 ± 8.19	100.07 ± 0.09
VSF 459A	96	70.47 ± 13.19	-	34.9 ± 0.91	99.69 ± 0.29
	168	51.96 ± 21.23	14.22 ± 2.68	41.72 ± 5.41	100.03 ± 0.04
VSF 459B	96	89.89 ± 5.31	27.76 ± 9.02	68.44 ± 7.96	99.4 ± 0.38
	168	99.94 ± 0.12	96.35 ± 5.07	99.33 ± 0.82	99.85 ± 0.28
VSM 475A	96	48.49 ± 26.34	-	42.65 ± 1.92	0.98 ± 12.72
	168	-	-	6.69 ± 2.2	43.09 ± 19.53
VSM 475B	96	49.81 ± 10.75	-	40.12 ± 12.13	-
	168	-	-	-	41.22 ± 7.59
SA4 57A	96	51.78 ± 6.47	-	18.69 ± 0.13	14.69 ± 4.23
	168	-	-	-	-
SA4 57B	96	57.91 ± 7.07	-	9.31 ± 0.98	-
	168	20.63 ± 9.3	-	-	48.22 ± 25.66
SA4 29	96	55.85 ± 9.83	-	25.28 ± 0.41	-
	168	-	18.45 ± 2.61	30.26 ± 6.49	-
SA4 36B	96	65.02 ± 3.92	-	-	-
	168	-	-	-	97.97 ± 3.91
SEB 706	96	37.67 ± 1.16	-	-	100.31 ± 0.12
	168	28.02 ± 6.48	-	-	46.34 ± 12.28
SA4 36A	96	55.88 ± 1.15	-	-	-
	168	-	-	-	-
SA4 40	96	-	-	-	-
	168	-	-	-	31.59 ± 15
SEB 735	96	24.73 ± 4.81	-	-	-
	168	-	-	-	-
SEB 727	96	-	-	-	-
	168	-	-	4.54 ± 2.57	-

Se muestran los promedios más la desviación estándar de los porcentajes de inhibición. ^ATiempo que se incubó el aislado para la obtención del sobrenadante; - cero por ciento de inhibición del crecimiento.

7.2.3 Identificación de aislados seleccionados con act. Antimicrobiana

7.2.3.1 Amplificación del gen 16S ARNr

Los 15 aislados que presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una de las especies de bacterias patógenas fueron identificados usando como marcador molecular el gen 16S del ARNr. El ADN genómico extraído de los aislados (Fig. 8) no mostro degradación y presentó un tamaño superior a los 12 Kb al comparar con el marcador molecular 1 Kb Plus. Además, presentó la presencia de ARN entre las 800 y 1500 pb. Posteriormente, los productos de amplificación del gen 16S mostraron una única banda con un tamaño de entre 1000 y 2000 pb en comparación con el marcador molecular (Fig. 9). A continuación se obtuvo la secuencia del gen 16S y se realizó un alineamiento y un análisis de identidad con la base de datos de NCBI.

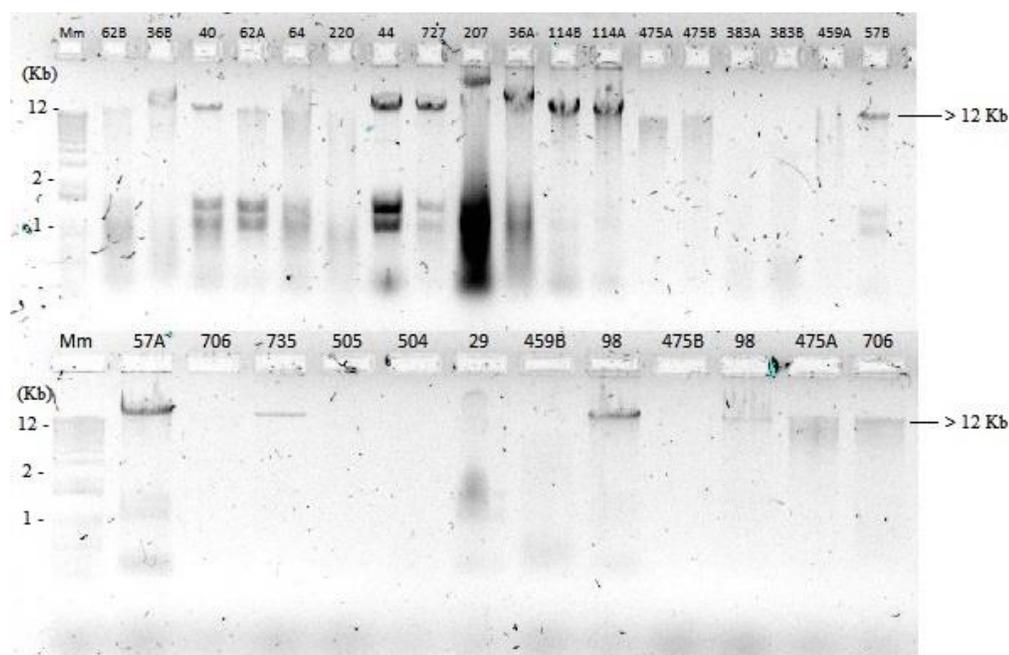


Figura 8. Extracciones de ADN genómico. Las extracciones se corrieron en gel de agarosa 1%. Mm: Marcador molecular 1 Kb plus, Kb: kilobases. Se espera que la banda de ADN genómico se localice sobre los 12 Kb al compararlo con el marcador molecular.

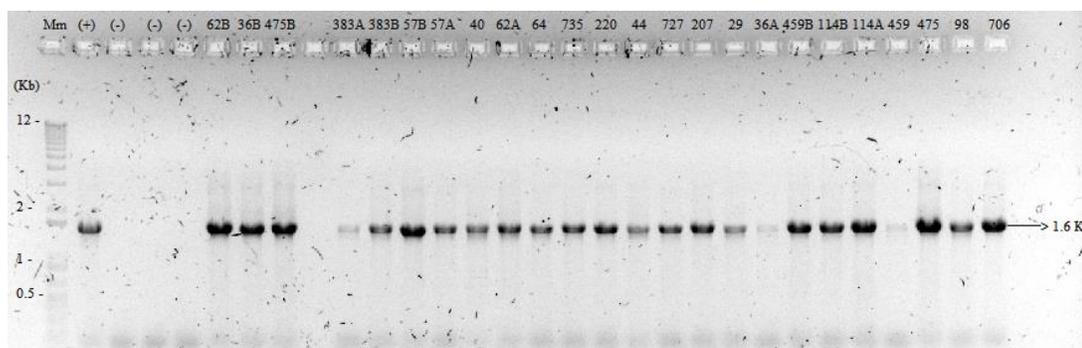


Figura 9. Productos de amplificación del gen 16S ARNr. Los productos se observaron en gel de agarosa 1%. Mm: Marcador molecular 1 Kb plus, Kb: kilobases. Se espera que el producto de PCR se localice alrededor de las 1.6 Kb con respecto al marcador molecular.

El producto de la secuenciación con cada uno de los oligos (pH* o pA) fue de un tamaño de aproximadamente 700 pb. Por tanto, las secuencias no se superlaparon y no se logró obtener la secuencia completa del gen 16S del ARNr. Debido a esto se realizó por separado el análisis de identidad con las secuencias de cada oligo (Tabla X). En la mayoría de los aislados, ambas secuencias mostraron el mismo resultado a excepción del aislado SEB 727. Este último presentó el mismo porcentaje de identidad y puntaje con 2 secuencias de diferentes bacterias cuando se realizó el análisis con el oligo pA y con 3 secuencias de diferentes bacterias cuando se realizó el análisis con el oligo pH. Finalmente, se seleccionaron todas las secuencias más cercanas a las secuencias de los aislados para realizar un análisis filogenético.

Tabla X. Análisis de similitud de la secuencia parcial del gen 16S ARNr de aislados con act. Antimicrobiana.

Aislado	#	Microorganismo con mayor identidad	Id*	Puntaje	No. De acceso
SEB 727	pA	<i>Pseudoalteromonas undina</i> NBRC 103039	84	763	NR_114191.1
		<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> NBRC 103034	84	763	NR_114187.1
	pH	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> NBRC 12985	96	1380	NR_113605.1
			96	1380	NR_025139.1
		<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> KMM 3549	96	1380	NR_041787.1
SEB 706	pA	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> NBRC103038	96	1264	NR_114190.1
	pH	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> NBRC103038	97	1328	NR_114190.1
SEB 735	pA	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	98	1258	NR_074765.1
	pH	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	99	1402	NR_074765.1
SA4 29	pA	<i>Staphylococcus equorum</i> PA231	98	1354	NR_027520.1
	pH	<i>Staphylococcus equorum</i> PA231	98	1395	NR_027520.1
SA4 36A	pA	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	97	1325	NR_025140.1
	pH	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	98	1393	NR_025140.1
SA4 36B	pA	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	97	1347	NR_025140.1
	pH	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	98	1467	NR_025140.1
SA4 57A	pA	-	-	-	-
	pH	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B	98	1423	NR_041917.1
SA4 57B	pA	<i>Marinobacter persicus</i> M9B	95	1099	NR_109110.1
	pH	<i>Marinobacter persicus</i> M9B	97	1393	NR_109110.1
SA4 40	pA	-	-	-	-
	pH	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	97	1363	NR_025140.1
VSM 475A	pA	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	96	1297	NR_118996.1
	pH	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	99	1404	NR_118996.1
VSM 475B	pA	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	97	1328	NR_118996.1
	pH	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	99	1472	NR_118996.1
VSF 383A	pA	<i>Bacillus hisashii</i> N-11	98	1327	NR_144578.1
	pH	<i>Bacillus hisashii</i> N-11	99	1391	NR_144578.1
VSF 383B	pA	<i>Bacillus hisashii</i> N-11	98	1308	NR_144578.1
	pH	-	-	-	-
VSF 459A	pA	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> LMG18084	98	1351	NR_117028.1
	pH	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> LMG18084	96	1280	NR_117028.1
VSF 459B	pA	<i>Bacillus hisashii</i> N-11	99	1321	NR_144578.1
	pH	<i>Bacillus hisashii</i> N-11	99	1389	NR_144578.1

(-) No se obtuvo secuencia; *Porcentaje de identidad, # Oligo

7.2.3.2 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético con las secuencias parciales del gen 16S del ARNr de los aislados y las secuencias seleccionadas de NCBI con mayor porcentaje de identidad. De acuerdo con la figura 10, los 15 aislados pertenecían a dos filos: *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Particularmente, los aislados de la salina marina pertenecían al filo

Proteobacteria. El sub árbol de secuencias dentro del filo *Proteobacteria* comprendió 8 aislados que formaron 3 grupos o clusters, los cuales correspondieron a las familias: *Pseudoalteromonadaceae*, *Alteromonadaceae* y *Rhodobacteraceae*. Así mismo, los aislados de la ventila hidrotermal correspondían al filo *Firmicutes*. El sub árbol de secuencias dentro del filo *Firmicutes* comprendió 6 aislados que formaron 2 grupos o clusters, los cuales correspondieron a las familias *Staphylococcaceae* y *Bacillaceae*. Por otra parte, el aislado SEB 727 se colocó dentro de un grupo o cluster con 2 especies diferentes de *Pseudoalteromonas*, cuyos porcentajes de similitud son 84 (pA) y 96% (pH).

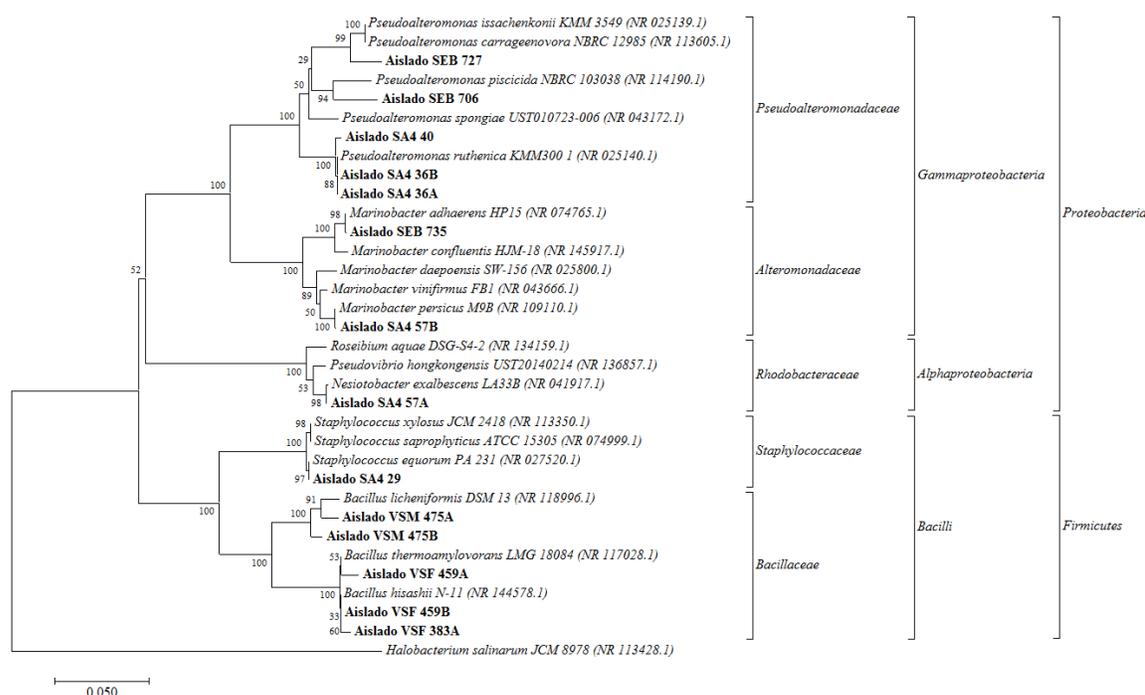
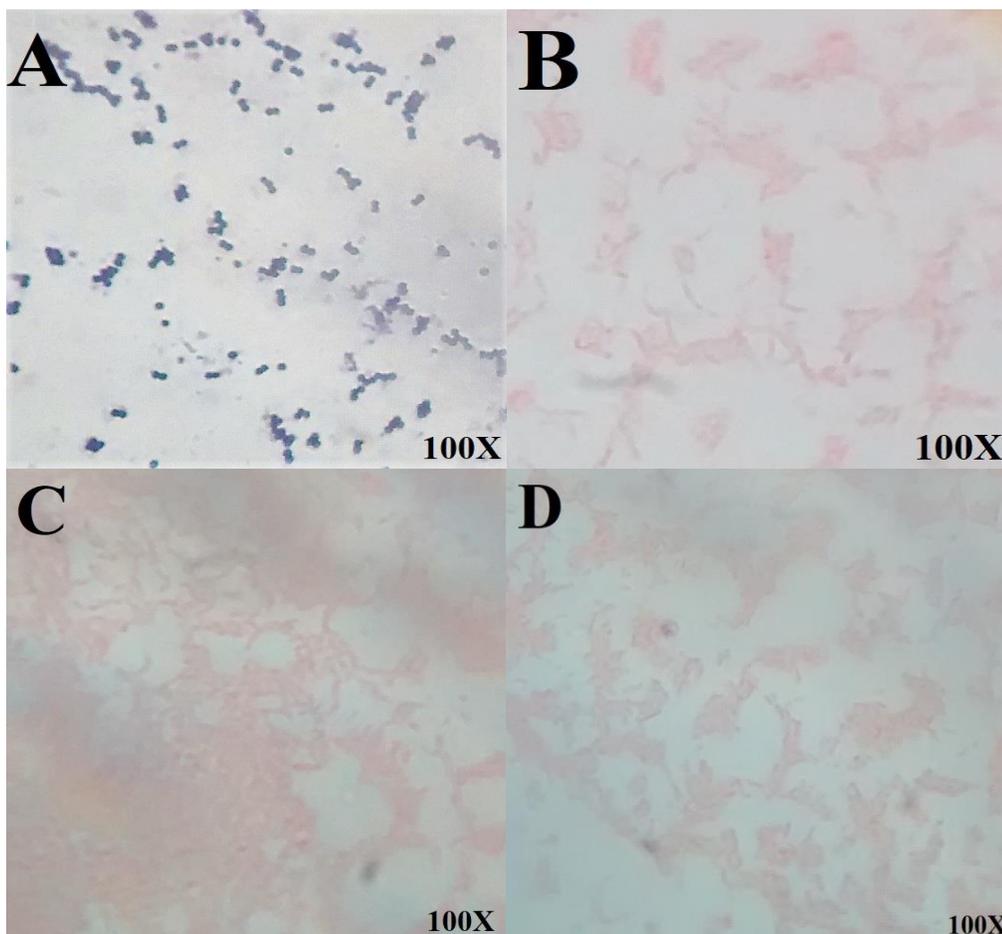
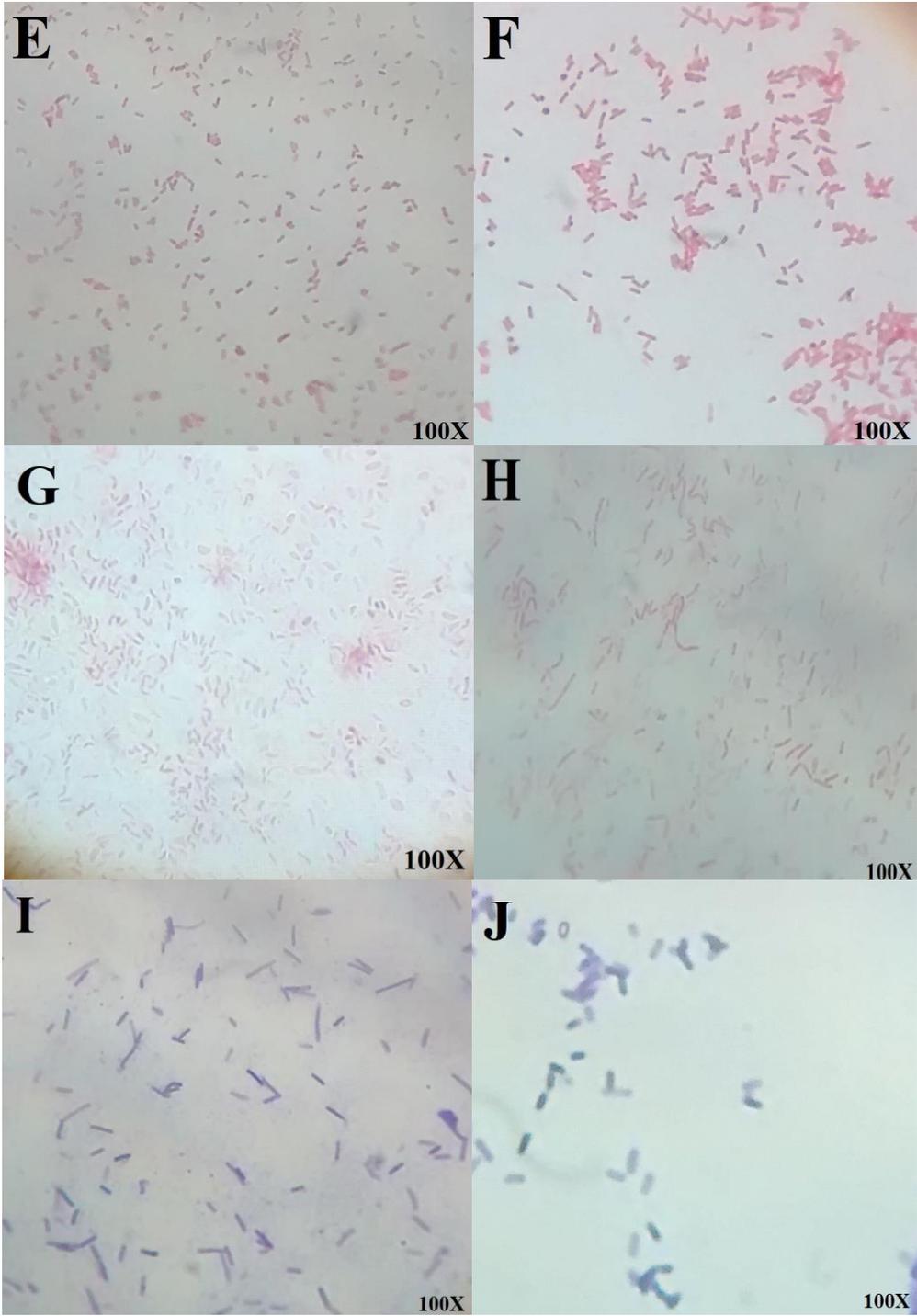


Figura 10. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen 16S ARNr con act. Antimicrobiana. Las letras en negritas corresponden a las secuencias de los aislados y la barra de escala corresponde a 0.5 sustituciones nucleotídicas por posición.

7.2.3.3 Tinción

Adicionalmente, se realizó la tinción de Gram (Fig. 12) para identificar el tipo de membrana o pared celular. De los 15 aislados seleccionados, 7 son bacterias Gram positivas y 8 son bacterias Gram negativas. Los aislados SA4 36A, SA4 36B y SA4 40 presentaron la misma morfología bacilar Gram negativa. Los aislados SA4 57A, SA4 57B y SEB 706 presentaron morfología de bacilo corto Gram negativo. Particularmente, el aislado SEB 735 presento morfología de bacilo Gram negativo, en ocasiones en filas de varias células. Los aislados VSM 475A y VSM 475B presentaron la misma morfología de bacilo Gram positivo. Particularmente, los aislados VSF 383A, VSF 383B y VSF 459B presentaron morfología de bacilo Gram positivo en ocasiones formó filas de varias células. Por otra parte, el aislado SA4 29 mostró una morfología de coco Gram positivo.





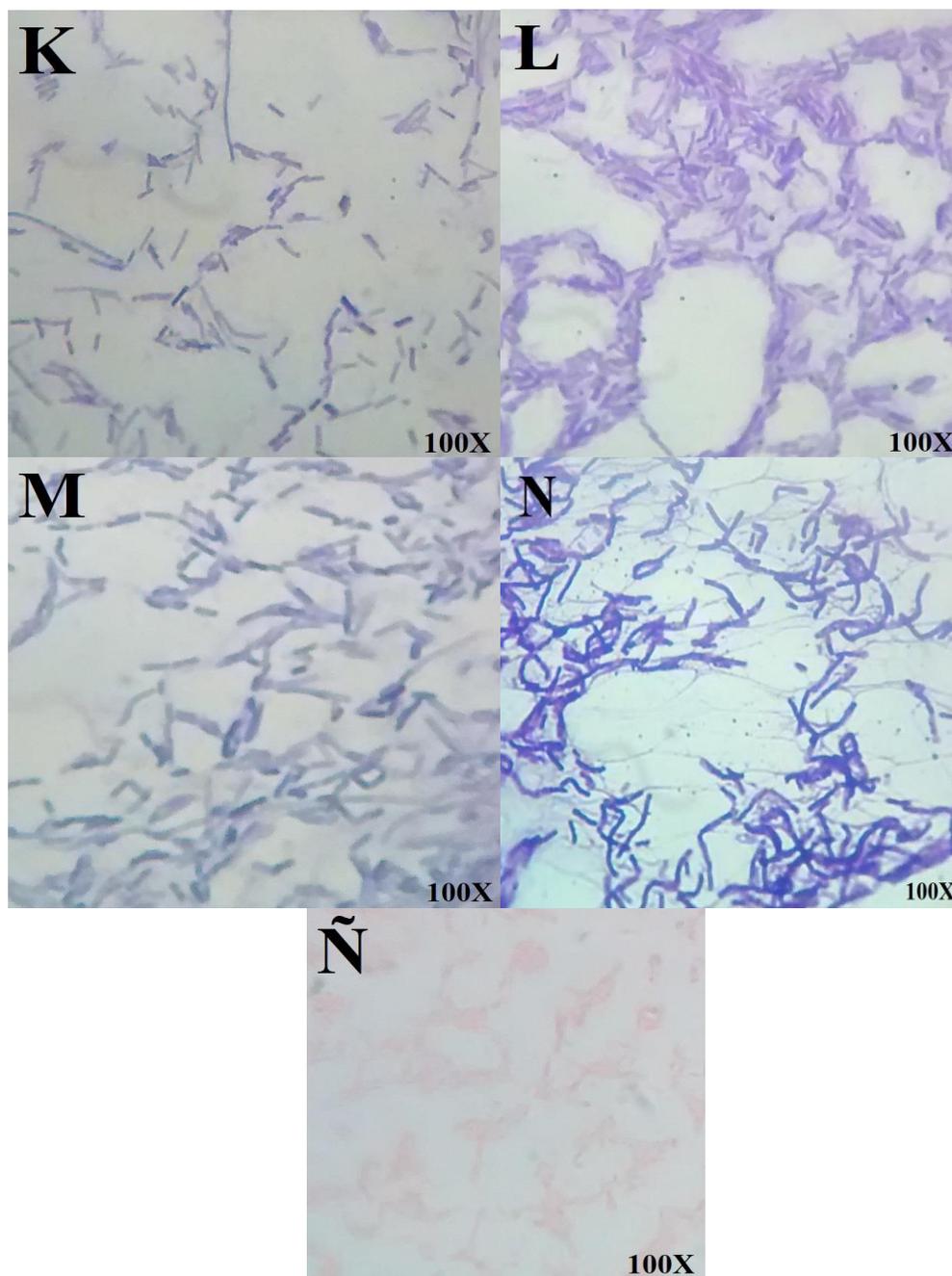


Figura 11. Tinción de Gram de aislados con act. Antimicrobiana. Las células en rosa corresponden a bacterias Gram negativas y las azules a Gram positivas. (A) SA4 29, (B) SA4 36A, (C) SA4 36B, (D) SA4 40, (E) SA4 57A, (F) SA4 57B, (G) SEB 706, (H) SEB 725, (I) VSM 475A, (J) VSM 475B, (K) VSF 383A, (L) VSF 383B, (M) VSF 459A, (N) VSF 459B y (Ñ) SEB 727.

7.2.3.4 Asignación taxonómica

De acuerdo con los resultados del análisis de identidad, análisis filogenético y tinción de Gram se realizó la asignación de una especie para cada aislado (Tabla XI).

Particularmente en el estanque a 40 ups (estación de bombeo) se aisló *Marinobacter adhaerens* y 2 especies de *Pseudoalteromonas*. Además, en el estanque a 80 ups (estanque No. 4) se aisló *Staphylococcus equorum*, *Neisotobacter exalbescens*, *Marinobacter persicus* y 3 cepas de *Pseudoalteromonas ruthenica*. Por otro lado, en sedimento de la ventila hidrotermal se aisló *Bacillus thermoamylovorans*, 2 cepas de *Bacillus licheniformis* y 3 cepas de *Bacillus hisashii*. Una vez identificados todos los aislados con actividad antimicrobiana, se evaluó su espectro de acción frente a 5 cepas de cada especie de bacteria patógena. Sin embargo, el aislado *Staphylococcus equorum* SA4 29 fue descartado ya que estaba reportado como patógeno, también se descartó el aislado *Pseudoalteromonas sp.* SEB 727 porque su actividad antimicrobiana fue demasiado baja y finalmente se descartaron los aislados *B. licheniformis* VSM 475 A y VSM 475B porque ya estaban ampliamente reportados con actividad antimicrobiana.

Tabla XI. Género y especie asignado para cada aislado con actividad antimicrobiana.

Aislado	Microorganismo asignado
SEB 727	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>
SEB 706	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>
SEB 735	<i>Marinobacter adhaerens</i>
SA4 29	<i>Staphylococcus equorum</i>
SA4 36A	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>
SA4 36B	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>
SA4 57A	<i>Nesiotobacter exalbescens</i>
SA4 57B	<i>Marinobacter persicus</i>
SA4 40	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>
VSM 475A	<i>Bacillus licheniformis</i>
VSM 475B	<i>Bacillus licheniformis</i>
VSF 383A	<i>Bacillus hisashii</i>
VSF 383B	<i>Bacillus hisashii</i>
VSF 459A	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
VSF 459B	<i>Bacillus hisashii</i>

7.2.4 Actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena

El espectro de acción de los aislados fue muy variado. Los tres aislados de *B. hisashii* lograron inhibir el crecimiento de todas las cepas patógenas, específicamente la cepa VSF 459C fue la que presentó los mayores porcentajes de inhibición. El aislado *B. thermoamylovorans* inhibió casi a todas la cepas, a excepción de la cepa 3227 de *S. aureus* (Tabla XII). Por otra parte, los aislados *N. exalbescens* SA4 57A y *M. persicus* SA4 57B lograron inhibir a 3 especies patógenas pero no mantuvieron su actividad contra todas la cepas (Tabla XIII). Cabe destacar que el aislado *P. ruthenica* SA4 36B logró inhibir a 4 de las 5 cepas de *S. aureus* evaluadas y a la cepa *A. hydrophila* 135 (Tabla XIV). Finalmente, con base en los resultados de la evaluación del espectro de acción de los sobrenadantes, se seleccionó el aislado *B. hisashii* 459C para evaluar el comportamiento de cada una de las cepas patógenas en presencia de su sobrenadante, atreves del tiempo.

Tabla XII. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes bacterianos que inhibieron 4 especies de bacterias patógenas.

Cepas de bacterias patógenas	Aislados			
	<i>B. hisashii</i> VSF 383A	<i>B. hisashii</i> VSF 383B	<i>B. hisashii</i> VSF 459C	<i>B. thermoamylovorans</i> VSF 459A
<i>S. aureus</i> RM01	++++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> B87	++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> 3202	++++	++++	++++	++++
<i>S. aureus</i> 3227	+++	++	++++	-
<i>S. aureus</i> 4332	++++	++++	++++	++
<i>E. coli</i> UG02	++++	++++	++++	+
<i>E. coli</i> 23	+++	+++	++++	+
<i>E. coli</i> ECO	++++	+++	++++	+
<i>S. typhimurium</i> SA	++++	++++	++++	+
<i>S. typhimurium</i> SH1	++++	+	++++	+
<i>S. typhimurium</i> SH2	++++	+++	++++	+
<i>S. typhimurium</i> SOH	++++	++	++++	+
<i>S. typhimurium</i> SOG	++++	++++	++++	+
<i>A. hydrophila</i>	++++	++++	++++	++++

++++: 80-100% inhibición, +++: 60-80% inhibición, ++: 40-60% inhibición, +: 0-40% inhibición y -: 0% de inhibición.

Tabla XIII. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes bacterianos de aislados que inhibieron a 3 especies de bacterias patógenas.

Cepas de bacterias patógenas	Aislados	
	<i>N. exalbescens</i>	<i>M. persicus</i>
	SA4 57A	SA4 57B
<i>S. aureus</i> SA	++	++
<i>S. aureus</i> B87	+	-
<i>S. aureus</i> 3202	-	-
<i>S. aureus</i> 3227	-	-
<i>S. aureus</i> 4332	-	-
<i>S. typhimurium</i> SA	+	+
<i>S. typhimurium</i> SH1	+	-
<i>S. typhimurium</i> SH2	+	-
<i>S. typhimurium</i> SOH	+	-
<i>S. typhimurium</i> SOG	+	-
<i>A. hydrophila</i>	+	++

++++: 80-100% inhibición, +++: 60-80% inhibición, ++: 40-60% inhibición, +: 0-40% inhibición y -: 0% de inhibición.

Tabla XIV. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes bacterianos de aislados que inhibieron a 2 especies de bacterias patógenas.

Cepas de bacterias patógenas	Aislados	
	<i>P. ruthenica</i>	<i>P. piscicida</i>
	SA4 36B	SEB 706
<i>S. aureus</i> SA	+++	+
<i>S. aureus</i> B87	+	-
<i>S. aureus</i> 3202	+++	-
<i>S. aureus</i> 3227	++++	-
<i>S. aureus</i> 4332	-	-
<i>A. hydrophila</i>	++++	++++

++++: 80-100% inhibición, +++: 60-80% inhibición, ++: 40-60% inhibición, +: 0-40% inhibición y -: 0% de inhibición.

Tabla XV. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes bacterianos de aislados que inhibieron a 1 especie de bacteria patógena.

Cepas de bacterias patógenas	Aislados		
	<i>P. ruthenica</i> SA4 36A	<i>M. adhaerens</i> SEB 735	<i>P. ruthenica</i> SA4 40
<i>S. aureus</i> SA	++	+	
<i>S. aureus</i> B87	+	-	
<i>S. aureus</i> 3202	-	-	
<i>S. aureus</i> 3227	++++	-	
<i>S. aureus</i> 4332	-	-	
<i>A. hydrophila</i>			+

++++: 80-100% inhibición, +++: 60-80% inhibición, ++: 40-60% inhibición, +: 0-40% inhibición y -: 0% de inhibición.

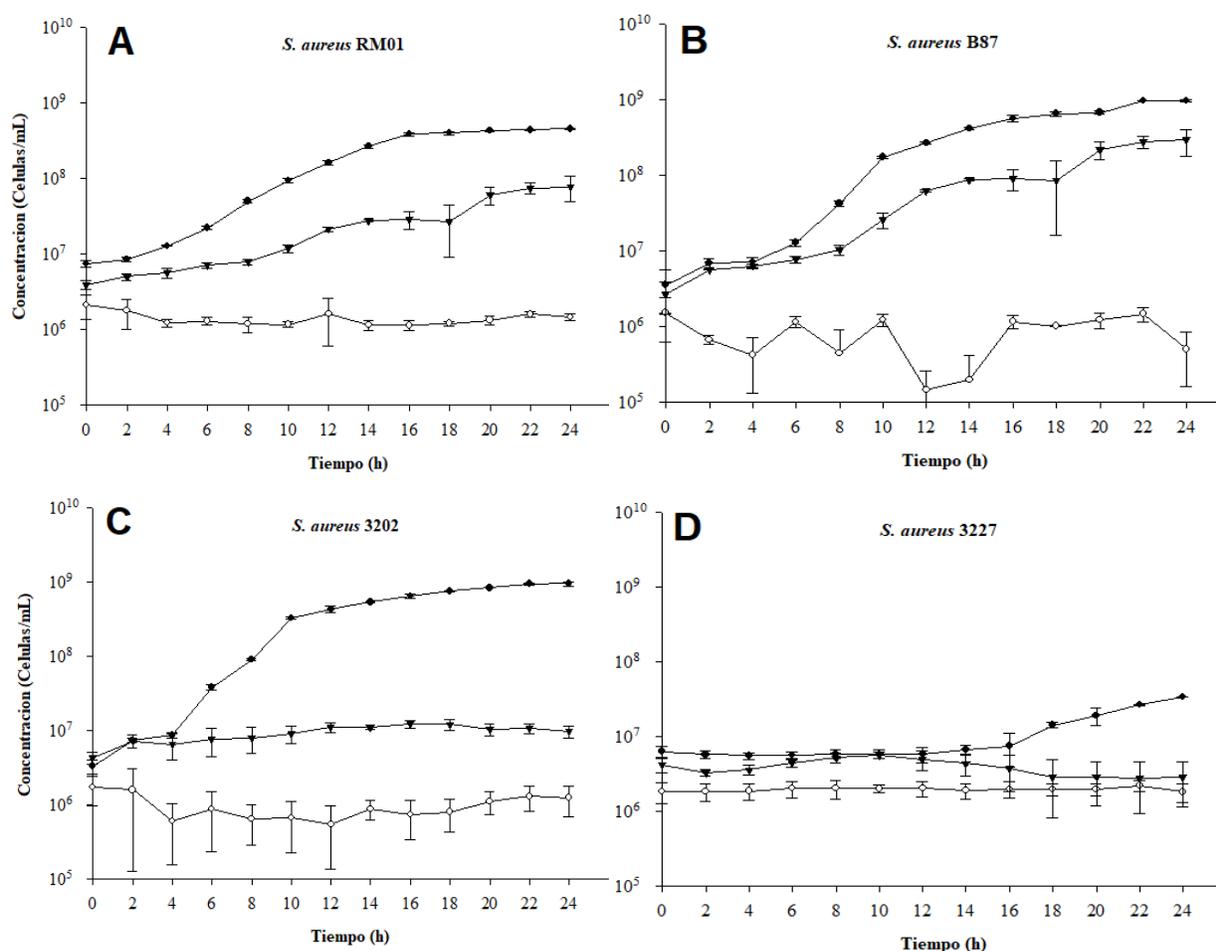
7.2.5 Curvas de inhibición de aislados seleccionados contra bacterias patógenas

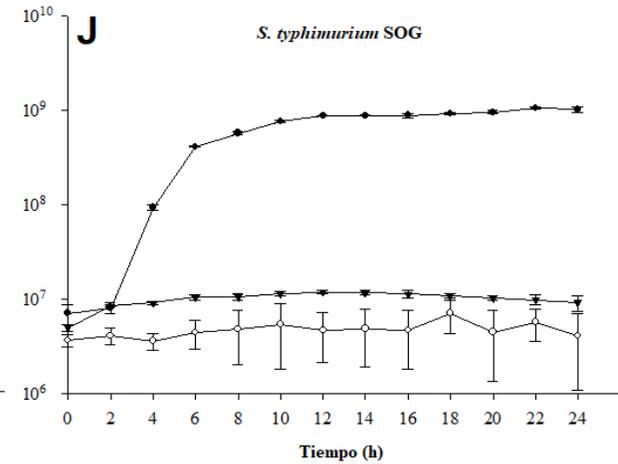
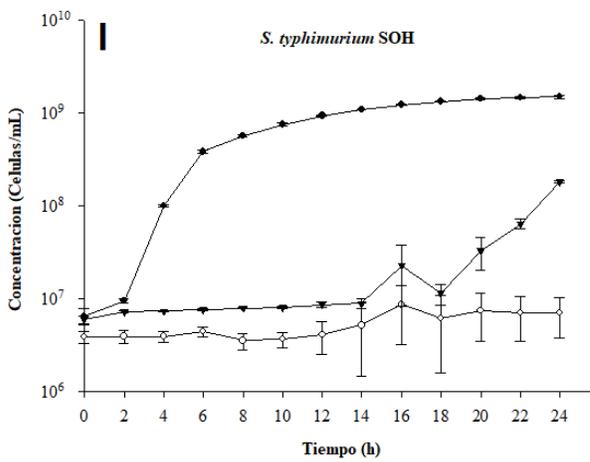
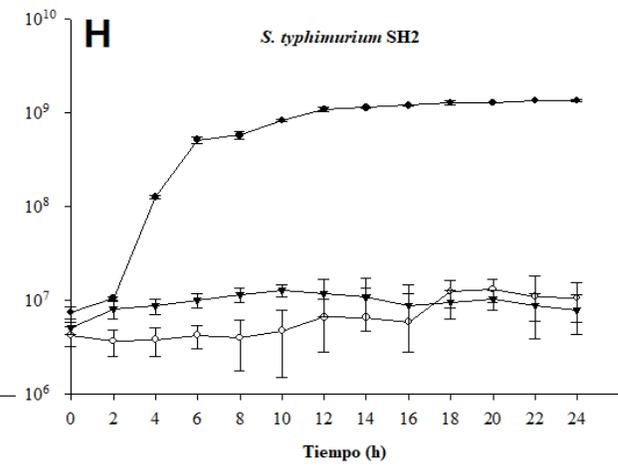
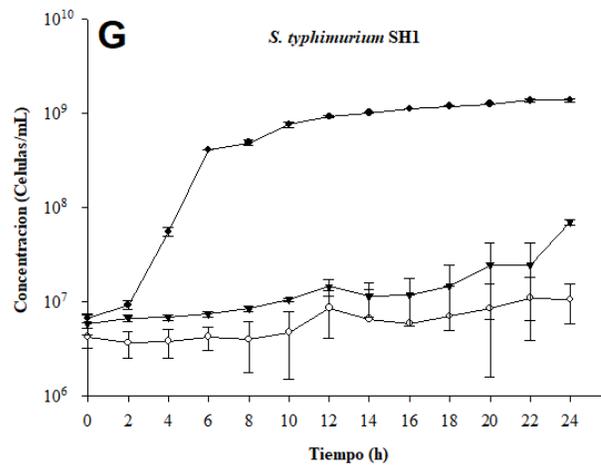
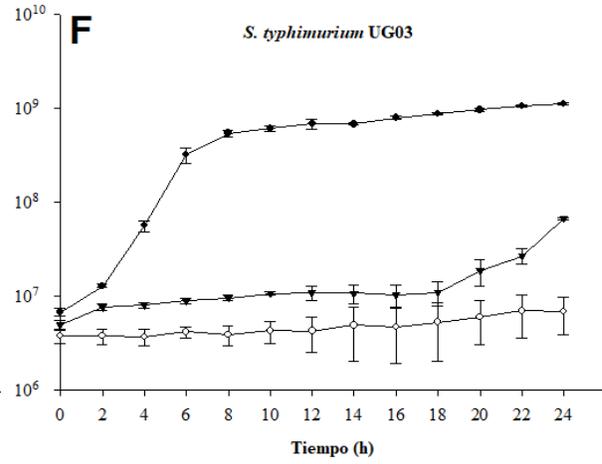
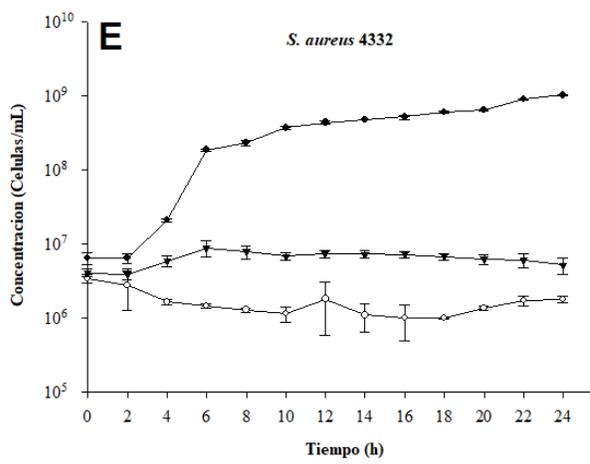
El comportamiento de las 5 cepas de *S. aureus* en presencia del sobrenadante del aislado *B. hisashii* 459C fue variable. Primeramente, todas las cepas mostraron un crecimiento similar en el medio TSB a excepción de la cepa 3227, la cual únicamente alcanzó un crecimiento poblacional máximo de aproximadamente 5×10^7 células/mL, mientras que el resto alcanzó 10^9 células/mL aproximadamente. Por otro lado, el sobrenadante ocasionó que las cepas 3202, 3227 y 4332 no pudieran crecer mientras que las cepas RM01 y B87 sí pero a menor velocidad. Además, cabe destacar que todas las cepas de *S. aureus* no lograron crecer cuando se colocaron en presencia del antibiótico gentamicina (Figs. 12A-12E).

En cuanto a las cepas de *S. typhimurium*, estas presentaron un comportamiento similar en presencia del medio TSB alcanzando concentraciones de 10^9 células/mL. En presencia del sobrenadante las cepas SH2 y SOG no lograron crecer durante las 24 h, mientras que las cepas UG03, SH1 y SOH no pudieron crecer hasta las 20 h, sin embargo después de las 20 h comenzaron a aumentar su concentración celular. Además, de igual forma que con *S. aureus*, todas las cepas de *S. typhimurium* no lograron crecer en presencia del antibiótico genatmicina (Figs. 12F-12J).

Por otra parte, las 3 cepas de *E. coli* lograron crecer en el medio TSB alcanzando concentraciones de 10^9 células/mL. Cuando se colocaron en presencia del sobrenadante, las cepas UG02 y ECO no lograron crecer hasta las 20 h, después de las 20 h comenzaron a aumentar su concentración celular, en cambio la cepa 23 no pudo crecer durante las 24 h completas. Mientras que en presencia del antibiótico gentamicina no logró crecer ninguna (Figs. 12K-12M).

Finalmente, la cepa *A. hydrophila* 135 si pudo crecer en el medio TSB, mientras que en el sobrenadante y en el antibiótico gentamicina no (Fig. 12N).





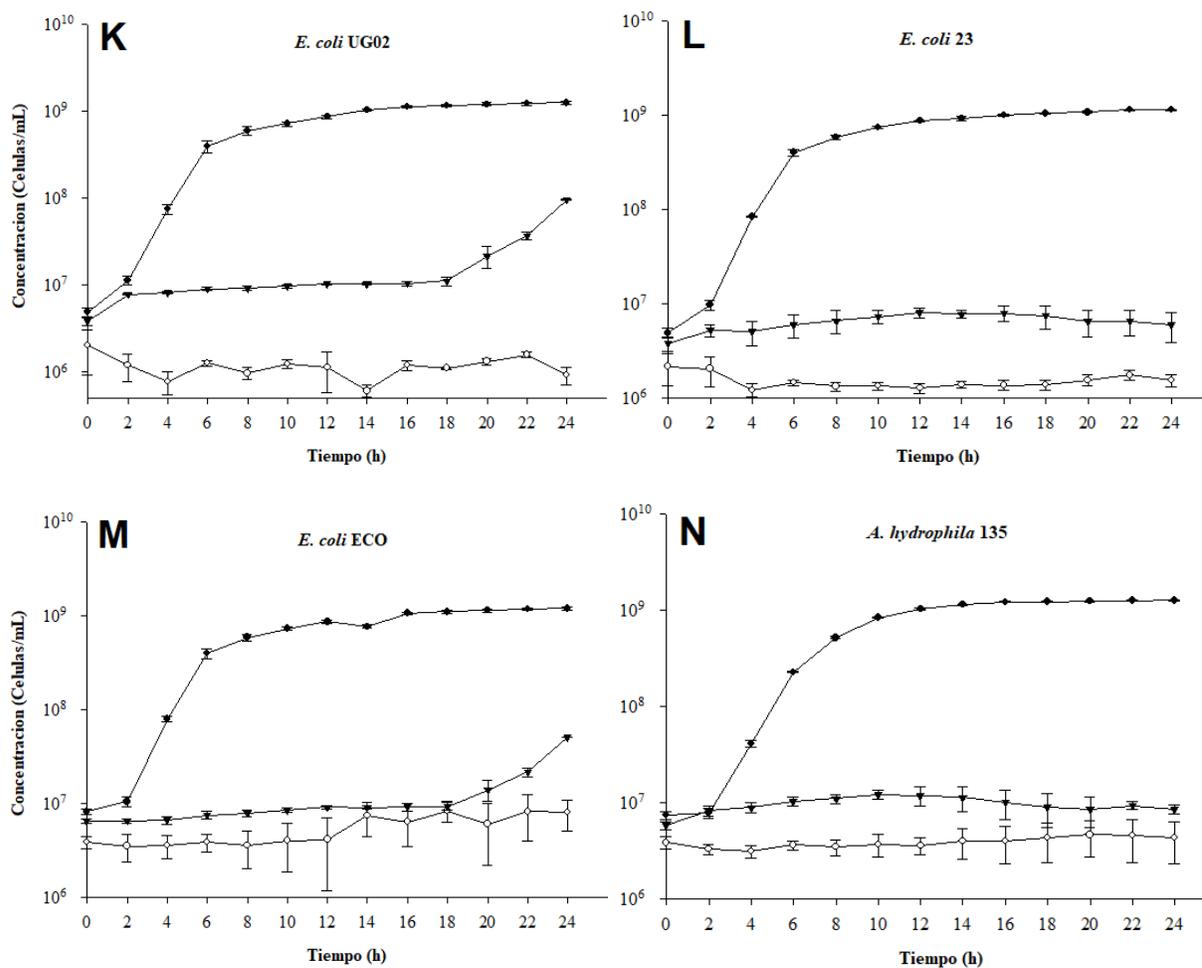


Figura 12. Curvas de inhibición del crecimiento de cepas de bacterias patógenas con *B. hisashii* VSF 459C durante 24 horas. La línea con círculos negros corresponde a la cepa patógena más medio TSB (control negativo), la línea con triángulos negros corresponde a la cepa patógena más sobrenadante y la línea con círculos blancos corresponde a la cepa patógena más 6.25 µg/mL (control positivo).

7.3 Resultados para objetivo particular 3.

Identificar y evaluar *in vitro* la actividad inmunoestimulante de las bacterias aisladas, en leucocitos de ratón.

7.3.1 Evaluación de producción de óxido nítrico

Para evaluar la actividad inmunoestimulante de los aislados, se cuantificó la producción de óxido nítrico (ON) en leucocitos de bazo de ratón, tratados con células inactivadas de los aislados. La cuantificación de ON se realizó por medio de la prueba de Griess, la cual determina las concentraciones de ON en forma de NaNO_2 . Los aislados que indujeron la producción de ON en leucocitos de ratón (Tabla XVI) fueron obtenidos tanto de la salina marina (7 aislados) como de la ventila hidrotermal (3 aislados). El aislado que indujo la mayor producción fue el aislado SA4 207, seguido de los aislados SA4 220 y SA8 44, los cuales fueron obtenidos de la salina marina. Por el contrario, el aislado que indujo la menor producción fue el aislado VA 114B, el cual fue obtenido de la ventila hidrotermal. Cabe destacar que todos los aislados indujeron más del doble de la producción de ON en comparación con el tratamiento con PBS. Los 10 aislados que indujeron la producción de ON en leucocitos de ratón fueron seleccionados para su identificación.

Tabla XVI. Aislados que indujeron la producción de ON en leucocitos de bazo de ratón.

Aislado	Concentración de NO (μM)
SA4 207	12.05±1.67 ^b
SA4 220	10.29±0.79 ^{bc}
SA8 44	10.06±1.06 ^{bc}
VSM 98	8.35±1.15 ^{cd}
SA4 40	8.31±0.40 ^{cd}
SA4 62B	7.93±0.67 ^{cd}
SA4 62A	7.92±0.72 ^{cd}
VA 114A	7.04±0.65 ^d
SA4 64	6.83±0.85 ^d
VA 114B	6.01±0.47 ^{da}
PBS	3.76±0.89 ^a

7.3.2 Identificación de aislados seleccionados con acti. Inmunoestimulante

7.3.2.1 Amplificación del gen 16S ARNr

La mayoría de los aislados mostró el mayor porcentaje de identidad con una sola secuencia (Tabla XVII). Sin embargo, el aislado SA4 207 mostró mayor similitud con tres especies de *Halomonas*. Adicionalmente, los aislados SA4 62A, SA4 62B y SA4 64 mostraron mayor identidad con 4 especies de *Bacillus*.

Tabla XVII. Análisis de similitud de la secuencia parcial del gen 16S ARNr de aislados con actividad inmunoestimulante.

Aislado	#	Microorganismo con mayor identidad	Id.	Puntaje	No. De acceso
SA4 207	pA	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85	96	1236	NR_044099.1
	pH	<i>Halomonas denitrificans</i> M29	97	1332	NR_042491.1
		<i>Halomonas cupida</i> NBRC 102219	97	1327	NR_114046.1
SA4 220	pA	<i>Bacillus subtilis</i> BGSC 3 ^a 28	97	1371	NR_104873.1
	pH	<i>Bacillus subtilis</i> 168	97	1411	NR_102783.1
SA4 40	pH	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	97	1363	NR_025140.1
SA4 62B	pA	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820	99	1356	NR_113945.1
		<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	99	1356	NR_112637.1
	pH	<i>Bacillus aerius</i> 24K	99	1413	NR_118439.1
		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99	1413	NR_042337.1
SA4 62A	pA	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820	99	1363	NR_113945.1
		<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	99	1363	NR_112637.1
	pH	<i>Bacillus aerius</i> 24K	99	1406	NR_118439.1
		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99	1406	NR_042337.1
SA4 64	pA	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820	98	1375	NR_113945.1
		<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	98	1375	NR_112637.1
	pH	<i>Bacillus aerius</i> 24K	99	1428	NR_118439.1
		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99	1428	NR_042337.1
SA4 44	pA	<i>Halomonas elongata</i> 1H9	98	1395	NR_074782.1
	pH	<i>Halomonas elongata</i> 1H9	98	1391	NR_074782.1
VSM 98	pA	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	96	1306	NR_025116.1
	pH	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	98	1382	NR_025116.1
VA 114A	pA	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	98	1402	NR_025116.1
	pH	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	98	1445	NR_025116.1
VA 114B	pA	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	99	1435	NR_025116.1
	pH	<i>Marinobacter lutaoensis</i> T5054	98	1447	NR_025116.1

7.3.2.2 Análisis filogenético

Se realizó un análisis de filogenético (Fig. 15) con las secuencias parciales del gen 16S del ARNr de los aislados seleccionados y las secuencias con mayor porcentaje de identidad. Los 10 aislados pertenecían a dos filos; *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Particularmente, los aislados de la salina marina se agruparon en ambos filos. El filo *Proteobacteria* estaba representado por la clase *Gammaproteobacteria* y comprendió 3 aislados que formaron 2 grupos (clusters), los cuales correspondían a las familias *Pseudoalteromonadaceae* y *Halomonadaceae*. El filo *Firmicutes* estaba representado por la clase *Bacilli* y comprendió 4 aislados dentro de la familia *Bacillaceae*. Así mismo, los aislados de la ventila hidrotermal se agruparon dentro del filo *Proteobacteria*, el cual estaba representado por la clase *Gammaproteobacteria* y comprendió 3 aislados dentro de la familia *Alteromonadaceae*.

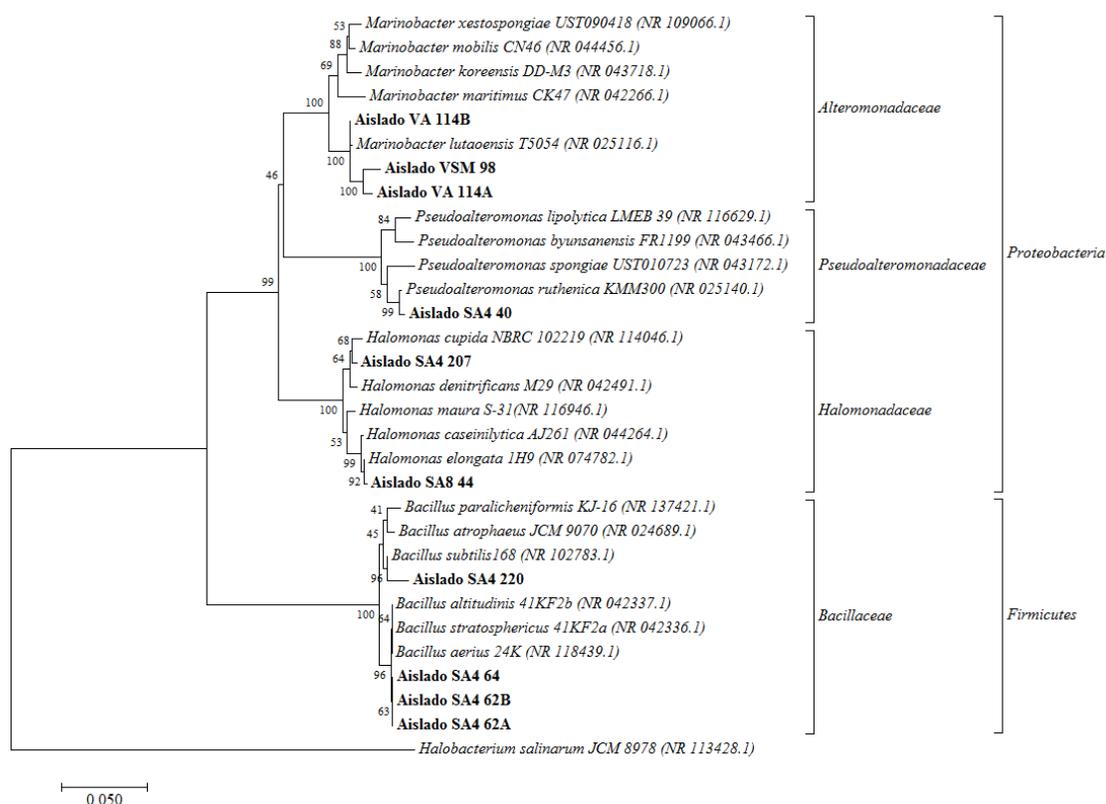
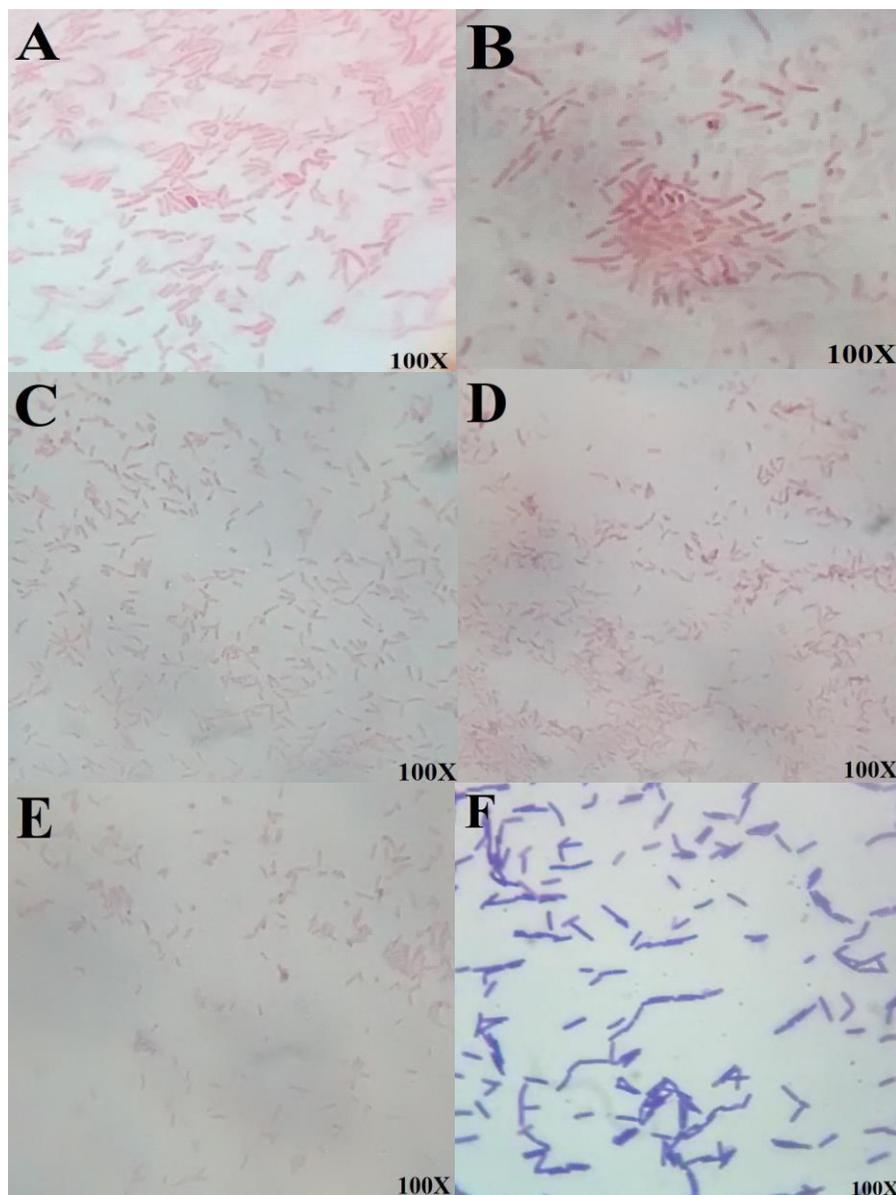


Figura 13. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen 16S ARNr de aislados con actividad inmunoestimulante. La escala corresponde a 0.5 sustituciones de nucleótidos.

7.3.2.3 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram para identificar el tipo de membrana o pared celular (Fig. 14). De los 10 aislados seleccionados, 4 eran bacterias Gram positivas y 6 bacterias Gram negativas. Los aislados VSM 98, VA 114A y VA 114B presentaron la misma morfología de bacilos cortos Gram negativos. Por otra parte, los aislados SA4 62A, SA4 62B y SA4 64 presentaron la misma morfología de bacilo Gram positivo.



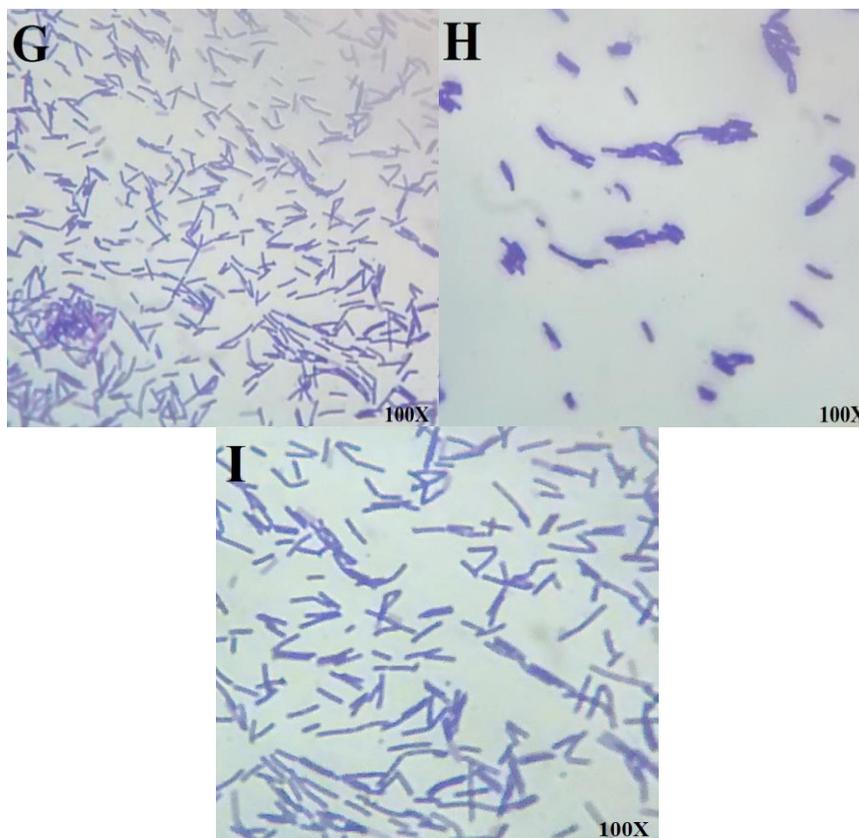


Figura 14. Tinciones de Gram de aislados seleccionados. Las células en rosa corresponden a bacterias Gram negativas y las azules a bacterias Gram positivas. (A) SA4 207, (B) SA8 44, (C) VSM 98, (D) VA 114A, (E) VA 114B, (F) SA4 220, (G) SA4 62A, (H) SA4 62B, (I) SA4 64.

7.3.2.4 Asignación taxonómica

De acuerdo con los resultados del análisis de identidad, análisis filogenético y tinción de Gram, se realizó la asignación de una especie para cada aislado (Tabla XVIII). Los aislados que indujeron la producción de ON en leucocitos de ratón fueron obtenidos tanto de la salina marina como de la ventila hidrotermal. En el estanque a 80 ups (estanque No. 4) se aisló *Halomonas elongata*, *Halomonas* sp., *Pseudoalteromonas ruthenica*, *Bacillus subtilis* y 3 cepas del género *Bacillus* no identificadas hasta nivel de especie. Por otro lado, en la ventila hidrotermal se aislaron 3 cepas de *Marinobacter lutaensis*.

Por tanto, estos 10 aislados fueron seleccionados para evaluar su posible citotoxicidad (viabilidad) hacia los leucocitos de bazo de ratón.

Tabla XVIII. Género y especie asignado para cada aislado que indujo la producción de ON en leucocitos de ratón.

Aislado	Microorganismo asignado	Aislado	Microorganismo asignado
SA4 207	<i>Halomonas</i> sp.	SA4 64	<i>Bacillus</i> sp.
SA4 220	<i>Bacillus subtilis</i>	SA4 44	<i>Halomonas elongata</i>
SA4 40	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	VSM 98	<i>Marinobacter lutaoensis</i>
SA4 62B	<i>Bacillus</i> sp.	VA 114A	<i>Marinobacter lutaoensis</i>
SA4 62A	<i>Bacillus</i> sp.	VA 114B	<i>Marinobacter lutaoensis</i>

7.3.3 Evaluación de la citotoxicidad

Los aislados de *Bacillus* sp. 62A, *Bacillus* sp. 62B, *B. subtilis* SA4 220 y *P. ruthenica* SA4 40 únicamente disminuyeron la viabilidad de los leucocitos hasta el 80%. Cabe destacar que los aislados *Bacillus* sp. 62A y 62B mostraron resultados similares en esta y en todas las pruebas anteriores (incluyendo la identificación), por tanto únicamente se seleccionó la cepa 62A, que presenta menor disminución de la viabilidad de los leucocitos. En contraste, los 3 aislados de *M. lutaoensis* y el aislado *Bacillus* sp. SA4 64 disminuyeron la viabilidad de los leucocitos de bazo de ratón hasta menos del 50% (Fig. 15). Por tanto, estos aislados fueron descartados del resto de los ensayos.

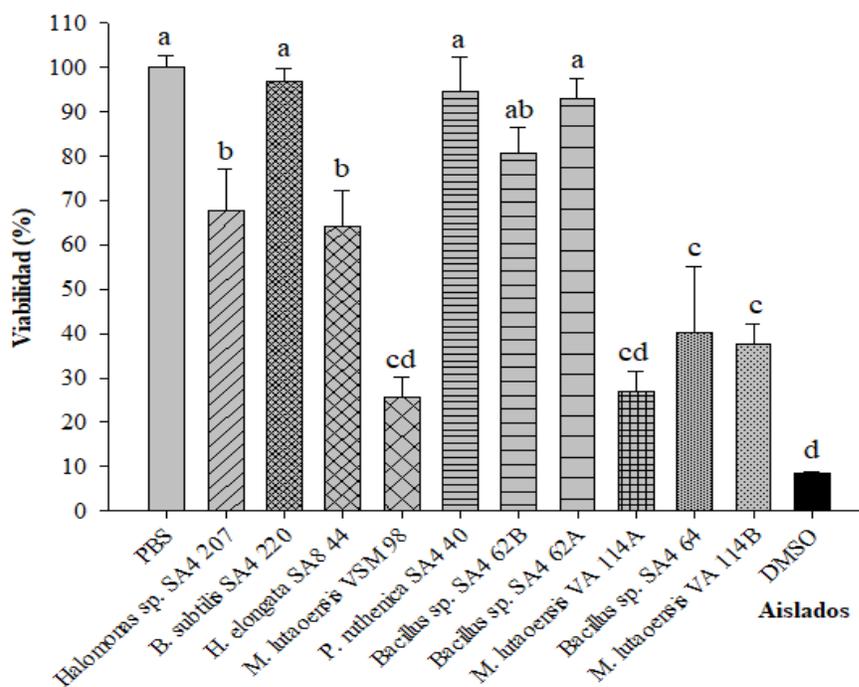


Figura 15. Viabilidad de leucocitos de bazo de ratón tratados con células inactivadas de los aislados seleccionados. Medido por MTT a 570 nm. Los datos representan la media más desviación estándar.

7.3.4 Evaluación de la actividad fagocítica

Los aislados que no disminuyeron la viabilidad de los leucocitos fueron seleccionados para evaluar la actividad fagocítica, explosión respiratoria y actividad de enzimas antioxidantes de los leucocitos tratados (Fig. 16). Todos los aislados mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo (PBS pH 7.2). En contraste, los aislados seleccionados (a excepción de *B. subtilis* SA4 220 y *P. rutherica* SA4 40) no presentaron diferencias significativas con respecto al control positivo (10 µg/mL de LPS de *E. coli*).

Posteriormente, estos cinco aislados fueron utilizados para evaluar la explosión respiratoria de los leucocitos tratados.

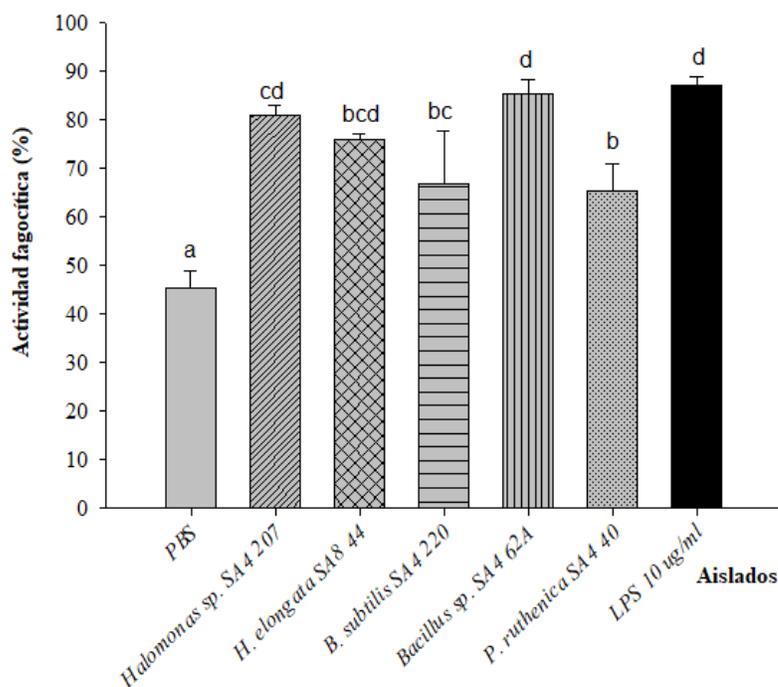


Figura 16. Actividad fagocítica *in vitro* de leucocitos de bazo de ratón tratados con los aislados seleccionados. Los datos representan la media más desviación estándar.

7.3.5 Evaluación de explosión respiratoria

Casi todos los aislados (con excepción de *Bacillus* sp. SA4 62A) mostraron un incremento significativo en la inducción de la explosión respiratoria (producción de especies reactivas de oxígeno). Particularmente, los aislados *B. subtilis* SA4 220 y *P. ruthenica* SA4 40 presentaron una mayor inducción; siendo *B. subtilis* SA4 220 el único que no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento con 10 µg/mL de LPS de *E. coli* (Fig. 17). En contraste, las cepas SA4 207 y SA4 44 del género *Halomonas* presentaron la menor inducción de la explosión respiratoria.

Debido a los resultados obtenidos en este ensayo, se decidió evaluar la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, mieloperoxidasa y catalasa en los leucocitos tratados con los cinco aislados.

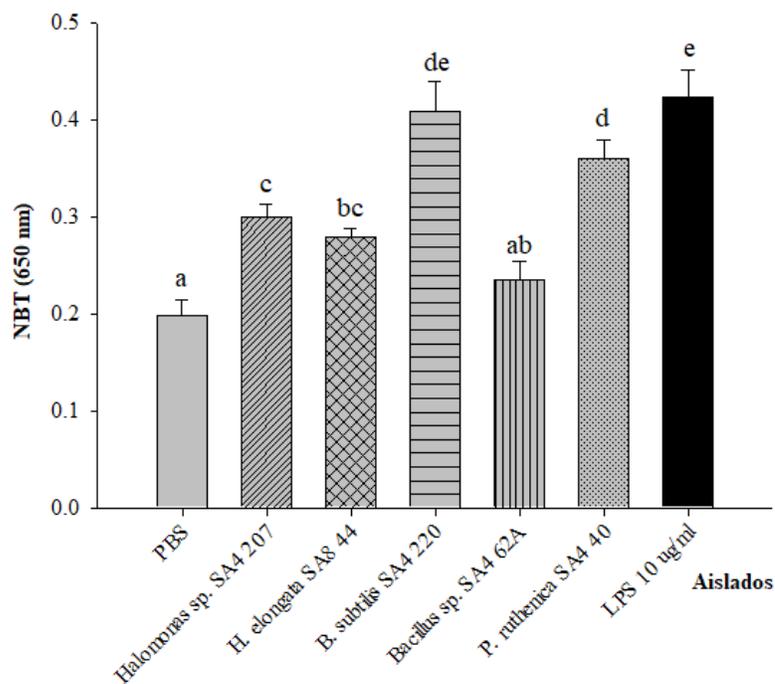


Figura 17. Explosión respiratoria *in vitro* de leucocitos de bazo de ratón tratados con células inactivadas de los aislados seleccionados. Los datos representan la media más desviación estándar.

7.3.6 Evaluación de enzimas antioxidantes

Los cinco aislados mostraron resultados similares en la evaluación de la actividad antioxidante enzimática de los leucocitos tratados (Figs. 18-20). En el ensayo de cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) todos los aislados mostraron un incremento significativo con respecto al tratamiento con PBS; y cabe destacar que no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con 10 µg/mL de LPS de *E. coli* (control positivo). Por otra parte, todos los aislados indujeron incrementos significativos en las actividades de las enzimas de mieloperoxidasa (MPX) y catalasa (CAT) con respecto al tratamiento con PBS. Particularmente, el aislado *B. subtilis* SA4 220 no indujo diferencias significativas en la actividad de la enzima MPX con respecto al control positivo. Además, los aislados *Halomonas* sp. SA4 207 y *P. ruthenica* SA4 40 no

indujeron diferencias significativas en la actividad de la enzima CAT, con respecto al control positivo.

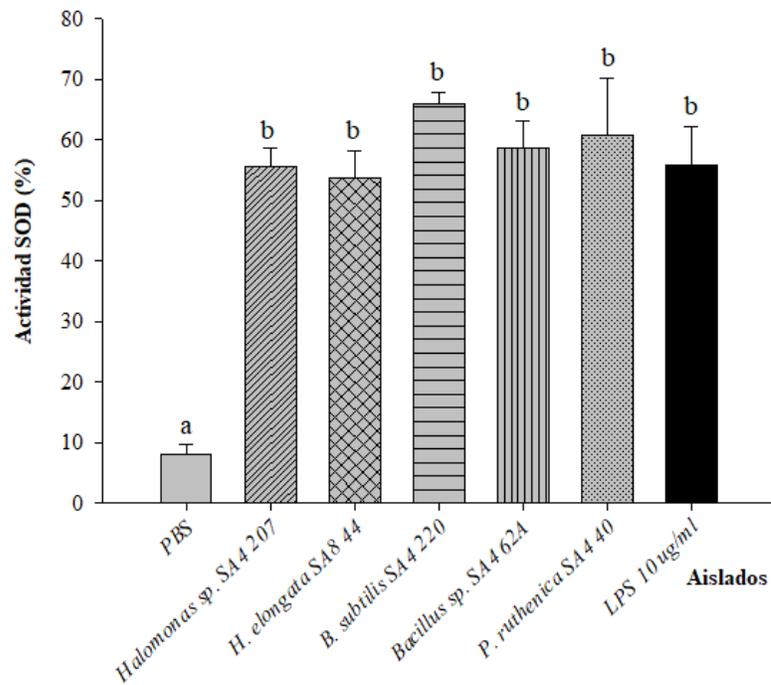


Figura 18. Actividad de SOD *in vitro* de leucocitos de bazo de ratón tratados células inactivadas de los aislados seleccionados. Los datos representan la media más desviación estándar.

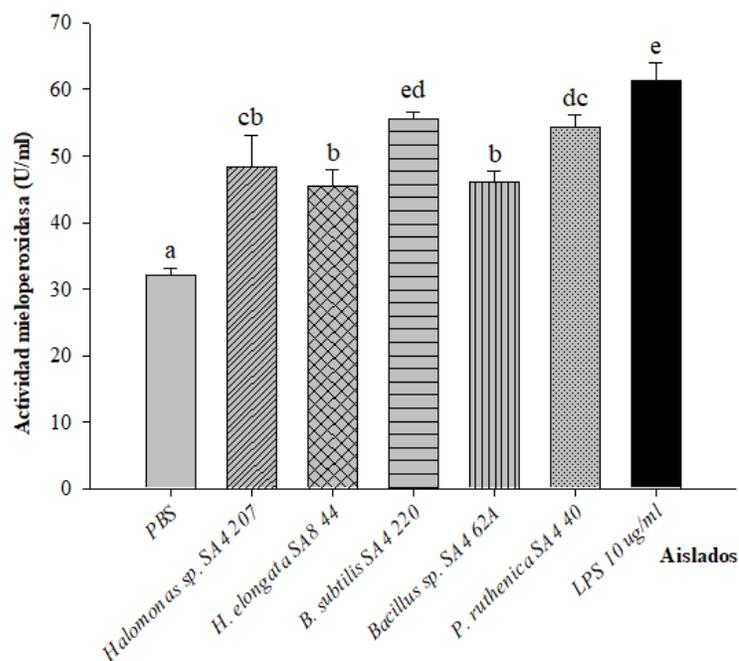


Figura 19. Actividad MPX *in vitro* de leucocitos de bazo de ratón tratados con células inactivadas de los aislados seleccionados. Los datos representan la media más desviación estándar.

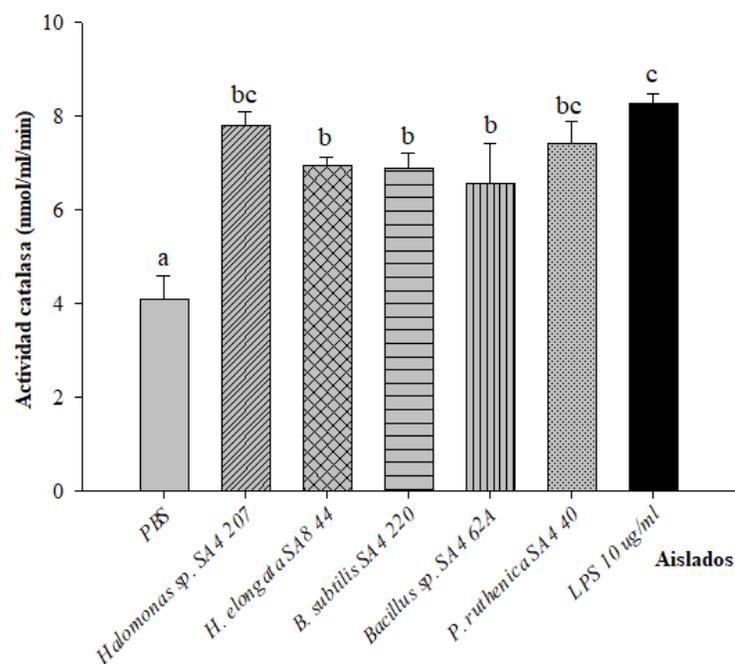


Figura 20. Actividad de CAT *in vitro* de leucocitos de bazo de ratón tratados con células inactivadas de los aislados seleccionados. Los datos representan la media más desviación estándar.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años las bacterias patógenas han desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados. Actualmente, existen diversas alternativas que están siendo desarrolladas para resolver este problema. La búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos y compuestos inmunoestimulantes son dos de las alternativas más prometedoras. Aunado a esto los ambientes marinos extremos han demostrado ser una fuente de compuestos con actividades biológicas que pueden ser aprovechadas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias con actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. Para esto, se aislaron bacterias de un ambiente marino hipersalino en la salina marina de Guerrero Negro y de un ambiente marino termal en una ventila marina hidrotermal somera adyacente a playa Santispac en Bahía Concepción. En la salina marina se tomaron muestras de sedimento y agua de dos estanques concentradores a 40 y 80 ups; y en la ventila hidrotermal se tomaron muestras de sedimento a diferentes profundidades y muestras de agua.

En la salina marina se obtuvieron más aislados del estanque a 40 ups (estación de bombeo) que del estanque a 80 ups (estanque 4). Estos resultados contrastan con el estudio realizado por Javor *et al.* (1986) donde obtuvieron más aislados en estanques más concentrados que en estanques menos concentrados. Ellos propusieron que en estanques concentrados los microorganismos cultivables se concentran de manera pasiva en la salmuera debido a la evaporación del agua. En contraparte, Dillon *et al.* (2013) encontraron que la diversidad de bacterias no disminuye conforme aumenta la salinidad, basados en un estudio de secuenciación del gen 16S ARNr de los estanques 9 (180 ups), 11 (350 ups) y 12 (37 ups). Determinar la diversidad y abundancia de microorganismos a través del gradiente de salinidad en la salina marina de Guerrero Negro requiere de un diseño muestral complejo y representativo, ya que éste no es un ecosistema estático, por el contrario es un ecosistema dinámico que cambia su estructura de manera longitudinal y estratificada, debido a cambios fisicoquímicos ocasionados por el día, la noche, las estaciones del año, etc.

Por otra parte, para realizar el aislamiento de bacterias se utilizaron diferentes medios de cultivo. El medio de cultivo 2216 fue el medio con mayor número de aislados. Esto se debió a que estaba compuesto por diferentes sales de sulfato y cloruro, principalmente NaCl y MgCl₂, siendo el Na⁺ y Mg²⁺ los principales iones que delimitan el crecimiento de bacterias en ambientes salinos (Javor *et al.*, 1986). En contraste, el medio M4 fue el medio con menor número de aislados, ya que estaba suplementado con propionato de sodio. Las bacterias de ambientes marinos salinos pueden crecer en medios de cultivo suplementados con ácidos carboxílicos de bajo peso molecular como el propionato de sodio. Sin embargo, el propionato inhibe parcialmente el crecimiento de algunos halófilos, principalmente halófilos extremos y moderados (Javor *et al.*, 1986).

Con respecto a la ventila hidrotermal se obtuvieron más aislados en las muestras de sedimento que en las muestras de agua. Este resultado concuerda con el estudio de Rajasabapathy *et al.* (2014) en el cual obtuvieron 8.27×10^5 UFC/mL en muestras de sedimento y 7.62×10^4 UFC/mL en muestras de agua de una ventila hidrotermal somera en Espalmanca, Portugal. Adicionalmente, Lentini *et al.* (2014) encontraron que en una ventila hidrotermal somera en las islas Eolian, Italia, el índice de diversidad microbiana (Shannon) era más alto en el sedimento que en el agua. Los autores encontraron que diversos grupos bacterianos como las *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacteria* abundaban en sedimento, pero en el agua mostraron baja abundancia.

Una vez que se obtuvieron todos los aislados, se evaluó su actividad antimicrobiana contra diferentes cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* y *A. hydrophila*. Sin embargo, antes de realizar los ensayos se evaluó el crecimiento de las bacterias patógenas en los medios donde se cultivaban los aislados. A excepción de *S. aureus* RM01, las bacterias patógenas no pudieron crecer en los medios ajustados a 8% de NaCl. Diversos estudios han demostrado que estas especies de bacterias patógenas disminuyen su tasa de crecimiento o no pueden crecer en medios altas concentraciones de sales. Por ejemplo, Kunnin *et al.* (1992) encontraron que *E. coli* tolera concentraciones de 0.1 – 0.7M de NaCl, es decir hasta 4%. En otro estudio, Thayer *et al.* (1987) encontraron que *S. typhimurium* ATCC 14028 puede crecer en concentraciones de hasta 5% de NaCl; y Pianetti *et al.* (2016)

determinaron que 170 cepas de *A. hydrophila* aisladas de peces podían cultivarse en medios con hasta 6% de NaCl. Por el contrario *S. aureus* es una de las eubacterias halotolerantes más resistentes, pudiendo crecer en medios de cultivo suplementados con 3.5M (20%) de NaCl (Graham *et al.*, 1992). Una vez determinado el crecimiento de las especies de bacterias patógenas, se evaluó la actividad antimicrobiana de los 430 aislados marinos. Con base en los resultados se seleccionaron 15 aislados (3.4% del total de aislados) que presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una de las cepas patógenas. Específicamente 9 de los 267 aislados de la salina marina presentaron actividad antimicrobiana. En contraste, Ballav *et al.* (2014) encontraron que 45 de 70 aislados bacterianos obtenidos de muestras de salmuera de una salina solar en Goa, Indi, presentaban actividad antimicrobiana contra al menos una bacteria patógena. En comparación con el presente estudio, Ballav *et al.* (2014) encontraron mas aislados con actividad antimicrobiana, esto se debió a que utilizaron un mayor numero de especies de bacterias patógenas, mientras que en el presente trabajo se utilizaron únicamente 4 especies y se confirmo que la actividad antimicrobiana se presentara en diferentes cepas de la misma especie patógena. Por otro lado, se identificó que 6 (8%) de los 73 aislados bacterianos obtenidos del manglar que se encontraba por encima de la ventila hidrotermal en Bahía Concepción presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una bacteria partógena. En contraste, Hong *et al.* (2009) encontraron que el 5% de los aislados bacterianos que obtuvieron de muestras de sedimento de un manglar en China presentaron actividad antimicrobiana contra una cepa de *Staphylococcus aureus*. Cabe destacar que las condiciones de aislamiento, asi como el método para evaluar la actividad antimicrobiana de los aislados fueron similares a las que se utilizaron en el presente estudio, lo que pudiera explicar los porcentajes tan cercanos de aislados con actividad antimicrobiana.

Posteriormente se repitió nuevamente la determinación del crecimiento de las especies de bacterias patógenas, pero únicamente en los medios donde se cultivaban los aislados seleccionados ($n=15$), con el objetivo de ajustar el comportamiento de las curvas utilizando modelos de regresión no lineal y para poder determinar el tiempo de fase exponencial tardía de manera matemática. De acuerdo con los parámetros cinéticos de las curvas ajustadas, las bacterias patógenas (a excepción de *S. aureus* RM01) presentaron mayor crecimiento

poblacional y menor tiempo de fase exponencial tardía en los medios que no se suplementaron con NaCl (Lb y TSB). Además, las fases típicas de una curva de crecimiento no estaban bien definidas. Estos resultados concuerdan con diversos estudios que establecen que estas 3 especies de bacterias patógenas si pueden crecer en medios de cultivo suplementados con NaCl, sin embargo, no crecen de manera óptima. Además, la fase de adaptación o fase lag se incrementa como consecuencia del estrés osmótico. En este sentido se ha reportado que *E. coli* puede crecer en medios con hasta 0.7 M de NaCl e incluso puede crecer de 0.7 M a 1.2 M pero disminuye hasta 90% su tasa de crecimiento (Ishida *et al.*, 1996). De forma similar, aislados clínicos de *S. typhimurium* disminuyen hasta 15.6% la cantidad relativa de crecimiento aeróbico a concentraciones de 5% de NaCl. Además, *A. hydrophila* disminuye su crecimiento de 1.28-1.5 unidades de densidad óptica a 610 nm en medios sin sal y hasta 0.01-0.09 en medios con 6% de NaCl (Dahdouh *et al.*, 2016).

A pesar de que las especies de bacterias patógenas disminuyeron su crecimiento en los medios con NaCl, su crecimiento fue superior a 0.2 de absorbancia lo que permitió evaluar el efecto antimicrobiano de los aislados. En paralelo, los aislados se identificaron por amplificación del gen 16S ARNr. Los aislados que mostraron actividad antimicrobiana y que fueron obtenidos de la salina marina pertenecían al filo *Proteobacteria*. Esto se debió a que la superficie del sedimento en la salina marina de Guerrero Negro está dominada por bacterias del filo *Cyanobacteria*. Sin embargo, en un estudio se encontró que las capas adyacentes (hasta los 10 mm de profundidad) están compuestas principalmente por bacterias del filo *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, siendo este último el tercer filo más abundante (Ley *et al.*, 2006). Además se agruparon en las clases *Gammaproteobacteria* y *Alfaproteobacteria*. Esto se debió a que las *Delta*, *Gamma* y *Alfaproteobacteria* son clases más abundantes del filo *Proteobacteria* en la estratificación filogenética de los primeros 10 mm del estanque a 80 ups (estanque 4) (Kirk *et al.*, 2013), y coincide también con lo observado en estanque a 40 ups (estación de bombeo). El papel del filo *Proteobacteria* en ambientes salinos, como la salina marina de Guerrero Negro, es contribuir (aunque en menor proporción que el filo *Cyanobacteria* y *Chloroflexi*) en la fijación del carbono inorgánico que sustenta la mayor parte de la biomasa en las capas más

profundas del sedimento (Ley *et al.*, 2006). Adicionalmente, algunos géneros del filo *Proteobacteria* están asociados a la oxidación y reducción de sulfuros (Tang *et al.*, 2013). Una vez identificados los aislados con actividad antimicrobiana, se caracterizó el espectro de acción del (os) compuesto (s) presente (s) en el sobrenadante de los aislados por medio de un ensayo de actividad antimicrobiana contra 5 cepas de cada especie de bacteria patógena. Cabe destacar que el aislado *Staphylococcus equorum* SA4 29 obtenido de la salina marina de Guerrero Negro fue descartado del resto de los ensayos debido que está reportado como una bacteria patógena. En este caso, *S. equorum* está implicada en la etiología de una gran variedad de infecciones humanas y animales, entre ellas la mastitis bovina [Vissscher *et al.*, 2016] e infecciones nosocomiales (Novakova *et al.*, 2006). Por otra parte, el aislado *Pseudoalteromonas sp.* SEB 727 también fue descartado porque presentó una actividad muy baja ($4.54 \pm 2.57\%$ de inhibición) contra *S. typhimurium* UG03. El resto de los aislados seleccionados ($n=13$) presentaron diferentes espectros de acción: algunos lograron inhibir el crecimiento de todos los patógenos, otros inhibieron a ciertas especies y otros únicamente a ciertas cepas. Específicamente el aislado *Marinobacter adhaerens* SEB 735 obtenido del estanque a 40 ups inhibió el crecimiento de 1 de las 5 cepas de *S. aureus* utilizadas. La especie *Marinobacter adhaerens* fue recientemente reportada por primera vez por Kaepfel *et al.* (2012) y fue obtenida de agregados marinos formados con la diatomea *Thalassiosira weissflogii*. Además, fue caracterizada como una bacteria tipo bacilo Gram negativo, móvil y con un flagelo polar (Kaepfel *et al.*, 2012). Actualmente esta especie se está convirtiendo en un modelo de estudio para la interacción entre bacterias y diatomeas (Stahl *et al.*, 2016; Sonnenschein *et al.*, 2012). Sin embargo, este es el primer reporte acerca de la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en la especie *M. adhaerens*. Estos compuestos antimicrobianos pudieran tener un papel importante en la interacción bacteria-diatomea, influenciando el microbioma así como la abundancia de bacterias nocivas. Curiosamente, este tipo de interacciones ya se han reportado en comunidades microbianas asociadas a esponjas marinas (Esteves *et al.*, 2017).

Las 3 cepas de *Pseudoalteromonas ruthenica* que se aislaron presentaron diferentes espectros de acción. La cepa SA4 36A de *P. ruthenica* logró inhibir el crecimiento de 3 de

las 5 cepas de *S. aureus*; mientras que la cepa SA4 40 inhibió menos del 40% del crecimiento de una cepa de *A. hydrophila*; y finalmente la cepa SA4 36B que logró inhibir 4 de las 5 cepas de *S. aureus*, además de inhibir a *A. hydrophila* 135. Las bacterias del género *Pseudoalteromonas* son un grupo de bacterias Gram negativas, heterotróficas, aerobias, poseen un flagelo polar y tienen un contenido de GC de entre 38 y 50% (Ivanova *et al.*, 1998). Generalmente se encuentran asociadas a animales sanos y algas (Offret *et al.*, 2016). Además, *P. ruthenica* se ha encontrado asociada a las almejas *Crenomytilus grayanus*, *Pactinopecten yessoensis* y al tracto digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Ivanova *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011). Para el aislamiento y cultivo de *P. ruthenica* son necesarios medios de cultivo preparados con agua de mar (Ivanova *et al.*, 1998). Sin embargo en el presente trabajo se aislaron en medios de cultivo con agua destilada, lo que pudiera indicar la versatilidad metabólica que tiene este género para adaptarse a diferentes ambientes. En cuanto a su posible patogenicidad, solo han sido identificadas algunas cepas como patógenas (ninguna de *P. ruthenica*), específicamente la especie *P. agarivorans* que ha sido reportada como patógena para la esponja de mar *Rhopaloeides odorabile* (Choudhury *et al.*, 2015) y *P. pscicida* que ocasiona una infección llamada flavobacteriosis en peces (Austin *et al.*, 1993). Sin embargo, este género es de gran interés para la comunidad científica por su capacidad de producir metabolitos antimicrobianos y su asociación con macrorganismos (Bowman *et al.*, 2007). La especie *P. ruthenica* ya ha sido reportada como productora de compuestos antimicrobianos contra otras bacterias patógenas y no patógenas. Kalinovskaya *et al.* (2004) identificaron una cepa obtenida de la Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales (NCIMB, por sus siglas en inglés) que mostró actividad antimicrobiana contra otras bacterias marinas como *Shewanella fridigimarina*, *S. fidelis*, *S. paeleana*, *Alcanivorax jadensis* y *Marinobacterium georgiensis*. Sin embargo, no tuvo actividad contra *S. aureus* y *E. coli*. En otro estudio realizado por Vynne *et al.* (2011) se identificó una cepa de *P. ruthenica* con actividad contra *Vibrio anguillarum*, un patógeno que ocasiona vibriosis en salmón y numerosas especies acuáticas. Sin embargo, actualmente no se han identificado cepas de *P. ruthenica* con actividad contra cepas de *S. aureus* multidrogo-resistentes y *A. hydrophila*, lo que pudiera indicar que los aislados del presente trabajo producen compuestos antimicrobianos

aún no reportados. En cuanto a su posible estructura, los metabolitos antimicrobianos (MA) conocidos del género *Pseudoalteromonas* son clasificados en alcaloides (46% de los metabolitos reportados), poliketidos (29%) o péptidos (25%) (Mansson *et al.*, 2011). Además, la capacidad de producir estos MA ha sido asociada con la producción de pigmentos, ya que el 80% de las especies con actividad antimicrobiana son pigmentadas (Bowman *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2014). En contraste, en el presente trabajo las 3 cepas de *P. ruthenica* aisladas no produjeron pigmentos, lo que respalda la propuesta de que los metabolitos antimicrobianos que producen estas cepas no han sido reportados. Otra especie del mismo género que se aisló del estanque a 40 ups fué *Pseudoalteromonas pscicida* SEB 706 que inhibió el 100% del crecimiento de *A. hydrophila* 135 y poco menos del 40% del crecimiento de 1 de las 5 cepas de *S. aureus*. La bacteria *P. pscicida* pertenece a las especies pigmentadas (pigmentos amarillos) del género *Pseudoalteromonas* [Bowman *et al.*, 2007] y está implicada en el asentamiento y protección de una gran variedad de organismos marinos invertebrados (Holmström *et al.*, 2002). Al respecto, se ha encontrado que produce compuestos bromados (aun no identificados) y compuestos de bajo peso molecular que pueden lisar células algales (Lovejoy *et al.*, 1998; Skerratt *et al.*, 2001; Skerratt *et al.*, 2002). Esta actividad sucede durante la formación de blooms de dinoflagelados de los géneros *Gymnodinium*, *Chatonella* y *Heterosigma*, por lo que se ha sugerido que utiliza este mecanismo para generar nutrientes para atraer a organismos marinos invertebrados y asociarse a ellos (Skerratt *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha encontrado que algunas cepas son patógenas para peces y moluscos; sin embargo, solo un pequeño porcentaje de las cepas presenta esta característica (Bowman *et al.*, 2007; Meyers *et al.*, 1959). En cuanto a su actividad antimicrobiana, Longeon *et al.* (2004) encontraron que la cepa X153 de *P. pscicida* protege a diversas especies de moluscos comerciales contra la infección de *Vibrio spp.*, ya que produce una proteína tetramérica de 280 kDa con efecto bacteriostático. Aunado a esto, Del Castillo *et al.* (2008) aislaron la cepa A1-J11 *P. pscicida* a partir de muestras de agua de la bahía Kagoshima en Japón, cuyos extractos metanólicos tenían actividad antimicrobiana contra *Vibrio harveyi*. Sin embargo, no se ha reportado actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *A. hydrophila*, por lo que probablemente se trate de un compuesto innovador no reportado actualmente contra

bacterias Gram positivas o la misma proteína con un espectro de acción más extendido. Además, la actividad que presenta contra *A. hydrophila* 135 (100% de inhibición) es alta a pesar de ser un sobrenadante (no purificado), por tanto pudiera aplicarse como un agente de biocontrol contra *A. hydrophila* y especies del género *Vibrio* en peces.

Por otro lado, dos aislados obtenidos del estanque a 80 ups lograron inhibir el crecimiento de 3 especies de patógenos. El primero fue *Nesiotobacter exalbescens* SA4 57A, el cual logró inhibir las 5 cepas de *S. typhimurium*, la cepa de *A. hydrophila* 135 y dos de las 5 cepas de *S. aureus* multidrogo-resistentes. El género *Nesiotobacter* fue recientemente propuesto, publicado y aceptado internacionalmente en 2006 (Donachie *et al.*, 2006). La única especie con la que cuenta este género es *N. exalbescens*, la cual ha sido caracterizada como bacilo recto Gram negativo con motilidad. Esta especie puede crecer en concentraciones de NaCl de 1-17.5% y en un rango de temperaturas de 4-45 °C, por lo que es considerado un termófilo moderado (Donachie *et al.*, 2006). En el presente trabajo las condiciones en que se cultivó se encuentran dentro de los rangos reportados por Donachie *et al.* (2006), además de que presenta la misma morfología microscópica. Actualmente, no se ha reportado que las bacterias de este género presenten actividad antimicrobiana, por lo que el presente trabajo sería el primer reporte y representa un candidato importante para extraer, purificar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad. El segundo aislado que inhibió a 3 especies de patógenos fue *Marinobacter persicus* SA4 57B que logró inhibir el crecimiento de una cepa de *S. aureus*, una cepa de *S. typhimurium* y a la cepa de *A. hydrophila* 135. Aunque la actividad antimicrobiana fue baja contra las 3 especies (menor a 60%), *M. persicus* SA4 57B es un aislado prometedor ya que únicamente ha sido reportada por Bagheri *et al.* (2013). En ese estudio, aislaron *M. persicus* de un lago hipersalino en Irán y fue caracterizada como un bacilo redondo, Gram negativo, estrictamente aerobio, cuyas colonias son color amarillo y puede crecer en concentraciones de 5-20% NaCl, por lo que es considerado un halófilo moderado. Cabe destacar que las condiciones de cultivo que se utilizaron en el presente trabajo se encuentran dentro de los parámetros que utilizó Bagheri *et al.* (2013).

Por otro lado, de acuerdo el tamizaje y la identificación molecular, los aislados que mostraron actividad antimicrobiana que fueron obtenidos de la ventila hidrotermal en Bahía

Concepción pertenecían al filo *Firmicutes*. Esto se debió a que el filo *Firmicutes*, después del filo *Proteobacteria*, se encuentra entre los filos más abundantes en el sedimento de la ventila hidrotermal en Bahía Concepción (Dávila –Ramos *et al.*, 2015). Aunado a esto, un fenómeno similar ocurre en una ventila marina hidrotermal somera en Espalmanca, Portugal; el 3.2% de bacterias cultivables pertenecen al filo *Firmicutes*, mientras que el resto pertenece a los filos *Proteobacteria* (85.9 %), *Bacteroidetes* (10 %) y *Actinobacteria* (0.9 %). Esto pudiera indicar la similitud que existe en el microbioma de ventilas marinas ubicadas en lugares separados, debido a condiciones ambientales parecidas. Cabe señalar que en el presente trabajo todos los aislados con actividad antimicrobiana se obtuvieron de las muestras de sedimento. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Lentini *et al.* (2014) en una ventila marina hidrotermal somera en las islas Eolian, Italia; donde encontraron que el filo *Firmicutes* era el cuarto filo más abundante (8.025% de abundancia relativa) en el sedimento, mientras que en la columna de agua su abundancia era baja (0.404 % de abundancia relativa). Lo anterior soporta la explicación que hayamos obtenido aislados únicamente del filo *Firmicutes*. Además, la mayoría de ellos se encontraban dentro del género *Bacillus*. Esto concuerda con el estudio de Rajasabapathy *et al.* (2014), en el cual encontraron que *Bacillus* y *Brevibacillus* eran los géneros más abundantes del filo *Firmicutes* en el sedimento y agua de zonas cercanas a una ventila hidrotermal somera.

De igual manera, después de realizar la identificación de los aislados con actividad antimicrobiana de la ventila hidrotermal, se evaluó el espectro de acción contra 5 cepas de cada especie patógena. Algunos aislados lograron inhibir el crecimiento de 3 especies y otros de las 4 especies de bacterias patógenas. Los aislados *Bacillus licheniformis* VSM 475A y VSM 475B inhibieron el crecimiento de 3 especies de patógenos, sin embargo, no se caracterizó su espectro de acción ya que están ampliamente reportadas como productoras de compuestos (aminoácidos, péptidos, polisacáridos y lipopeptidos) con actividad antimicrobiana contra múltiples patógenos (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium fimi*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp.*, *Aeromonas hydrophila*,

Enterobacter aerogenes, *Erwinia carotorovora*, *Pasteurella haemolytica* y *Salmonella gallinarium*) y la posibilidad de encontrar un metabolito innovador disminuye (Chen *et al.*, 2017; Caldera-Olivera *et al.*, 2004; Dischinger *et al.*, 2009; Mendo *et al.*, 2004; Tendulkar *et al.*, 2007; Willey *et al.*, 2008).

Uno de los aislados que logró inhibir el crecimiento de casi todas las cepas de bacterias patógenas fue *Bacillus thermoamylovorans* VSF 459A. En este caso, *B. thermoamylovorans* VSF 459A únicamente no pudo inhibir a la cepa de *S. aureus* 3227. Esta bacteria ha sido caracterizada como un bacilo redondo, Gram positivo y moderadamente termófilo (Combet-Blanc *et al.*, 1995). Curiosamente ha sido aislado de muestras de vino, equipos de ordeña, paja y sedimento (Koeck *et al.*, 2014), y recientemente de un lago geotermal en Indonesia (Yohandini *et al.*, 2015). En el presente trabajo *B. thermoamylovorans* VSF 459A fue aislado del sedimento de la ventila hidrotermal. Por otra parte, en otro estudio se reportó que su temperatura de crecimiento óptima es de 50 °C y que no puede crecer debajo de los 40 °C (Koeck *et al.*, 2014). Lo anterior es interesante porque puede significar que la temperatura a la que se cultivó *in vitro* en el presente trabajo (55 °C) necesita ajustarse a 50 °C. De esta manera, es probable que se pudiera aumentar la producción de compuestos antimicrobianos y una mayor actividad antimicrobiana, aunque esta hipótesis debe ser probada. Sin embargo, actualmente no existen reportes sobre actividad antimicrobiana en esta bacteria; y aunado a esto, su espectro de acción sugiere que el aislado *B. thermoamylovorans* VSF 459A es uno de los mejores candidatos para estudios posteriores de caracterización de su actividad biológica y de los compuestos bioactivos que produce.

Finalmente los aislados que lograron inhibir el crecimiento de todas las bacterias patógenas fueron las cepas de *Bacillus hisashii* VSF 383A, VSF 383B y VSF 459C. El primer y único reporte de esta bacteria fue en 2015 por Nishida *et al.* (2015) donde la aislaron del intestino de ratones gnotobióticos alimentados con composta termofílica fermentada. Esta composta estaba compuesta por desechos de pequeños animales marinos como peces, cangrejos y camarones que fueron descartados del consumo humano. En contraste, en el presente trabajo se aisló del sedimento de la ventila marina hidrotermal en Bahía Concepción. Además, en ese mismo trabajo Nishida *et al.* (2015) propusieron a la especie *B. hisashii* y

la caracterizaron como un bacilo redondo, Gram positivo, termofílico y cercanamente relacionado con *B. thermoamylovorans* CNCM I-1378. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, ya que esta bacteria fue obtenida a una temperatura de 55 °C; y concuerda además con el hecho de que la segunda bacteria con mayor porcentaje de similitud y puntaje de alineamiento fue *B. thermoamylovorans* LMG18084. Estos resultados junto con la evaluación del espectro de acción de su sobrenadante, la colocan como el aislado más prometedor de este estudio y del cual existe una mayor posibilidad de encontrar metabolitos antimicrobianos de amplio espectro e innovadores. Debido a esto el aislado *B. hisashii* 459C fue seleccionado para evaluar el comportamiento de las cepas de bacterias patógenas en presencia de su sobrenadante a través del tiempo.

Primeramente, todas las cepas patógenas pudieron crecer en el medio Soya y tripticaseína hasta alcanzar concentraciones de 10^9 células/mL. Esto se debió a que es un medio de cultivo complejo altamente nutritivo que soporta el crecimiento de una gran variedad de bacterias, incluyendo Gram negativas y Gram positivas (Rocelle *et al.*, 1995). Por otra parte, ninguna de las cepas patógenas logró crecer en presencia del antibiótico gentamicina debido a que es un antibiótico de amplio espectro que inhibe tanto a bacterias Gram negativas como Gram positivas, y lo hace a través de su unión a la subunidad 30S del ARNr e impidiendo la síntesis de proteínas (Yoshizawa *et al.*, 1998).

El comportamiento de todas las cepas evaluadas en presencia del sobrenadante del aislado *B. hisashii* 459C fue variado entre especies y cepas patógenas. Específicamente las cepas de *S. aureus* 3202, 3227 y 4332, así como las cepas SH2 y SOG de *S. typhimurium*, y las cepas de *E. coli* 23 y *A. hydrophila* 135 no aumentaron su concentración celular a través del tiempo hasta las 24 h. El comportamiento de estas curvas indica que los compuestos activos en el sobrenadante se encontraban igual o por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC por siglas en inglés) para cada una de estas cepas evaluadas (Scheerans *et al.*, 2015). Cabe destacar que cuando se evalúa el comportamiento de bacterias por el método de microdilución en líquido, la concentración mínima inhibitoria se define como la concentración más baja que no ocasiona un crecimiento poblacional (Schon *et al.*, 2017). En contraste, las cepas RM01 y B87 de *S. aureus* disminuyeron su velocidad de crecimiento, lo que indica que el compuesto activo (o compuestos activos) se encontraba en

menor concentración que la concentración mínima inhibitoria para estas cepas (Klancnik *et al.*, 2009; Scheerans *et al.*, 2015). En este sentido, algunas familias de antibióticos ocasionan un comportamiento similar en bacterias patógenas; por ejemplo, la familia de los aminoglucósidos exhiben actividad antimicrobiana bactericida dependiente de la concentración (Bernier *et al.*, 2013). Es importante destacar que se ha reportado que los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* con bacterias a concentraciones de entre 10^5 - 10^6 células/mL difieren de la situación *in vivo*, por lo que se sugiere realizar ensayos *in vivo* para simular las condiciones reales dentro de hospedero, como por ejemplo: un mayor número de bacterias en el sitio de infección usualmente están sometidas a concentraciones fluctuantes de los antibióticos (Lim *et al.*, 2015).

Por otra parte, las cepas UG03, SH1, SOH de *S. typhimurium*, y las cepas UG02 y ECO de *E. coli* no mostraron crecimiento poblacional, si no hasta después de las 20 h incubación con el sobrenadante. Este comportamiento pudiera deberse a que las poblaciones de bacterias no son uniformemente sensibles a los antibióticos, ya que pueden surgir subpoblaciones resistentes durante la exposición a los compuestos (Vogelman *et al.*, 1986). También pudiera deberse al fenómeno llamado “efecto post-antibiótico”, que consiste en una supresión persistente del crecimiento bacteriano ocasionado por una exposición limitada al antibiótico, es decir a un número de dosis y concentraciones muy bajas (Klancnik *et al.*, 2009; Scheerans *et al.*, 2015; Vogelman *et al.*, 1986). William *et al.* (2001) encontraron un efecto post-antibiótico de eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol en *Staphylococcus* spp. y algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Por otro lado, Zhanel *et al.* (1991) realizaron análisis de curvas de inhibición de diversos aminoglucósidos bactericidas y determinaron que utilizar concentraciones sub-inhedoras también ocasiona un decremento en el crecimiento bacteriano o produce un cese completo del crecimiento por varias horas, para después volver a reanudarse. Sin embargo, aunque los modelamientos cinéticos *in vitro* pueden ser útiles en demostrar un efecto post-antibiótico, es difícil poder diferenciar entre los efectos ocasionados por un efecto post-antibiótico y una concentración sub-inhedoras (Vogelman *et al.*, 1986).

Adicional a la actividad antimicrobiana, esta investigación se enfocó a determinar el potencial inmunoestimulante de las bacterias aisladas. Como prueba de tamizaje y selección

preliminar se evaluó la capacidad de los aislados para inducir la producción de óxido nítrico (ON) en leucocitos de bazo de ratón. Además, en paralelo se realizó la identificación de los aislados por amplificación del gen 16S del ARNr. Se encontró que los aislados de la salina marina que indujeron la producción de ON en los leucocitos pertenecían al filo *Proteobacteria*, específicamente a la clase *Gammaproteobacteria* y al filo *Firmicutes*. El filo *Proteobacteria*, junto con los filios *Chloroflexi* y *Bacteroidetes* dominan el sedimento de la salina hasta una profundidad de 10 mm (Ley *et al.*, 2006). Específicamente, las clases más abundantes del filo *Proteobacteria* son las *Delta* y *Gammaproteobacteria* (Dillon *et al.*, 2013). Por otra parte, los aislados de la ventila hidrotermal que indujeron la producción de ON en los leucocitos pertenecían a la clase *Gammaproteobacteria*. Este resultado concuerda con el estudio de Davila-Ramos *et al.* (2015) donde encontraron que en el sedimento de la ventila hidrotermal en Bahía Concepción, la clase *Gammaproteobacteria* es la más abundante dentro del filo *Proteobacteria*. Adicionalmente, Rajasabapathy *et al.* (2014) encontraron que el 68.7% de los aislados obtenidos de una ventila hidrotermal en Espalmanca, Portugal, eran bacterias de la clase *Gammaproteobacteria*; mientras que el resto eran bacterias de las clases: *Alfaproteobacteria* (16.7%), *Betaproteobacteria* (0.5%) y de los filios: *Firmicutes* (3.2%), *Bacteroidetes* (10%) y *Actinobacteria* (0.9%). En otro estudio, Lentini *et al.* (2014) encontraron que el filo *Proteobacteria* es el más abundante (48.46% de abundancia relativa) en el sedimento y en el fluido geotermal de una ventila hidrotermal somera en las islas Eolian, Italia. Sumado a estos estudios, los aislados del presente trabajo que indujeron la producción de ON se obtuvieron de las muestras de sedimento y de acuerdo con la identificación molecular corresponden a diferentes especies del género *Marinobacter*. En este sentido, Rajasabapathy *et al.* (2014) encontraron que *Marinobacter*, junto con *Alcanivorax*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, eran los géneros más abundantes de la clase *Gammaproteobacteria*. Adicionalmente, los autores encontraron que los géneros *Pseudoalteromonas* y *Marinobacter* son los más abundantes en el sedimento de un área sin actividad geotermal y alejada de la ventila hidrotermal somera en Espalmanca, Portugal. Estos resultados sugieren que las bacterias del género *Marinobacter* no habitan exclusivamente los sedimentos de ventilas hidrotermales, por el contrario, las corrientes marinas pudieran desplazarlas en la columna de agua y en el

sedimento marino hasta las ventilas. Aunado a esto, las bacterias del género *Marinobacter* parecen tener la capacidad de tolerar las condiciones ambientales en estos ecosistemas (Kaye *et al.*, 2010).

Una vez identificados los aislados que indujeron la producción de ON se evaluó la viabilidad de los leucocitos tratados. Específicamente, los aislados *Bacillus* sp. SA4 62B, *Bacillus* sp. SA4 64 y las 3 cepas de *Marinobacter lutaoensis* (Cepas: VSM 98, VA 114A y VA114B) disminuyeron en un 50% la viabilidad de los leucocitos tratados, por tanto fueron descartados del resto de los ensayos. En este sentido, se ha reportado que algunas especies del género *Bacillus* son patogénicas. Por ejemplo, *Bacillus cereus* es uno de los principales agentes causantes de infecciones gastrointestinales (Kotiranta *et al.*, 2000), ya que puede producir enterotoxinas, hemolisinas y enzimas como las beta-lactamasas, proteasas y colagenasas que son conocidas como factores de virulencia (Kotiranta *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2007). Otro estudio es el realizado por Celandroni *et al.* (2016) donde identificaron que aislados clínicos de *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. simplex* y *B. mycoides* podían crear biopelículas y secretar proteasas que están implicadas en la virulencia bacteriana. Por el contrario, no existen reportes de cepas de *Marinobacter lutaoensis* patogénicas (la única publicación de esta especie fue realizada por Wung *et al.* (2003), por lo que el presente trabajo es el primer reporte de 3 cepas de *M. lutaoensis* que disminuyeron la viabilidad de leucocitos de ratón. En este sentido es necesario realizar más trabajos de investigación para caracterizar el potencial patogénico de esta especie y si está implicada en la etiología de alguna enfermedad infecciosa. Por otra parte, los aislados *Pseudoalteromonas ruthenica* SA4 40, *Halomonas* sp. SA4 207, *Halomonas elongata* SA4 44, *Bacillus* sp. SA4 62A y *Bacillus subtilis* SA4 220 no disminuyeron la viabilidad de los leucocitos; y por tanto, estas cepas fueron seleccionadas para evaluar si incrementan la actividad fagocítica de los leucocitos tratados.

Paritularmente, el aislado *Pseudolateromonas ruthenica* SA4 40 promovió una mayor (65%) actividad fagocítica comparada con el tratamiento con PBS (pH 7.2, 45%). Además, este aislado fue el quinto mejor inductor de la producción de ON ($8.31 \pm 0.40 \mu\text{M}$). En este sentido, el proceso de fagocitosis es un mecanismo central del sistema inmune que sirve para reconocer y eliminar bacterias patógenas, así como células apoptóticas. Este proceso

consiste en reconocer y endocitar los microorganismos para eliminarlos a través de mecanismos dependientes e independientes de oxígeno (Rojas-Espinosa *et al.*, 2004). Particularmente, uno de los mecanismos dependientes de oxígeno es la producción de ON, el cual es generado por enzimas sintasas (NOS) que oxidan L-arginina a L-citrulina (Kmoníčov *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que el ON posee actividad bactericida, ya que incrementa la permeabilidad vascular, ocasiona daños en el ADN, oxidación de LDL, nitración de aminoácidos como la tirosina y cisteína (inactivación de proteínas) e inhibición de la respiración celular en los microorganismos fagocitados (Bogdan *et al.*, 2015). Esta información indica que el aislado de *P. ruthenica* SA4 40 está siendo reconocido y fagocitado por los leucocitos de bazo de ratón, lo que a su vez ocasiona un aumento en los niveles de ON. Este ON producido, además de tener un efecto bactericida, es un potente factor inmunoregulador que induce/inhíbe la expresión de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ (Guzik *et al.*, 2003). Actualmente, *P. ruthenica* ha sido reportada por Maaetoft-Udsen *et al.* (2012) como un potencial inmunoestimulante. Ellos sugieren que debido a la estructura penta-acylada del lípido A de un lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana de *P. ruthenica*, ésta es reconocida por el receptor TLR4 de las células dendríticas y estimula la producción de IL12, IL-10, TNF- α , CD40 y CD86, aunque la estimulación es menor en comparación con LPS de *E. coli*. Estos resultados soportan la idea de que la cepa *P.ruthenica* SA4 40 del presente trabajo está siendo reconocida, fagocitada e induce la producción de ON; ya que el proceso de fagocitosis involucra el reconocimiento de un ligando por uno o más receptores, entre los que se encuentran la familia de receptores tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés) y específicamente el receptor TLR4 (Williams, 2012).

Por otra parte, los aislados *Halomonas sp.* SA4 207 y *Halomonas elongata* SA4 44, obtenidas del estanque a 80 ups de la salina marina de Guerrero Negro, indujeron que el 75% de los leucocitos tratados presentaran actividad fagocítica. Aunado a esto, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento con 10 μ g/ml de LPS de *Escherichia coli* (control positivo), un potente inmunoestimulante (Esche *et al.*, 2000). Además, interesantemente, estos aislados fueron el primero y el tercero en inducir la mayor producción de ON en los leucocitos. Estos resultados sugieren, que de

manera similar a *P. ruthenica* SA4 40, los aislados de *Halomonas sp.* SA4 207 y *Halomonas elongata* SA4 44 fueron reconocidos y fagocitados por los leucocitos del bazo de ratón, estimulando la producción de ON y a su vez la actividad de mecanismos centrales en el sistema inmune. Cabe destacar, que el género *Halomonas*, así como la especie *Halomonas elongata* fueron reportadas por primera vez en 1980 por Breeland *et al.* (1980). En ese estudio, la bacteria fue aislada de una salinera solar en Holanda y caracterizada como un bacilo Gram negativo que podía crecer en concentraciones de NaCl de entre 0 y 20%. En la actualidad, esta especie se ha utilizado como modelo de estudio de “solutos compatibles”, que es uno de los principales mecanismos de adaptación de microorganismos en ambientes salinos (Kindzierski *et al.*, 2017; Kraegeloh *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta la fecha no existe un estudio donde se caracterice el potencial inmunoestimulante de estas bacterias, lo que hace necesario realizar más trabajos de investigación en este sentido.

Por otra parte, los aislados *Bacillus subtilis* SA4 220 y *Bacillus sp.* SA4 62A también mostraron resultados prometedores. Específicamente, *Bacillus sp.* SA4 62A indujo la mayor actividad fagocítica y no disminuyó la viabilidad de los leucocitos. Lo anterior es crítico ya que un microorganismo inmunoestimulante seguro, no debe provocar la muerte de los leucocitos. Por otro lado, *B. subtilis* SA4 220 indujo una mayor actividad fagocítica respecto al tratamiento control (PBS pH 7.2) y no disminuyó la viabilidad de leucocitos; además, fue el segundo aislado que indujo la mayor producción de ON. En este sentido, la especie *Bacillus subtilis* ya ha sido reportada como un inmunoestimulante y probiótico en diferentes especies animales. Sankar *et al.* (2016) encontraron que la cepa SVG4 de *B. subtilis* producía un compuesto bio-surfactante de tipo lipopéptido que inducía una mayor actividad fagocítica ($32.18 \pm 0.67\%$) en células de riñón cefálico del pez *Labeo rohita*. En otro estudio, Yeh *et al.* (2014) encontraron que la cepa E20 de *Bacillus subtilis* incrementaba significativamente la actividad fagocítica ($14 \pm 0.58\%$) después de ser administrada en la dieta a una concentración de 10^{10} UFC/mL por 28 días en el cangrejo del fango *Scylla spp.*, un crustáceo de alto valor comercial. Además, aunque los autores no observaron un aumento en el crecimiento de los cangrejos, estos aumentaron su resistencia a la infección contra *Vibrio parahaemolyticus*. En este mismo sentido, Jung *et al.* (2015) encontraron que la cepa J92 de *B. subtilis* producía un exopolisacárido que incrementaba la

concentración de NO y de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β en células RAW 264.7 y en macrófagos de ratón. En este caso, el aumento en las concentraciones de ON fue corroborado mediante el aumento en la expresión del gen que codifica para la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), adicionalmente los autores encontraron que el factor de transcripción NF-kB, que está involucrado en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune, se sobre-expresaba. Sin embargo, la actividad fagocítica y la producción de ON en este trabajo fueron relativamente altas con respecto a los controles y a los resultados de otros trabajos. Esto pudiera deberse a que los aislados fueron obtenidos de muestras del estanque a 80 ups de la salina marina en Guerrero Negro, y en este sentido, se ha reportado que algunas moléculas (como los exopolisacáridos) son producidas como mecanismos de adaptación a este tipo de ambientes (Gugliandolo *et al.*, 2015; Nichols *et al.*, 2005). Por ejemplo, los exopolisacáridos se han reportado como potentes inmunoestimulantes que son reconocidos por los receptores TLRs y que activan el factor de transcripción NF-kB, induciendo la producción de diversas citocinas (Jung *et al.*, 2015).

Debido a los resultados obtenidos en los ensayo de actividad fagocítica, se seleccionaron los mismos cinco aislados para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (explosión respiratoria) y la actividad de enzimas antioxidantes en los leucocitos tratados. Particularmente, las cepas SA4 207 y SA4 44 del género *Halomonas*, así como el aislado *P. ruthenica* SA4 40 incrementaron de manera significativa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), mieloperoxidasa (MPX) y catalasa (CAT) en los leucocitos tratados. En este sentido, la generación de ROS es uno de los procesos que se llevan a cabo durante la fagocitosis y es llamado explosión respiratoria. Este proceso comienza con un aumento en el consumo de oxígeno (O₂) y con la activación de la enzima NADPH oxidasa que utiliza NADPH para producir el radical anión superóxido (O²⁻). El O²⁻ a su vez es utilizado como sustrato por la enzima superóxido dismutasa para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Posteriormente, el H₂O₂ en presencia del ión cloro (Cl⁻) es convertido en ácido hipocloroso (HClO). Tanto el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso son potentes agentes oxidantes y antimicrobianos. Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los aislados fueron reconocidos e

indujeron la producción de ROS, que representan uno de los principales mecanismos de defensa del sistema inmune ya que ocasionan daños en el ADN, ácidos grasos (afectando la estructura de membranas celulares) y aminoácidos (afectando el funcionamiento de enzimas). Además, todos los aislados indujeron una mayor actividad de las enzimas antioxidantes; lo que representa un mecanismo de generación y control de las ROS. En este sentido, una sobreproducción de ROS también afecta el funcionamiento de las células del organismo hospedero. Cabe destacar que actualmente no existen trabajos donde se reporten cepas de estas especies como potenciales inmunoestimulantes. De esta manera, los aislados del presente trabajo representan una ventana de oportunidad para realizar trabajos de acerca de la caracterización de esta actividad inmunoestimulante.

Por otra parte, los aislados *Bacillus subtilis* SA4 220 y *Bacillus sp.* SA4 62A también indujeron la producción de ROS, particularmente *B. subtilis* SA4 220 estimuló la mayor producción. Además, ambos aislados incrementaron de manera significativa la actividad de las enzimas antioxidantes en los leucocitos de bazo de ratón. Actualmente, ya se han publicado diversos trabajos donde se caracteriza la potencial actividad inmunoestimulante de especies del género *Bacillus* en diferentes especies animales. Un trabajo en particular es el realizado por Sankar *et al.* (2016) donde encontraron que un lipopéptido producido por la cepa VSG4 de *B. subtilis* incrementaba la producción de ROS (0.387 ± 0.003 abs NBT) en células de riñón cefálico del pez *Labeo rohita*. En otro estudio, Qinghui *et al.* (2011) encontraron que *B. subtilis*, en combinación un flucooligosacárido, aumentaba la producción de ROS (0.22 abs de NBT) y la actividad antioxidante de la enzima SOD (571.45 U/mL) en células de riñón cefálico de la corvina amarilla *Larimichthys crocea*, un pez de importante valor comercial. En contraste, Sangma *et al.* (2015) encontraron que la cepa FPTB13 de *B. subtilis* no incrementaba la producción de ROS ni la actividad de enzimas antioxidantes y mieloperoxidasa en células del riñón cefálico del pez *Catla catla*. De manera similar, Yeh *et al.* (2014) encontraron que la cepa E-20 de *B. subtilis* no incrementó los niveles de ROS ni la actividad antioxidante de la enzima SOD en hemocitos del cangrejo del fango *Scylla paramamosian*. Estos resultados indican que la inmunoestimulación mediada por cepas de la especie *Bacillus subtilis* es diferente ya que, como se mencionó anteriormente, se utilizaron diferentes cepas, células y especies de

animales. Lo anterior indica también que es crucial identificar las cepas que poseen atributos inmunoestimulantes a través de un tamizaje funcional como el que se realizó en esta investigación.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los cinco aislados seleccionados presentan un gran potencial como inmunoestimulantes debido a que no provocan muerte celular, inducen la actividad fagocítica, la explosión respiratoria y la actividad de enzimas antioxidantes. Sin embargo, se resalta la necesidad de realizar más trabajos de investigación para caracterizar la actividad inmunoestimulante para poder evaluar su aplicación como una medida profiláctica.

9. CONCLUSIONES

Las bacterias aisladas de sedimento y agua del estanque a 80 ups (a diferencia del estanque a 40 ups) de la salina marina en Guerrero Negro, y del sedimento de la ventila marina hidrotermal somera en Bahía Concepción presentaron actividad antimicrobiana de espectro variable contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* multi-drógo resistentes, así como *Aeromonas hydrophila*. Particularmente, el aislado *Bacillus hisashii* VSF 459C mostró actividad antimicrobiana contra todas las cepas patógenas evaluadas. Por tanto, esta bacteria es el aislado más prometedor para realizar estudios enfocados a retos de infección *in vivo*, extracción y caracterización del compuesto activo, elucidar el mecanismo de acción, así como evaluar la farmacocinética y farmacodinámica del compuesto.

Por otra parte, las bacterias aisladas del estanque a 80 ups de la salina marina de Guerrero Negro presentaron actividad inmunoestimulante *in vitro* en leucocitos de bazo de ratón. Específicamente, los aislados *Halomonas* sp. SA4 207, *Halomonas elongata* SA4 44, *Bacillus subtilis* SA4 220, *Bacillus* sp. SA4 62A y *P. ruthenica* SA4 40 incrementaron de manera significativa la producción de ON, la actividad fagocítica, la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad enzimática antioxidante, sin disminuir la viabilidad de los leucocitos de bazo de ratón. Cabe destacar que es necesario realizar más estudios para caracterizar la actividad inmunoestimulante identificada. Por ejemplo, estudios acerca de la

expresión diferencial de genes involucrados en de respuesta inmune, retos infecciosos *in vivo* y elucidación del mecanismo de reconocimiento y estimulación del sistema inmune.

10. LITERATURA CITADA

- Aderem A., D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Reviews of Immunology*. 17:593-623.
- Andries K., P. Verhasselt, J. Guillemont, H. W. H. Gohlmann, J. K. Neefs, H. Winkler, J. V. Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 307: 223-227.
- Arena A., C. Gugliandolo, G. Stassi, B. Pavone, D. Iannello, G. Bisignano, T. Maugeri. 2009. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology Letters*. 123(2):132-137.
- Arena A., T. L. Maugeri, B. Pavone, D. Iannello, C. Gugliandolo, G. Bisignano. 2006. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology*. 6(1):8-13.
- Asolkar R. N., T. N. Kirkland, P. R. Jensen, W. Fenical. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of antibiotics*. 63(1):37-39.
- Bagheri M., M. Ali, A. Maryam, C. Sa. 2013. *Marinobacter persicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a saline lake in Iran. *Antonie van Leeuwenhoek*. 104:47-54.
- Ballav S., S. Kerkar, S. Thomas. 2014. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1-8.
- Balouiri M., M. Sadiki, S. K. Ibsouda. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71-79.
- Becerril-Espinosa A., K. C. Freel, P. R. Jensen, I. E. Soria-Mercado. 2013. Marine *Actinobacteria* from the Gulf of California: Diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103(4):809-819.
- Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*. 58(1):1-26.
- Bernier S. P., M. G. Surette. 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural Environments. *Frontiers in Microbiology*. 4:1-14.
- Bogdan C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*. 1-18.

- Bowman J. P. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine drugs*. 5:220-241.
- Breidenstein E. B. M., C. Fuente-Nuñez, R. E. W. Hancock. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. 19(8):419-426.
- Broda D. M., P. Lawson, R. G. Bell, D. R. Musgrave. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with “blown pack” spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:1539-50.
- Bruntner C., T. Binder, W. Pathom-aree, M. Goodfellow, A. T. Bull, O. Potterat, C. Puder, S. Horer, A. Schmid, W. Bolek, K. Wagner, G. Mihm, H. P. Fiedler. 2005. Frigocyclinone, a novel Angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *Journal of Antibiotics*. 58(5):346-349.
- Campbell K.A., K.A. Rodgers, J. M. A. Brotheridge, P. R. L. Browne. 2002. An unusual modern silica-carbonate sinter from Pavlova spring, Ngatamariki, New Zealand. *Sedimentology*. 49:835-54.
- Canet C., R. M. Prol-Ledesma, I. Torres-Alvarado, H. A. Gilg, R. E. Villanueva, R. L. S. Cruz. 2005. Silica-carbonate stromatolites related to coastal hydrothermal venting in Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Sedimentary Geology*. 174(2):97-113.
- Celandroni F., S. Salvetti, S. A. Gueye, D. Mazzantini. 2016. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *Plos one*. 11(3):1-13.
- Chen Y., S. A. Liu, H. Mou, Y. Ma, M. Li, X. Hu. 2017. Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments. *Frontiers in Microbiology*. 8:1-11.
- Choudhury J. D., A. Pramanik, N. S. Webster, L. E. Llewellyn, R. Gachhui, J. Mukherjee. 2015. The Pathogen of the Great Barrier Reef Sponge *Rhopaloeides odorabile* is a new strain of *Pseudoalteromonas agarivorans* containing abundant and diverse virulence-related genes. *Marine Biotechnology*. 17:463-478.
- Christensen H. R., H. Frokiaer, J. Pestka. 2002. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Antibiotics*. 168:171-178.
- Cladera-Olivera F., G. R. Caron, A. Brandelli. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*. 38:251-256.

- Claverías F. P., A. Undabarrena, M. González, M. Seeger, B. Cámara. 2015. Culturable diversity and antimicrobial activity of *Actinobacteria* from marine sediments in Valparaíso bay, Chile. *Frontiers in Microbiology*. 6:1-11.
- Combie J., K. Runnion. 1996. Looking for diversity of Yellowstone extremophiles. *Journal of Industrial Microbiology*. 17:214-218.
- Craig W. A. 1991. The postantibiotic effect. *Clinical Microbiology*. 13(16):121-124.
- Czaplewski L., B. Richard, C. Martha, H. Fairhead. 2016. Alternatives to antibiotics, a pipeline portfolio review. *Lancet*. 16:239-251.
- Dahdouh B., Tanekhy M. 2016. Molecular characterization, antimicrobial susceptibility and salt tolerance of *Aeromonas hydrophila* from Fresh, Brackish. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 48(2):46-53.
- Dávila-Ramos S., A. Estradas-Romero, R. M. Prol-Ledesma, K. Juárez-López. 2015. Bacterial populations (first record) at two shallow hydrothermal vents of the Mexican Pacific west coast. *Geomicrobiology Journal*. 32(8):657-665.
- Deepa S., K. Kanimozhi, A. Panneerselvam. 2013. Antimicrobial activity of extracellular synthesized silver nanoparticles from marine derived *Actinomycetes*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(9):223-230.
- Del Castillo C. S., M. I. Wahid, T. Yoshikawa, T. Sakata. 2008. Isolation and inhibitory effect of anti-Vibrio substances from *Pseudoalteromonas* sp. A1-J11 isolated from the coastal sea water of Kagoshima Bay. *Fisheries Science*. 74:174-179.
- Dharmaraj S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:2123-2139.
- Dillon J. G., M. Carlin, A. Gutierrez, V. Nguyen, N. McLain. 2013. Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja California Sur, Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 4:1-13.
- Dillon J. G., D. A. Stahl, S. Miller, B. Bebout, M. Hullar. 2009. Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbial Ecology*. 68:46-58.
- Dischinger J., J. Dischinger, M. Josten, C. Szekat, H. Sahl, G. Bierbaum. 2017. Production of the novel two-peptide lantibiotic Lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Plos One*. 4:1-11.
- Donachie S. P., J. P. Bowman, M. Alam. 2017. Moderately thermophilic *Alphaproteobacterium* from a Hawaiian hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:563-567.

- Dong Y. H., L. H. Wang, J. L. Xu, H. B. Zhang, X. F. Zhang. 2001. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Letters to Nature*. 411: 813-817.
- Edrington T. S., R. L. Farrow, M. E. Hume, P. N. Anderson, G. R. Hagevoort, D. J. Caldwell, D. J. Nisbet. 2013. Evaluation of the potential antimicrobial resistance transfer from a multi-drug resistant *Escherichia coli* to *Salmonella* in dairy calves. *Current Microbiology*. 66(2):132-137.
- Eftekharzadeh B., J. Hamedi, F. Mohammadipanah, F. Khodaghali, N. Maghsoudi, H. P. Klenk. 2010. Inhibition of oxidative stress-induced amyloid β formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 26:1805-1811.
- Engelhardt K., K. F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjaervik, G. Klinkenberg, S. B. Zotchev. 2010. Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardiovoxis* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(15):4969-4976.
- Esche U. V. D., M. Ayoub, S. D. C. Pfannes, M. R. Muller, M. Huber, K. H. Wiesmuller, T. Loop, K. F. Fischbach. M. Strukelnberg, P. Hoffmann, W. G. Bessler, K. Mittenbuler. 2000. Immunostimulation by bacterial components: I. Activation of macrophages and enhancement of genetic immunization by the lipopeptide P3CSK4. *International Journal of Immunopharmacology*. 22:1093-1102.
- Esikova T. Z., Y. V. Temirov, S. L. Sokolov, Y. B. Alakhov. 2002. secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic *Bacillus* spp. strains VK2 and VK21. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38(3):226-231.
- Esteves A. I. S., A. Cullen, T. Thomas. 2017. Competitive interactions between sponge-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 93:1-8.
- Forrest M. J., J. Ledesma-Vázquez, W. Ussler, J. T. Kulongoski, D. R. Hilton, H. G. Greene. 2005. Gas geochemistry of a shallow submarine hydrothermal vent associated with the El Requesón fault zone, Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology*. 224(3):82-95.
- Gabani P., D. Prakash. 2012. Emergence of antibiotic-resistant extremophiles (AREs). *Extremophiles*. 16:697-713.
- Gelband H., M. Miller-Petrie. 2015. The state of the world's antibiotics 2015. Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C, 1-84.
- Giddings L., D. J. Newman. 2015. Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. *SpringerBriefs in Microbiology*. 1-75.

- Graça A. P., F. Viana, J. Bondoso, M. I. Correia, L. Gomes, M. Humanes, O. M. Lage. 2015. The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae). *Frontiers in Microbiology*. 6:389.
- Grahamt J. E., B. J. Wilkinson. 1992. *Staphylococcus aureus* Osmoregulation: Roles for Choline, Glycine, Betaine, Proline, and Taurine. *Journal of Bacteriology*. 174(8):2711-2716.
- Gugliandolo C., A. Spanò, V. Lentini, A. Arena, T. L. Maugeri. 2014. Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin. *Journal of Applied Microbiology*. 116(4):1028-1034.
- Gugliandolo C., A. Spanò, T. Maugeri, A. Poli, A. Arena, B. Nicolaus. 2015. Role of bacterial exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by Herpes Virus. *Microorganisms*. 3(3):464-483.
- Gusik T. J., R. Korbut, T. Adamek-Gusik. 2003. Nitric oxide and superoxide inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54(4):469-487.
- Hamaki T., M. Zusuki, R. Fudou. 2005. Isolation of novel bacteria and *Actinomycetes* using soil-extract agar medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99(5):485-492.
- Hamedi J., M. Fatemeh, A. Ventosa. 2013. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant *Actinomycetes*. *Extremophiles*. 17:1-13.
- Holmes A. H., L. S. P. Moore, S. Arnfinn, M. Steinbakk. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial Resistance. *Lancet*. 387:176-187.
- Holmstro C., S. Mccloy. 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology*. 41:47-58.
- Hong K., A. H. Gao, Q. Y. Xie, H. Gao, L. Zhuang, H. P. Lin, J. S. Ruan. 2009. *Actinomycetes* for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*. 7(1):24-44.
- Huang H., X. Wu, S. Yi, Z. Zhou, J. Zhu, Z. Fang, S. Bao. 2009. Rifamycin S and its geometric isomer produced by a newly found actinomycete, *Micromonospora rifamycinica*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95(2):143-148.
- Huang Y., M. Li, Z. Yu, P. Y. Qian. 2014. Correlation between pigmentation and larval settlement deterrence by *Pseudoalteromonas* sp. sf57. *Biofouling*. 27:37-41.

Hutson R. A., D. E. Thompson, M. D. Collins. 1993. Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 10:103-110.

Ibrahim M. E., N. E. Bilal, M. E. Hamid. 2012. Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. *African Health Sciences*. 12(3):368-375.

Ikram R., R. Psutka, A. Carter, P. Priest. 2015. An outbreak of multi-drug resistant *Escherichia coli* urinary tract infection in an elderly population: a case-control study of risk factors. *BMC Infectious Diseases*. 15:224-230.

Ishida A., N. Otsuka, S. Nagata, K. Adachi, H. Sano. 1996. The effect on salinity stress on the accumulation of compatible solutes related to the induction of salt-tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 42:331-336.

Ivanova E. P., E. A. Kiprianova, V. V. Mikhailov, F. Galina. 1998. Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48:247-256.

Ivanova E. P., T. Sawabe, A. M. Lysenko, N. M. Gorshkova, V. I. Svetashev, D. V. Nicolau, V. V. Mikhailov. 2002. *Pseudoalteromonas ruthenic* asp. nov., isolated from marine invertebrates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:235-240.

Javor B., C. Requadt, W. Stoeckenius. 1982. Box-shaped halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 151:1532-1542.

Javor J. 1984. Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:352-360.

John S., B. Ramasamy. 2015. Bioprospecting of marine *Streptomyces* sp. for its antagonistic activity on MDR *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4:290-296.

Jones B., R.W. Renaut, M. R. Rosen. 2000. Stromatolites forming in acidic hot-spring waters, North Island, New Zealand. 15:450-75.

Jung J., J. Shin, Y. K. Rhee, C. Cho, M. Lee, H. Hong, K. Lee. 2015. *In vitro* and *In vivo* immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*. 118:739-752.

Kaepfel E. C., A. Ga, S. Seebah, H. Grossart, M. S. Ullrich. 2017. *Marinobacter adhaerens* sp. nov., isolated from marine aggregates formed with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62:124-128.

Kalinovskaya N. I., E. P. Ivanova, Y. V. Alexeeva, N. M. Gorshkova, T. A. Kuznetsova, A. S. Dmitrenok, D. V. Nicolau. 2004. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* Species. *Current Microbiology*. 48:441-446.

Kamilya D., A. Baruah. 2015. Inactivated probiotic bacteria stimulate cellular immune responses of catla, *Catla catla* (Hamilton) *In Vitro*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 45:101-106.

Kaye J. Z., J. B. Sylvan, K. J. Edwards, J. A. Baross. 2010. *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, seafloor and deep-sea environments. *FEMS Microbiology and Ecology*. 75:123-133.

Kim D. J. H., S. Han. 2013. A proposal to unify two subspecies of *Staphylococcus equorum*: *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* and *Staphylococcus equorum* subsp. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 104:1049-1062.

Kindzierski V., S. Raschke, N. Knabe, F. Siedler, B. Scheffer, F. Pfeiffer, A. Marinsanguino. 2017. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: A case study for integrative systems biology. *Plos One*. 12:1-22.

Kirk H. J., J. G. Caporaso, J. J. Walker, J. R. Spear, N. J. Gold, C. E. Robertson, N. R. Pace. 2012. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *7(1):50-60*.

Klancnik A., B. Guzej, M. H. Kolar, H. Abramovic. 2009. *In Vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*. 72(8):1744-1752.

Kmoni'ckova E., P. Melkusova. 2007. Nitric oxide production in mouse and rat macrophages: A rapid and efficient assay for screening of drugs immunostimulatory effects in human cells. *Biology and Chemistry*. 17:160-169.

Koeck D. E., D. Wibber, I. Maus, A. Winkler, A. Albersmeier, V. V. Zverlov, A. Schlüter. 2014. First draft genome sequence of the amyolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology*. 192:154-155.

Kohama M. S., E. G. Toribil, M. A. Giaveno, A. A. Bazan, E. R. Donati. 2014. Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*. 1-13.

Kotiranta A., K. Lounatmaa, M. Haapasalo. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection*. 2:189-198.

- Kraegeloh A., H. J. Kunte. 2002. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles*. 6:453-462..
- Kunin C. M., T. H. Hua, L. V. A. White, M. Villarej. 1992. Growth of *Escherichia coli* in human urine: Role of salt tolerance and accumulation of glycine betaine. *The Journal of Infectious Diseases*. 166:1311-1315.
- Leal-Acosta M. L., E. Shumilin, N. Mirlean, D. Sapozhnikov, V. Gordeev. 2010. Arsenic and mercury contamination of sediments of geothermal springs, mangrove lagoon and the Santispac Bight, Bahía Concepción, Baja California Peninsula. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 85(6):609-613.
- Lentini V., C. Gugliandolo. 2014. Diversity of prokaryotic community at a shallow marine hydrothermal site elucidated by Illumina Sequencing Technology. *Current Microbiology*. 69:457-466.
- Ley R. E., J. K. Harris, J. Wilcox, J. R. Spear, S. R. Miller, B. M. Bebout, A. Icrobiol. 2006. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5):3685-3695.
- Li J. I., T. A. N. Beiping, M. A. I. Kangsen. 2011. Isolation and identification of a bacterium from marine shrimp digestive tract: A new degrader of starch and protein. *Jorunal of Ocean University of China*. 10(3):287-292.
- Lim T. P., Y. Cai, Y. Hong, E. C. Y. Chan, S. Suranthran, J. Q. M. Teo, W. H. Lee, T. Y. Tan, L. Y. Hsu, T. T. Tan, A. L. H. Kwa. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(5):2515-2524.
- Longeon J., J. Nicolas, A. Longeon, J. Peduzzi, M. Barthe. 2005. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology*. 633-641.
- López-Cortés A., F. Garcia-Pichel, U. Nübel, R. Vázquez-Juárez. 2001. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: A polyphasic study. *International Microbiology*. 4(4):227-236.
- Lovejoy C., J. P. Bowman. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, *Gamma* Subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8):2806-2813.
- Maaetoft-udsen K., N. Vynne, L. Gram. 2013. *Pseudoalteromonas* strains are potent immunomodulators owing to low-stimulatory LPS. *Innate immunity*. 19(2):160-173.

- Maassen C. B. M., C. V. Holten-Neelen, F. Balk, M. J. H. D. Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. A. Bersma, E. Claassen. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*. 18:2613-2623.
- Magarvey N., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin, D. H. Sherman, N. Magarvey, D. H. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived *Actinomyce* taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12):7520-7529.
- Maldonado L. A., D. Fragosó-Yáñez, A. Pérez-García, J. Rosellón-Druker, E. T. Quintana. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95(2):111-120.
- Mansson M., L. Gram, T. O. Larsen. 2011. Production of bioactive secondary metabolites by marine *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*. 9:440-1468.
- Mansson M., L. Gram, T. O. Larsen. 2011. Production of bioactive secondary metabolites by marine *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*. 9:1440-1468.
- McArthur K. A., S. S. Mitchell, G. Tsueng, A. Rheingold, D. J. White, J. Grodberg, B. C. Potts. 2008. Lynamicins A-E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete. *Journal of Natural Products*. 71(10):1732-1737.
- Mendo S., N. Andr, A.C. Sarmiento, F. Amado. 2004. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotechnology letters*. 26:115-119.
- Meyers S. P., M. H. Baslow, S. J. Bein, C. E. Marks. 1959. Studies of *Flavobacterium pscicida* bein. 78:225-230.
- Miller S. R., R. W. Castenholz. 2000. Evolution of thermotolerance in hot spring cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10):4222-4229.
- Miller S., J. G. Dillon, B. Bebout, M. Hullar, N. Pinel, D. A. Stahl. 2009. Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbiology and Ecology*. 68:46-58.
- Mincer T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine *Actinomyce* taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10):5005-5011.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.

- Nagafuchi S., T. Takahashi, T. Yahima, T. Kuwata, K. Hirayama, K. Itoh. 1999. Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 63(3):474-479.
- Nichols C., J. Guezennec, J. Bowman. 2005. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents. *Marine Biotechnology*. 7:253-271.
- Nieto J. J., Vargas C. 2002. Synthesis of osmoprotectants by moderately halophilic bacteria: genetic and applied aspects. *Research Signpost*. 403-418.
- Nigam A., D. Gupta, A. Sharma. 2014. Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. *Microbiological Research*. 169(10):643-651.
- Nishida A., H. Miyamoto, S. Horiuchi, R. Watanabe, H. Morita, S. Fukuda, H. Kodama. 2017. *Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65:3944-3949.
- Novakoca D., I. Sedlacek, R. Pantu, S. Vlastimil, P. Petra, S. Pavel. 2017. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 55:523–528.
- Nübel U., M. M. Bateson, M. T. Madigan, M. Kühn, D. M. Ward. 2001. Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(9):4365-4371.
- Offret C., F. Desriac, P. Chevalier, J. Mounier, C. Jégou. 2016. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and ecological significance. *Marine Drugs*. 14:1-26.
- Okesola A. O. 2011. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-a review of literature. *African Journal of Medicinal Science*. 40:97-107.
- Ollivier B., C. Streiche, B. K. Patel, P. P. Dwivedi. 2017. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:9-16.
- Phoebe J., C. H. Combie, J. Albert, F. G. Van-Tran, K. Cabrera, J. Correia, H. J. Selitrennikoff. 2001. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *Journal of Antibiotics*. 54(1):56-65.
- Pianetti A., A. Manti, P. Boi, B. Citterio, L. Sabatani, S. Papa, M. B. L. Rocchi. 2008. Determination of viability of *Aeromonas hydrophila* in increasing concentrations of sodium

chloride at different temperatures by flow cytometry and plate count technique. *International Journal of Food Microbiology*. 127:252-260.

Preethi B., K. Ramanathan. 2016. Molecular level understanding of resistance to nalidixic acid in *Salmonella enteric* serovar *typhimurium* associates with the S83F sequence type. *European Biophysics Journal*. 45(1):35-44.

Prol-Ledesma R. M., C. Canet, M. A. Torres-Vera, M. J. Forrest, M. A. Armienta. 2004. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 137(4):311-328.

Pyrek J. S., O. J. Achmatowics, A. Zamojski. 1977. Naphto- and anthraquinones of *Streptomyces thermoviolaceus* WR-141. Structures and Model Syntheses. *Tetrahedron*. 33:673-680.

Qinghui A., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang, W. Zhang. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*. 317:155-161.

Rachmawati I., M. Rifa'i. 2014. *In vitro* immunomodulatory activity of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf to the CD4+, CD8+ and B220+ cells in *Mus musculus*. *Journal of Experimental Life Sciences*. 4(1):15–20.

Ramesh S., N. Mathivanam. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:2103-2111.

Ramírez D. N., J. A. Serrano, H. Sandoval. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37:3:56-71.

Rajasabapathy R., C. Mohandass, A. Colaco, S. G. Dastager, R. S. Santos, R. M. Meena. 2014. Culturable bacterial phylogeny from a shallow water hydrothermal vent of Espalamaca (Faial, Azores) reveals a variety of novel taxa. *Current Science*. 1:106.

Rashad F. M., H. M. Fathy, A. S. El-Zayat, A. M. Elghonaimy. 2015. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*. 175:34-47.

Raymond B., D. Davis, M. B. Bonsall. 2011. Competition and reproduction in mixed infections of pathogenic and non-pathogenic *Bacillus* spp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96:151-155.

- Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, D. Tovar-Ramírez, J. Meseguer, M. A. Esteban. 2011. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 30(1):248-254.
- Riedlinger J., A. Reicke, H. Zähler, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, H. P. Fiedler. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *The Journal of Antibiotics*. 57(4):271-279.
- Robertson C. E., J. R. Spear, J. K. Harris, N. R. Pace. 2009. Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(7):1801-1810.
- Rocelle M., L. R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(9):3268-3273.
- Rojas-Espinosa O., P. A. Paredes. 2004. Fagocitosis, mecanismos y consecuencias. *Bioquímica*. 29(2):56-67.
- Ruiz-Castillo A., J. A. Lepe-Jimenez, M. J. Torres-Sanchez, M. J. Artacho-Reinoso, J. Aznar-Martin. 2016. Influencia de la correcta identificación en la interpretación de las pruebas de sensibilidad en aislados de *Aeromonas* spp. productoras de bacteriemia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34(2):96-100.
- Sahl J. W., N. R. Pace, J. R. Spear. 2008. Comparative molecular analysis of endoevaporitic microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(20):6444-6446.
- Sangma T., D. Kamilya. 2015. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases dietary *Bacillus subtilis* FPTB13 and chitin, single or combined, modulate systemic and cutaneous mucosal immunity and resistance of catla, *Catla catla* (Hamilton) against edwardsiellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 43:8-15.
- Sankar S., S. Sankar, J. Woo, V. Sukumaran, S. Chang. 2016. Fish and shell fish immunology role of *Bacillus subtilis* VSG4-derived biosurfactant in mediating immune responses in *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*. 54:220–229.
- Scheerans C., S. G. Wicha, J. Michael, H. Derendorf, C. Kloft. 2015. International journal of antimicrobial agents concentration – response studies and modelling of the pharmacodynamics of linezolid: *Staphylococcus aureus* versus *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 45(1):54–60.

- Schon T., E. Chryssanthou. 2017. Minimum inhibitory concentration distribution for *Mycobacterium avium* complex—towards evidence-based susceptibility breakpoints. *International Journal of Infectious Diseases*. 55:122-124.
- Selva D. M. B., F. A. Ronica, V. T. Viji, S. Velmurugan, J. S. C. A. Jenifer, M. Michaelbabu, T. Citarasu. 2013. *Halomonas* sp. BS4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. *SpringerPlus*. 2(1):149.
- Selvin J., S. Shanmughapriya, R. Gandhimathi, G. Seghal Kiran, R. T. Rajeetha, K. Natarajaseenivasan, T. A. Hema. 2009. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83(3):435-445.
- Shak J. R., J. A. Whitaker, B. S. Ribner, E. M. Burd. 2011. Aminoglycoside-resistant *Aeromonas hydrophila* as part of a polymicrobial infection following a traumatic fall into freshwater. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(3):1169–1170.
- Shieh W. Y., W. D. Jean, Y. Lin, M. Tseng. 2003. *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Can Journal of Microbiology*. 252:244-252.
- Singer M. A., S. Lindquist. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cell*. 1:639-648.
- Skerratt J. H., J. P. Bowman, G. Hallegraeff, S. James, P. D. Nichols. 2002. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology Progress Series*. 244:1-15.
- Skerratt J. H. 2011. Bacterial and algal interaction in a Tasmanian estuary. Tesis (PhD). Hobart, Tasmania, Australia. University of Tasmania. 219-235.
- Skwor T., J. Shinko, A. Augustyniak, C. Gee, G. Andraso. 2014. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(3):841-848.
- Sonnenschein E. C., A. Syit, H. Grossart, M. S. Ullrich. 2012. Chemotaxis of *Marinobacter adhaerens* and its impact on attachment to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(19):6900-6907.
- Spanò A., A. Arena. 2016. Bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin as agent in counteracting immune disorders induced by herpes virus. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 37(3):251-260.

- Spear J. R., R. E. Ley, A. B. Berger, N. R. Pace. 2003. Complexity in natural microbial ecosystems: The Guerrero Negro experience. *Biological Bulletin*. 204(2):168-173.
- Stahl A., M. S. Ullrich. 2016. Proteomics analysis of the response of the marine bacterium *Marinobacter adhaerens* HP15 to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Aquatic Microbial Ecology*. 78:65-79.
- Straus S. K., R. E. Hancock. 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758:1215–1223.
- Subramani R., W. Aalbersberg. 2013. Culturable rare actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(21):9291–9321.
- Tafalla C., J. Bogwald, A. Roy Dalmo. 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*. 35:1740-1750.
- Tang K. 2013. Microbial communities in a shallow-sea hydrothermal system microbial diversity and community structure. *Encyclopedia of Metagenomics*. 1–8.
- Temirov Y. V., T. Z. Ekizova, T. A. Balashova, L. M. Vinokurov, Y. B. Alakhov. 2003. A catecholic siderophore produced by thermoresistant *Bacillus thermoamylovorans* VK21 strain. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 29:597-604.
- Tendulkar S. R., Y. K. Saikumari, V. Pate, S. Raghotama, T. K. Munshi, P. Balaram. 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*. 103:2331-2339.
- Thayer D. W., W. S. Muller, R. L. Buchanan, J. G. Phillips. 1987. *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. *Applies and Environmental Microbiology*. 53(6):1311-1315.
- Toharisman A., M.T. Suhartono, M. Spindler-barth, J. Hwang. 2005. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnonology*. 21:733-738.
- Torres-Beltrán M., F. Cardoso-Martínez, N. Millán-Aguñaga, A. Becerril-Espinosa. 2012. Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Ciencias Marinas*. 38(4):609–624.
- Tsai Y. T., P. C. Cheng, T: M. Pan. 2012. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96:853–862.

- Uzel A., E. E. Hames Kocabas, E. Bedir. 2011. Prevalence of *Thermoactinomyces thalpophilus* and *T. sacchari* strains with biotechnological potential at hot springs and soils From West Anatolia in Turkey. *Turk Journal of Biology*. 35(2):195-202.
- Valli S., S. Suvathi Sugasini. 2012. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(6):469–473.
- Ventosa A., J. Nieto, A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:504-544.
- Vreeland R. H., C. D. Litchfield, S. E. L. Martin, E. Ellio. 2017. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30(2):485-495.
- Visscher A. De., S. Piepers, F. Haesebrouck, K. Supré, S. De. Vlieghe. 2017. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: prevalence, distribution and associated subgroup-and species-specific risk factors. *Journal of Dairy Science*. 1:1-14.
- Vogelman B., W. A. Craig. 1986. Kinetics of antimicrobial activity. *Journal of Pediatrics*. 108(5):835-840.
- Vynne N. G., M. Månsson. 2011. Bioactivity, Chemical profiling and 16S rRNA-based phylogeny of *Pseudoalteromonas* strains collected on a global research cruise. *Marine Biotechnology*. 13:1062-1073.
- Walsh C. 2003. Where will new antibiotics come from?, *Nature Reviews in Microbiology*. 1:65-70.
- Woebken, D., L. C. Burow, F. Behnam, X. Mayali, A. Schintlmeister, E. D. Fleming, B. M. Bebout. 2015. Revisiting N₂ fixation in Guerrero Negro intertidal microbial mats with a functional single-cell approach. *The ISME Journal*. 9144(10):1-12.
- Wilson M. C., T. Mori, C. Ruckert, A. R. Uria, M. J. Helf, K. Takada, C. Gernet, U. A. E. Steffens, N. Heycke, S. Schmitt, C. Rinke, E. J. N. Helfrich, A. O. Brachmann, C. Gurgui, T. Wakimoto, M. Kracht, M. Crusemann, U. Hentschel, I. Abe, S. Matsunaga, J. Kalinowski, H. Takeyama, J. Piel. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*. 506:58-62.
- Yeh, S., C. Chi, Y. Shiu, Z. Huang, C. Liu. 2014. Effects of diets supplemented with either individual or combined probiotics, *Bacillus subtilis* E20 and *Lactobacillus plantarum* 7-40, on the immune response and disease resistance of the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Aquaculture research*. 45:1164-1175.

- Yohandini, H. 2015. Isolation and phylogenetic analysis of thermophile community within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. HAYATI Journal of Biosciences. 22(3):143-148.
- Yoshizawa S., D. Fourmy, J. D. Puglisi. 1998. Structural origins of gentamicin antibiotic action. The EMBO Journal. 17(22):6437-6448.
- You, J. L., L. X. Cao, G. F. Liu, S. N. Zhou, H. M. Tan, Y. C. Lin. 2005. Isolation and characterization of *Actinomycetes* antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21(5):679-682.
- Young L., C. H. Kang. 2012. *Virgibacillus campisalis* sp. nov., from a marine solar saltern. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62:347-351.
- Young A., M. Asahara, S. Velmurugan, K. Raman, V. T. Viji, M. B. S. Donio, J. A. Jenifer, M. M. Babu, T. Citarasu. 2013. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its *in vivo* antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. Journal of King Saud University–Science. 25(3):181-190.
- Zhanel G. G., J. A. Karlowski, D. J. Hoban, R. J. Davidson. 1991. Chemotherapy. 37:114-121.
- Zhang W., Z. Li, X. Miao, F. Zhang. 2009. The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes from South China Sea Sponges. Marine Biotechnology. 11:346-355.