

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-9, 2023.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.557>

Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Bacillus australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. asociadas al octocoral *Leptogorgia alba*

Elizabeth Avila-Castro^{1,2}, Ofelia Vargas-Ponce³,
Leopoldo Díaz-Pérez², Fabián Alejandro Rodríguez-Zaragoza²,
Joice Hernández-Zulueta^{2,4} y Ruth Noemí Aguila-Ramírez^{5*}

¹Programa de Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BEMARENA), ²Lab. de Ecología Molecular, Microbiología y Taxonomía (LEMITAX) del Depto. de Ecología, ³Depto. de Botánica y Zoología, ⁴Depto. de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez # 2100, Nextipac, Zapopan 45110, Jalisco, México. ⁵Lab. de Microbiología y Biología Molecular, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN s/n, Col. Playa Palo de Sta. Rita, La Paz 23068, Baja California Sur, México. E-mail: *raguilar@ipn.mx

RESUMEN

Los ensamblajes bacterianos asociados a los octocorales les aportan estrategias defensivas mediante la producción de compuestos antimicrobianos para protección frente a los microorganismos patógenos al evitar la colonización por otros microorganismos. Debido a la disminución en el descubrimiento de nuevos compuestos en los entornos terrestres, el potencial de las cepas bacterianas marinas representa una fuente de novedosos compuestos bioactivos. Nuestro objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas bacterianas de *Bacillus australimaris* y las de *Pseudoalteromonas* sp. aisladas del octocoral *Leptogorgia alba* de las zonas someras y de las mesofóticas, para conocer el grado de capacidad que tienen para inhibir el crecimiento de los patógenos humanos y de los acuícolas por lo que se realizaron los ensayos cross-streak, difusión en agar por gota, difusión en pozo, difusión en disco, crecimiento sobre celulosa y microplaca de poliestireno. El antagonismo de *B. australimaris* fue evidente hacia los patógenos de *Escherichia coli*, *Listonella anguillarum*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus iniae*, y *Vibrio campbellii*. Por su parte, *Pseudoalteromonas* sp. impidió el desarrollo de los patógenos *E. coli*, *L. anguillarum*, *L. monocytogenes*, *S. iniae*, y *V. campbellii*. Los resultados de este trabajo muestran que las bacterias asociadas a organismos gorgónidos son un recurso biotecnológico potencial en la actividad antimicrobiana.

Palabras clave: antagonismo, bacterias marinas, octocorales, patógenos.

Evaluating the antimicrobial activity of *Bacillus australimaris* and *Pseudoalteromonas* sp. associated with the octocoral *Leptogorgia alba*

ABSTRACT

Octocoral-associated bacterial assemblages provide them with defensive strategies through production of antimicrobial compounds, protecting against pathogenic microorganisms by avoiding colonization by other microorganisms. Due to the decrease in the discovery of new compounds in terrestrial environments, the potential of marine bacterial strains represents a source of novel bioactive compounds. Our objective was to evaluate the antimicrobial activity of the bacterial strains of *Bacillus australimaris* and those of *Pseudoalteromonas* sp. isolated from the octocoral *Leptogorgia alba* from shallow and mesophotic areas, to determine the degree of capacity they have to inhibit the growth of human and aquaculture pathogens, for which cross-streak tests, agar diffusion by drop, well diffusion, disk diffusion, growth on cellulose and polystyrene microplate were used. Antagonism of *B. australimaris* was evident towards pathogens *Escherichia coli*, *Listonella anguillarum*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus iniae*, and *Vibrio campbellii*. For its part, *Pseudoalteromonas* sp. prevented the development of the pathogens *E. coli*, *L. anguillarum*, *L. monocytogenes*, *S. iniae*, and *V. campbellii*. The results of this work show that bacteria associated with gorgonid organisms are a potential biotechnological resource in antimicrobial activity.

Key words: antagonism, marine bacteria, octocorals, pathogens.

Artículo recibido el 14 de noviembre del 2022.

Artículo aceptado el 05 de junio del 2023.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos se encuentran entre los hábitats más ricos y diversos de la Tierra (Karl & Church, 2014). En estos ambientes, existen condiciones particulares, que funcionan como impulsores de los productos naturales bioactivos (Sang *et al.*, 2019). Los organismos marinos se destacan por la producción de una gran cantidad de compuestos activos (Raimundo, Silva, Costa & Keller-Costa, 2018), utilizados como defensa química contra los depredadores, los invasores y los competidores, o para tolerar a los factores que provocan el estrés ambiental (Eskander, Al-Sofyani, El-Sherbiny, Ba-Akdah & Satheesh, 2018; Sang *et al.*, 2019). Sin embargo, puede ser que estos compuestos activos, aislados principalmente de invertebrados marinos, sean en su mayoría producidos por la comunidad microbiana asociada a ellos (Mehbub Lei, Franco & Zhang, 2014; Rizzo & Lo Giudice, 2018; Stincone & Brandelli, 2020).

Las relaciones de simbiosis entre organismos marinos y bacterias proporcionan beneficios mutuos en los términos de protección y en producción de nutrientes (Rizzo & Lo Giudice, 2018). Los ensamblajes bacterianos asociados a los octocorales, son los responsables de mantener diferentes procesos metabólicos y energéticos que requiere el organismo (Falkowski, Fenchel & Delong, 2008; Mouchka, Hewson & Harvell, 2010). Además de proveer una respuesta de adaptación a los cambios ambientales y a la defensa contra los microorganismos patógenos (Correa, Haltli, Duque & Kerr, 2013). Los octocorales del género *Leptogorgia* (Gorgoniidae) se consideran entre los más abundantes y frecuentes en los hábitats bentónicos de las zonas someras del Pacífico Oriental Tropical (POT) (Breedy & Guzman, 2007; de González, Shadid & Núñez, 2021). En particular *Leptogorgia alba* (Duchassaing & Michelotti, 1864) tiene una distribución amplia a lo largo de la costa del POT (Abeytia, Guzmán & Breedy, 2013; Breedy & Cortés, 2014; Ríos-Jara, 2016; de González *et al.*, 2021) e islas aledañas como la Isla del Coco (Breedy & Cortés, 2016), Islas Galápagos (Breedy, Hickman & Williams, 2009), e Isla Malpelo (Sánchez, Gómez, Escobar & Dueñas, 2011). Esta especie posee el rango de profundidad más amplio de cualquier gorgonia registrada dentro del POT, desde los cinco metros (Breedy & Cortés, 2014; de González *et al.*, 2021) hasta los 60 metros (Abeytia *et al.*, 2013).

El ensamblaje bacteriano asociado a *L. alba* se ha estudiado en términos de bioprospección, destacando por su producción de compuestos bioactivos del género *Pseudoalteromonas* (Martínez-Luis, Ballesteros & Gutiérrez 2011; Moree *et al.*, 2014). En las cepas de este género aisladas de ambientes marinos, se ha comprobado su potencial de bioprospección, al producir compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, alguicidas y antiincrustantes (Atencio *et al.*, 2018). Martínez-Luis *et al.*, (2011) obtuvieron *Pseudoalteromonas* aisladas de *L. alba*, de las costas de Panamá, en el océano Pacífico

y reportaron su actividad antimicrobiana en los patógenos *Bacillus subtilis* y *Vibrio* sp. Moree *et al.* (2014) demostraron también que *Pseudoalteromonas* sp. OT59, aislada del mismo octocoral, produce alteramidas antifúngicas y es dependiente de la luz. Estos autores plantearon la hipótesis de que este compuesto es producido para proporcionar protección durante la alimentación del octocoral, al ocurrir por la noche los pólipos están expuestos y el organismo es más vulnerable.

Otro género bacteriano reconocido por su potencial en la producción de compuestos con actividad biológica es *Bacillus*, los miembros de este grupo presentan actividades antibacterianas, anticancerígenas y antivirales (Bowman, 2007; Stincone & Brandelli, 2020). Garrido *et al.* (2020) aislaron las cepas de *Bacillus* sp. BO53 y *Pseudoalteromonas* sp. GA327 de los octocorales *Pseudopterogorgia acerosa* y *Muriceopsis sulphurea* respectivamente, de las costas de Panamá en el mar Caribe. En su estudio reportaron a *Bacillus* sp. con la habilidad de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y reducir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y el de *Acinetobacter baumannii*. Por su parte, *Pseudoalteromonas* sp. inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* y de *A. baumannii*.

La creciente resistencia a los antibióticos y la disminución en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos en el medio terrestre (Debbab, Aly, Lin & Proksch, 2010; Sang *et al.*, 2019), ha llevado a la búsqueda de bioactivos en el medio marino. Especialmente de bacterias asociadas a los corales por su capacidad para producirlos (Shnit-Orland & Kushmaro, 2009; Sang *et al.*, 2019). Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas de *Bacillus australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp., aisladas del octocoral *L. alba*, en los patógenos humanos y acuícolas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: La especie del octocoral fue identificada como *L. alba* con base en la morfología de la gorgonia y la estructura de las escleritas (Breedy & Guzman, 2007; Soler-Hurtado, Megina, Machordom & López-González, 2017, Figura 1). Estos organismos fueron recolectados en dos sitios de las costas del Océano Pacífico, Jalisco, México: 1) islote El Mamut (19° 32' 45" N y 105° 06' 50" W) en Bahía Chamela a seis metros de profundidad; 2) Parque Nacional Marino Los Arcos (20°32'43"N 105°17'35"W) a una profundidad de 60 metros. Ambos sitios se muestrearon en septiembre del año 2018.

Recolección y aislamiento de las cepas bacterianas: Las muestras de *L. alba* se lavaron con agua de mar filtrada a 0.22 micras y estéril, para eliminar a los microorganismos exógenos y se mantuvieron a una temperatura de 4 °C, en el laboratorio, se trituraron en un mortero y estuvieron en constante agitación. Las células se concentraron por centrifugación a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) y el pellet resuspendido en un volumen de 1 mL en agua de mar estéril. Para cada una

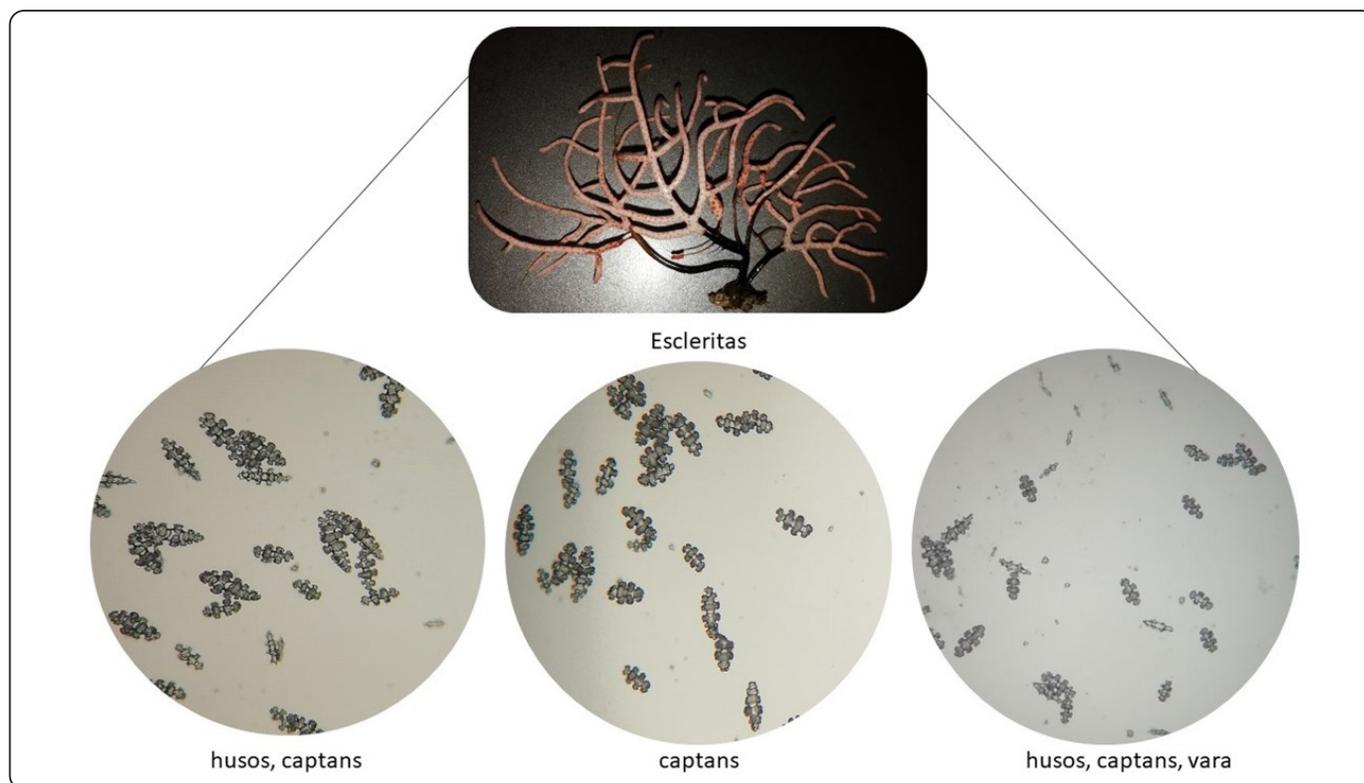


Figura 1. *Leptogorgia alba* y morfología de las escleritas obtenidas del organismo para la identificación del octocoral (Soler-Hurtado *et al.*, 2017).

de las muestras se realizaron diluciones seriales de 10^{-1} - 10^{-8} también con agua de mar estéril. Finalmente, cada dilución se sembró por separado en Agar Zobell Marino [Levadura (1 g), bactopectona (5 g), cloruro férrico (1 mL), agar (13 g), en 1 L de agua de mar filtrada a 0.22 micras)]. Las cajas Petri con el contenido antes mencionado se incubaron de cinco a siete días a 28 °C. Posteriormente, se seleccionaron las bacterias asociadas al octocoral utilizando los códigos 1.2 (obtenida de la Isla Mamut) y 4.4 (obtenida del Parque Nacional Marino Los Arcos), las cuales se aislaron de la placa de agar y fueron resembradas en placas nuevas para su purificación.

Identificación bacteriana: La extracción del DNA genómico se realizó con el kit “InstaGene® Matrix”, siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad del DNA genómico se verificó con los geles de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe DNA gel stain, (Invitrogen®), en un fotodocumentador de geles INFINITY–ST5.

Las muestras de ADN fueron enviadas a Macrogen, Inc. Corea del Sur, para la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S [27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3')]. Las secuencias obtenidas fueron analizadas para determinar su calidad en el Software Chromas (Technelysium, DNASquencing Software).

Posteriormente, se compararon con las secuencias de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para su identificación taxonómica. Se consideró un porcentaje de similitud de la secuencia por arriba del 98 % para la especie y una similitud de al menos 90 % para el género.

Patógenos humanos y acuícolas: En todas las pruebas realizadas se experimentó con las cepas bacterianas aisladas de *L. alba* para conocer su reacción sobre las especies bacterianas patógenas de los humanos y las patógenas acuícolas. Las bacterias de los humanos incluyeron a *Escherichia coli* (ATCC25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12223). Estas cepas se mantuvieron en agar tripticaseína de soya (TSA) Bacto [Tryptone (17 g), Bacto Soytone (3 g), glucosa (2.5 g), cloruro sódico (5 g), fosfato dipotásico de hidrógeno (2.5 g), en un litro de agua destilada]. Las patógenas acuícolas probadas fueron: *Listonella anguillarum* (696), *Streptococcus iniae* (527), *Vibrio campbellii* (M0702), *Vibrio harveyi* (CAIM333), *Vibrio parahaemolyticus* (M0904) y *Vibrio diabolicus* (CIBGEN002); que se mantuvieron en el medio TSA con NaCl al 2.5 %.

Tanto las cepas patógenas humanas como las acuícolas se transfirieron a un medio TSA y TSA-NaCl, 24 h antes de cada

prueba y se incubaron a 35 °C. Estos medios se utilizaron para preparar diluciones en 5 mL de solución salina (2.5 %) con una densidad óptica de 0.5 medida a una longitud de onda de 585 nm [(D.O₅₈₅) en un espectrofotómetro portátil Merck SQ 118].

Ensayos de actividad biológica: Las cepas aisladas de *L. alba* (1.2 y 4.4) fueron inoculadas en caldo TSA e incubadas a 35 °C, 24 h antes de cada prueba. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se utilizó en las siguientes pruebas realizadas por duplicado.

Cross-Streak (CS): Las cajas Petri con agar TSA y TSA-NaCl se inocularon con las cepas bacterianas aisladas de *L. alba*, también por duplicado. Un solo estriado fue sembrado al centro de la caja Petri. Después de 24 h de ser incubadas a 35 °C, las placas se estriaron perpendicularmente con los patógenos. Por último, nuevamente se incubaron por 24 h más a 35 °C y el resultado fue la presencia de zonas de inhibición de los patógenos.

Difusión en agar por gota (DAG): Se inocularon las cajas Petri de medio TSA y TSA-NaCl con 50 µL de la suspensión de cada patógeno y se procedió a esparcirlas con un hisopo estéril. Las cepas duplicadas se inocularon con 20 µL de sobrenadante, y el grupo control positivo con estreptomycin 0.2 mg/mL. Se incubaron a 4 °C por una hora y después por 24 y 48 h a 35 °C. Transcurrido el tiempo se evaluó la presencia de las zonas de inhibición del crecimiento de las cepas patógenas.

Difusión en pozo (DP): Del mismo modo que las pruebas DAG, las cajas Petri con agar TSA y TSA-NaCl al 2.5 % fueron inoculadas con 50 µL de la suspensión de cada patógeno y se procedió a esparcir con un hisopo estéril. Posteriormente, se realizaron perforaciones con la ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro en donde se depositó la suspensión bacteriana de cada una de las cepas aisladas de *L. alba*. Las cajas se mantuvieron por una hora a 4 °C y después se incubaron a 35 °C durante 48 h. Transcurridas las 24 y 48 h se determinó la interacción de las bacterias con la medición de los halos de inhibición.

Difusión en disco (DD): Los patógenos fueron inoculados en cajas Petri con agar TSA (a excepción de las cepas de *Vibrio*, que no se utilizaron en esta prueba), de la misma forma que los ensayos anteriores. Se utilizaron discos de papel filtro Whatman no. 1 con un diámetro de 6 mm. Los discos fueron impregnados con 15 µL del sobrenadante de las cepas bacterianas aisladas de *L. alba*. Estos fueron colocados con pinzas estériles en las cajas Petri previamente inoculadas e incubados a 4 °C por 1 h para permitir la difusión del compuesto. Posteriormente, las cajas fueron incubadas a 35 °C por 24 y 48 h para evaluar la presencia de los halos de inhibición alrededor del disco.

Crecimiento sobre celulosa (CPC): En una caja Petri con agar TSA se colocó una membrana de celulosa vegetal previamente hidratada con agua destilada estéril. En ella se sembraron 50 µL

de las cepas aisladas del octocoral, se incubaron a 35 °C por 24 h. Posteriormente, se recuperó la biomasa con una espátula estéril y fue suspendida en PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L y KH₂PO₄ 0.24 g/L) en una relación de 0.2 g de biomasa bacteriana por 1 mL de PBS. La suspensión de biomasa fue centrifugada a 14,000 rpm. Por último, con el sobrenadante obtenido, se realizó la prueba DAG en los patógenos.

Microplaca de poliestireno (MP): A diferencia de las pruebas anteriores, el sobrenadante de las cepas bacterianas aisladas de *L. alba* fue filtrado con una membrana PVDF de 0.22 µm. Para confirmar que no hubiera crecimiento celular del sobrenadante filtrado, antes de realizar la prueba, fue inoculado en cajas Petri con agar TSA e incubado por 24 h a 35 °C. Una vez confirmado que no hubo crecimiento celular se continuó con el ensayo. Cada pozo de la placa se inoculó con 100 µL del sobrenadante de la cepa a probar y 100 µL de la suspensión de cada patógeno, por triplicado. En la misma placa se colocaron controles por triplicado, para evaluar el porcentaje de antagonismo; el sobrenadante filtrado de las cepas bacterianas aisladas de *L. alba* (1.2 y 4.4), la suspensión del patógeno a una absorbancia de 0.5 nm, y el caldo de cultivo TSA y TSA-NaCl. Finalmente, la placa se incubó a 35 °C y se tomaron lecturas a las 24 y 48 h de absorbancia a una D.O₆₂₀ en un lector de placas (Tecan).

Para evaluar el porcentaje de antagonismo, se utilizó la fórmula de Martínez-Díaz (2010) modificada:

$$PC = (CC \times 100 \%) / C$$

$$PI = 100 - PC$$

donde PC es el porcentaje de crecimiento, PI es el porcentaje de inhibición, C es el crecimiento de la cepa pura sin adición de compuestos (control negativo) y CC es el resultado del crecimiento de la cepa en presencia del patógeno.

RESULTADOS

Identificación de las bacterias marinas 1.2 y 4.4: La cepa 1.2 se aisló a partir de la muestra recolectada del islote El Mamut y la cepa 4.4 del Parque Nacional Marino Los Arcos. Ambas fueron identificadas por la secuencia del gen *ARNr 16S*. La cepa con el código 1.2 mostró un 100 % de similitud con *Bacillus australimaris* (SUB1299281957_27F/OQ699139). La cepa 4.4 mostró un 98 % de similitud con *Pseudoalteromonas* sp. (SUB1299285452_27F/OQ699141) y no fue posible su identificación a nivel de especie.

Actividad biológica de las cepas de *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp.: Las cepas, *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. aisladas de *L. alba* tuvieron una actividad antagónica frente a los patógenos humanos y los acuícolas. La bacteria *B. australimaris* demostró antagonismo frente a las cepas *L. monocytogenes* y *V. campbellii* por medio de los ensayos

CS, DAG, DP, y CPC (Figura 2, Cuadro I). En cambio, un mayor número de antagonismos se detectó por medio de la prueba MP, en los patógenos *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *L. anguillarum*, y *S. iniae* (Figura 3A), siendo *L. monocytogenes* la cepa con mayor porcentaje de inhibición a las 24 y 48 h (36.8 % y 42.6 %), seguido de *E. coli* (24.6 % y 42.6 %). Con los patógenos acuícolas *L. anguillarum* (30.3 %) y *S. iniae* (28.7 %) la inhibición se observó a las 24 h, y con los patógenos humanos *P. aeruginosa* (18.6 %) y *S. epidermidis* (24.6 %) hasta las 48 h.

La bacteria *Pseudoalteromonas* sp. mostró una gran capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes patógenos como: *L. monocytogenes*, por medio de las pruebas DD y MP, en *L. anguillarum* con (CS, DAG, DP, CPC y MP), *S. iniae* con (CS, DAG, DP, DD y CPC) y *V. campbellii* por medio del ensayo DAG (Figura 2). Sólo con la prueba MP se logró identificar el antagonismo a *E. coli* (Cuadro I), siendo este patógeno el que registró los mayores porcentajes de inhibición a las 24 h (21.3 %) y 48 h. (26.1 %). *L. anguillarum* presentó antagonismo a las 24 h (9.9 %) y *L. monocytogenes* hasta las 48 h (3.6 %, Figura 3B).

A excepción de la prueba de difusión en disco (DD) en la cepa *B. australimaris*, el resto de los ensayos realizados en este trabajo probaron que el efecto antagónico de las cepas *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. fue entre siete y cinco patógenos, respectivamente. Los patógenos *S. aureus*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus* no registraron inhibición de crecimiento ante los sobrenadantes de las cepas aisladas de *L. alba* (Cuadro I).

DISCUSIÓN

Las bacterias, *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. asociadas a *L. alba* de las zonas somera y mesofótica, inhibieron el crecimiento de los patógenos humanos y el de los acuícolas. Miembros de los géneros *Bacillus* y *Pseudoalteromonas* aislados de distintas fuentes marinas, han sido estudiados por su potencial actividad biológica, como es el caso de *Bacillus* recolectados del agua de mar, esponjas y mejillones, demostrando su capacidad antimicrobiana (Atencio et al., 2018). Este género constituye uno de los grupos de microorganismos de alto potencial biomédico (Fenical & Jensen, 1993; Muscholl-Silberhorn, Thiel & Imhoff, 2008), que se han obtenido con regularidad en ambientes marinos y son ampliamente estudiados por diversos autores por la producción de sus metabolitos con propiedades antimicrobianas, antiadherentes, alguicidas y de interés en la farmacología (Ivanova et al., 1999; Pabel et al., 2003; Zhang, Hua, Pei & Yao, 2004). En cuanto a los miembros de *Pseudoalteromonas* provenientes de las esponjas, los octocorales y el sedimento en manglares, tienen una actividad antimicrobiana y antifúngica (Sticone & Brandelli, 2020; Handayani, Isnansetyo, Istiqomah & Jumina, 2022). Sin embargo, los reportes de la bioactividad de estos géneros asociados a las gorgonias son pocos, a pesar de que estos organismos constituyen una de las mayores fuentes en producción de nuevos compuestos bioactivos (Raimundo et al., 2018).

En las gorgonias, los miembros de *Bacillus* recolectados en *Junceella juncea* también son antibacterianos para los patógenos humanos *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus* (Gao et al., 2010; Thangapaul, Praveevn & Chinnachamy, 2019). De igual manera, Garrido et al. (2020) reportaron la inhibición de los patógenos

Cuadro I. Efectos antagónicos de *Bacillus australimaris* (1.2) y *Pseudoalteromonas* sp. (4.4) en los patógenos, por medio de los ensayos cross-streak (CS), difusión en agar por gota (DAG), difusión en Pozo (DP), difusión en disco (DD), crecimiento sobre celulosa (CPC) y microplaca de poliestireno (MP).

		<i>Bacillus australimaris</i> (1.2)						<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (4.4)					
Patógenos		CS	DAG	DP	DD	CPC	MP	CS	DAG	DP	DD	CPC	MP
Humanos	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Acuícolas	<i>Listonella anguillarum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Streptococcus iniae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Vibrio campbellii</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Vibrio harveyi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Vibrio diabolicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Inhibición del crecimiento (+), Sin inhibición (-).

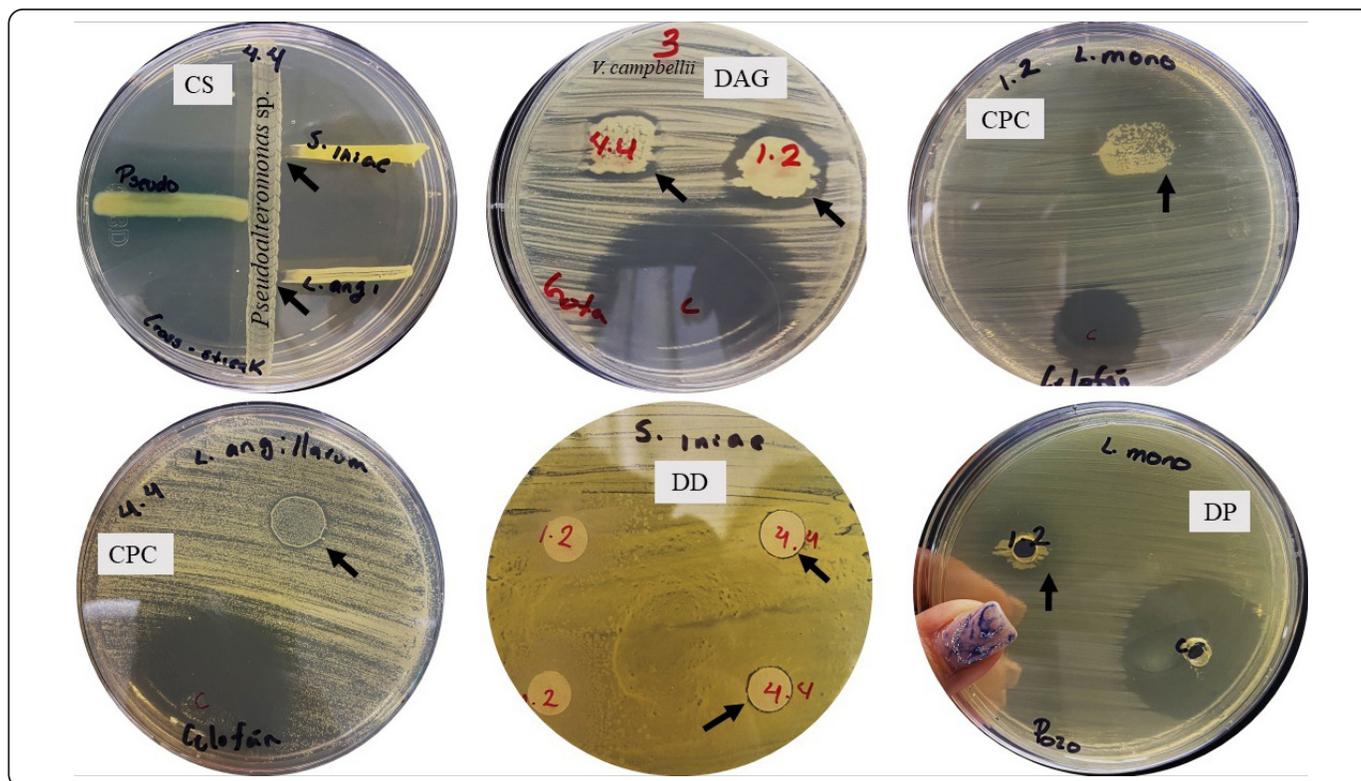


Figura 2. Actividad antagonica de las cepas de *B. australimaris* (código 1.2) y *Pseudoalteromonas* sp. (código 4.4). Ensayos Cross-streak (CS), difusión en agar por gota (DAG), crecimiento sobre celulosa (CPC), difusión en disco (DD) y difusión en pozo (DP).

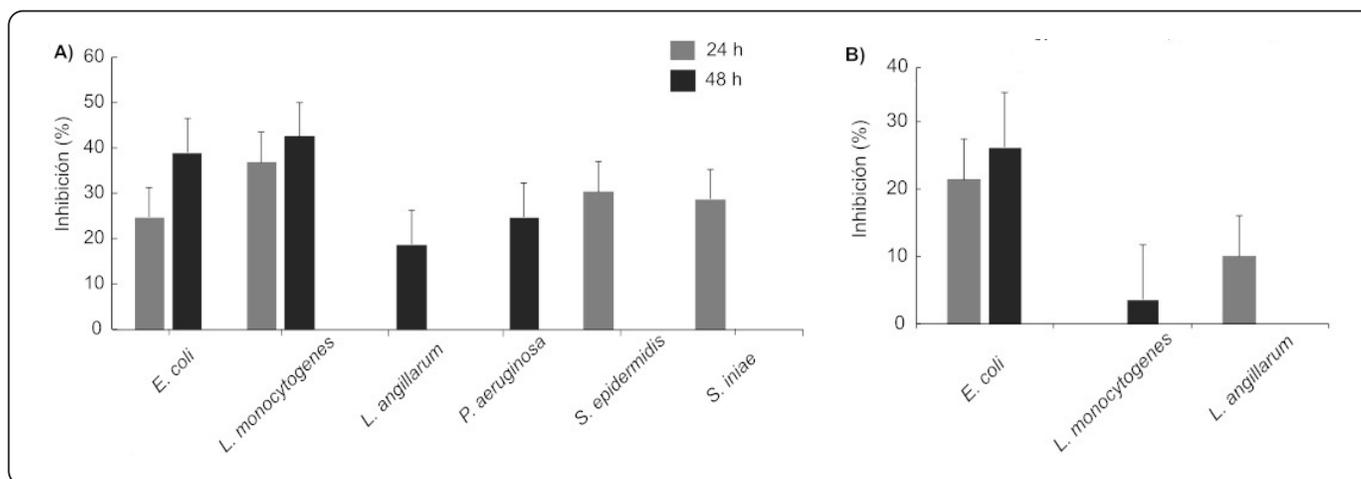


Figura 3. Efecto inhibitorio de los sobrenadantes de las cepas *B. australimaris* (A) y *Pseudoalteromonas* sp. (B), en diferentes patógenos humanos y acuicolas a las 24 h (barras grises) y 48 h (barras negras). Ensayo en microplaca de poliestireno.

P. aeruginosa, *S. aureus* y *Acinetobacter baumannii* por las cepas de *Bacillus* de los octocorales *Pseudopterogorgia acerosa* y *Muriceopsis sulphurea*. En este estudio *B. australimaris* como ya se mencionó impide el crecimiento de los patógenos humanos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*) y el de los patógenos acuicolas (*L. angillarum*,

S. iniae y *V. campbellii*). Este trabajo es el primer reporte de la bacteria *B. australimaris*, antimicrobiana, encontrada en el octocoral *L. alba* de la zona somera. Asimismo, es importante continuar con los ensayos en diferentes líneas de investigación, en la búsqueda de nuevos compuestos activos. En este contexto, resulta relevante mencionar que *Bacillus* sp. aislada de *L. alba*,

en las costas de Panamá por Boya, Herrera, Guzman & Gutierrez, (2012), mostró actividad antiplasmodial, lo que representa un recurso prometedor para la investigación antipalúdica.

Pseudoalteromonas es otro grupo bacteriano que ha revelado actividad antibacteriana, antifúngica, alguicida y antiincrustante (Atencio *et al.*, 2018). Este género se encuentra en las gorgonias *P. acerosa* y *M. sulphurea*, y reprime el crecimiento de los patógenos humanos *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Garrido *et al.*, 2020). De manera similar, Martínez-Luis *et al.* (2011) registraron actividad antimicrobiana de *Pseudoalteromonas* sp., aislada de *L. alba* de las costas de Panamá, sobre el patógeno *B. subtilis* y el patógeno marino *Vibrio* sp. En este trabajo, *Pseudoalteromonas* sp. aislada de *L. alba* de la zona mesofótica (60 metros de profundidad), además de inhibir el crecimiento de dos cepas patógenas para el humano (*E. coli* y *L. monocytogenes*) demostró lo mismo para las cepas patógenas acuícolas (*L. anguillarum*, *S. iniae* y *V. campbellii*) lo que podría ser un indicio del rol que funge *Pseudoalteromonas* sp. dentro del ensamblaje bacteriano asociado a *L. alba*, proporcionando protección al octocoral frente a los microorganismos patógenos.

La relación entre los microorganismos y el huésped ha evidenciado, que las bacterias pueden ser responsables de mantener diferentes procesos metabólicos y energéticos que requiere el octocoral (Ledoux & Antunes, 2018; Sánchez *et al.*, 2019). También son fundamentales en diferentes procesos de los ciclos biogeoquímicos (Mouchka *et al.*, 2010; Webster & Reusch, 2017) y participan en la producción de compuestos antimicrobianos, antibiofilm, y antifouling. Los ensamblajes bacterianos aportan estrategias defensivas al organismo anfitrión mediante la capacidad de inhibición del crecimiento de los patógenos (Raimundo *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2019). La capacidad antagónica que demostraron las bacterias, *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. en este trabajo, es un indicio de su posible función dentro del ensamblaje bacteriano asociado a *L. alba*, para protegerlo de microorganismos patógenos, y evitar la colonización de otros microorganismos al producir compuestos naturales activos. Por lo que es importante continuar con estudios complementarios que ayuden a comprender el rol de la actividad biológica de las cepas bacterianas asociadas a las gorgonias en el medio ambiente y explorar el potencial biotecnológico que estos productos bioactivos pueden tener.

CONCLUSIONES

Las especies bacterianas, *B. australimaris* y *Pseudoalteromonas* sp. aisladas del octocoral *L. alba*, demostraron que pueden suprimir el crecimiento de las cepas patógenas que afectan a los humanos, así como a las patógenas acuícolas. Estos resultados indican su función dentro del ensamblaje asociado al octocoral en el medio ambiente, y un recurso biotecnológico potencial en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Los métodos empleados para la evaluación de

la actividad antagónica utilizados en este trabajo, involucran contacto directo o del sobrenadante con los patógenos, por lo que la comparación entre métodos no es viable, ya que todos crean diferentes condiciones en los que la bacteria puede o no producir el compuesto activo. Las pruebas que involucran estrados directos en el medio de cultivo, permiten a la cepa bacteriana crecer en el medio del que fue originalmente aislada, y en consecuencia obtener los recursos necesarios para la producción de compuestos antimicrobianos, aunque en algunos casos estos compuestos activos se producen cuando están en presencia del patógeno. Debido a ello, se resalta la importancia de utilizar más de un método para la evaluación de la actividad antimicrobiana y así brindar resultados certeros en la búsqueda de esta actividad y en la exploración de nuevos compuestos con potencial bioactivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a Collection of Aquatic important microorganisms (CIAD-Mazatlán) por facilitar los patógenos *Vibrio parahaemolyticus* (M0904), *Vibrio harveyi* (CAIM333), *Vibrio campbellii* (M0702). Al Laboratorio de Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por facilitar la cepa *Vibrio diabolicus* (CIBGEN002), y al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitir utilizar las instalaciones para los ensayos y facilitar el resto del cepario utilizado.

REFERENCIAS

- Abeytia, R., Guzmán, H. M. & Breedy, O. (2013). Species composition and bathymetric distribution of gorgonians (Anthozoa: Octocorallia) on the Southern Mexican Pacific coast. *Revista de Biología Tropical*, **61**(3), 1157-1166.
- Atencio, L. A., Dal Grande, F., Young, G. O., Gavián, R., Guzmán, H. M., Schmitt, I., Mejía, L. C. & Gutiérrez, M. (2018). Antimicrobial-producing *Pseudoalteromonas* from the marine environment of Panama shows a high phylogenetic diversity and clonal structure. *Journal of basic microbiology*, **58**(9), 747-769. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800087>
- Bowman, J. P. (2007). Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine drugs*, **5**(4), 220-241. <https://doi.org/10.3390/md504220>
- Boya, C. A., Herrera, L., Guzman, H. M. & Gutierrez, M. (2012). Antiplasmodial activity of bacilosarcin A isolated from the octocoral-associated bacterium *Bacillus* sp. collected in Panama. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **4**(1), 66. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92739>
- Breedy, O. & Cortés, J. (2014). Gorgonias (octocorallia: gorgoniidae) de las aguas someras del Pacífico Norte de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, **62**(4), 43-62. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.20032>
- Breedy, O. & Cortés, J. (2016). Octocorals (Coelenterata:

- Anthozoa: Octocorallia) of Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, **5(6)**, 71–77. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.26942>
- Breedy, O. & Guzman, H. M. (2007). A revision of the genus *Leptogorgia* Milne Edwards & Haime, 1857 (Coelenterata; Octocorallia: Gorgoniidae) in the eastern Pacific. *Zootaxa*, **1419**, 1–90. <https://doi.org/10.5281/zenodo.188707>
- Breedy, O. Hickman Jr., C. P. & Williams, G. C. (2009). Octocorals in the Galapagos Islands. *Galapagos Research*, **66**, 27–31. <http://hdl.handle.net/1834/36241>
- Correa, H., Haltli, B., Duque, C. & Kerr, R. (2013). Bacterial communities of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Microbial ecology*, **66(4)**, 972–985. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0267-3>
- de González, J. V. S., Shadid, O. B. & Núñez, J. C. (2021). Gorgonias (Octocorallia: Alcyonacea) de aguas someras de El Salvador. *Realidad y Reflexión*, **54(54)**, 66–94. <https://orcid.org/0000-0001-8548-3790>
- Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H. & Proksch, P. (2010). Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. *Microbial Biotechnology*, **3**, 544–563. <https://orcid.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x>
- Duchassaing, P. & Michelotti, J. (1864). Supplément au mémoire sur les coralliaires des Antilles. *Memorie della Reale Accademia della Scienze di Torino*, **2 (23)**, 97–206.
- Eskander, R., Al-Sofyani, A. A., El-Sherbiny, M. M., Ba-Akdah, M. A. & Satheesh, S. (2018). Chemical Defense of Soft Coral *Sinularia polydactyla* from the Red Sea Against Marine Biofilm-Forming Bacteria. *Journal of Ocean University of China*, **17(6)**, 1451–1457. <https://orcid.org/10.1007/s11802-018-3657-9>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, **320(5879)**, 1034–1039. <https://orcid.org/10.1126/science.1153213>
- Fenical, W. & Jensen, P. R. (1993). Marine microorganisms: a new bio-medical resource, 419–457. In: Attaway, D. H. & Zabrosky, O. R. (Eds.) *Marine biotechnology: pharmaceutical and bioactive natural products*. Plenum Press, New York.
- Gao, C. H., Tian, X. P., Qi, S. H., Luo, X. M., Wang, P. & Zhang, S. (2010). Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856. *Journal Antibiotics*, **63**, 191–193. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.7>
- Garrido, A., Atencio, L. A., Bethancourt, R., Bethancourt, A., Guzmán, H., Gutiérrez, M. & Durant-Archibold, A. A. (2020). Antibacterial Activity of Volatile Organic Compounds Produced by the Octocoral-Associated Bacteria *Bacillus* sp. BO53 and *Pseudoalteromonas* sp. GA327. *Antibiotics*, **9(12)**, 923. <https://orcid.org/10.3390/antibiotics9120923>
- Handayani, D. P., Isnansetyo, A., Istiqomah, I. & Jumina, J. (2022). New report: Genome mining untaps the antibiotics biosynthetic gene cluster of *Pseudoalteromonas xiamenensis* STKMTI. 2 from a mangrove soil sediment. *Marine Biotechnology*, **24(1)**, 190–202.
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mijhailov, V. V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T. & Yoshikawa, S. (1999). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International Microbiology*, **2**, 267–271.
- Karl, D. M. & Church, M. J. (2014). Microbial oceanography and the Hawaii Ocean Time-series programme. *Nature Reviews Microbiology*, **12(10)**, 699–713. <https://doi.org/10.7773/cm.v4i14.2492>
- Ledoux, J. B. & Antunes, A. (2018) Beyond the beaten path: improving natural products bioprospecting using an eco-evolutionary framework—the case of the octocorals. *Critical Reviews in Biotechnology*, **38(2)**, 184–198. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1331335>
- Martínez-Díaz, Y. R. (2010). Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas con indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8461>
- Martínez-Luis, S., Ballesteros, J. & Gutiérrez, M. (2011). Antibacterial constituents from the octocoral-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. *Revista latinoamericana de química*, **39(1-2)**, 75–83.
- Mehub, M. F. Lei, J., Franco, C. & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, **12(8)**, 4539–4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>
- Moree, W. J., McConnell, O. J., Nguyen, D. D., Sanchez, L. M., Yang, Y. L., Zhao, X., Wei-Ting, L., Boudreau, P. D., Srinivasan, J., Atencio, L., Ballesteros, J., Gavilán, R. G., Torres-Mendoza, D., Guzmán, H. M., Gerwick, W. H., Gutiérrez, M. & Dorrestein, P. C. (2014). Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent manner. *ACS chemical biology*, **9(10)**, 2300–2308. <https://doi.org/10.1021/cb500432j>
- Mouchka, M. E., Hewson, I. & Harvell, C. D. (2010). Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integrative and comparative biology*, **50(4)**, 662–674. <https://doi.org/10.1093/icb/icq061>
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V. & Imhoff, J. (2008). Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, **55**, 94–106.
- Pabel, C. T., Vater, J., Wilde, C., Franke, P., Hofemeister, J., Adler, B., Bringmann, G., Hacker, J. & Hentschel, U. (2003). Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*, **5(5)**, 424–34.

- Raimundo, I. Silva, S. G. Costa, R. & Keller-Costa, T. (2018). Bioactive secondary metabolites from octocoral-associated microbes—new chances for blue growth. *Marine drugs*, **16**(12), 485. <https://doi.org/10.3390/md16120485>
- Ríos-Jara, E. (2016). Inventario de la biota marina (cnidarios, poliquetos, moluscos, crustáceos, equinodermos y peces) del Santuario Islas e Islotos de Bahía Chamela, Jalisco, México. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Ecología. Universidad de Guadalajara. Bases de datos SNIB-CONABIO, proyecto JF023. Ciudad de México
- Rizzo, C. & Lo Giudice, A. (2018). Marine invertebrates: Underexplored sources of bacteria producing biologically active molecules. *Diversity*, **10**(3), 52. <https://doi.org/10.3390/d10030052>
- Sánchez, J. A. Dueñas, L. F., Rowley, S. J. Gonzalez-Zapata, F. L., Vergara, D. C., Montaña-Salazar, S. M., Calixto-Botía, I., Gómez, C. E., Abeyta, R., Colin, P. L., Cordeiro, R. T., S. & Pérez, C. D. (2019). Gorgonian corals. In *Mesophotic coral ecosystems* (pp. 729-747). Springer, Cham.
- Sánchez, J. A., Gómez, C. E., Escobar, D. & Dueñas, L. F. (2011). Diversidad, abundancia y amenazas de los octocorales de la isla Malpelo, Pacífico Oriental Tropical, Colombia. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, **40**, 139-154.
- Sang, V. T., Dat, T. T. H., Vinh, L. B., Cuong, L. C. V., Oanh, P. T. T., Ha, H., Kim, Y. H., Anh, H. L. T. & Yang, S. Y. (2019). Coral and coral-associated microorganisms: A prolific source of potential bioactive natural products. *Marine drugs*, **17**(8), 468. <https://doi.org/10.3390/md17080468>
- Shnit-Orland, M. & Kushmaro, A. (2009). Coral mucus-associated bacteria: A possible first line of defense. *FEMS Microbiology Ecology*, **67**, 371–380. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00644.x>
- Soler-Hurtado, M., Megina, C., Machordom, A. & López-González, P. J. (2017). Foxed intra-and interspecific differentiation in *Leptogorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae). A description of a new species based on multiple sources of evidence. *Scientia Marina*, **81**(2). <https://doi.org/10.3989/scimar.04509.01C>
- Stincone, P. & Brandelli, A. (2020). Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Critical reviews in biotechnology*, **40**(3), 306-319. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457>
- Thangapaul, A. J., Praveevn, M. M. & Chinnachamy, C. (2019). Antagonistic activity of an epibiotic *Bacillus* strain SG3 from Gorgonian coral, *Junceella juncea* (Pallas, 1766). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **32**(3), 969-973.
- Webster, N. S. & Reusch, T. B. (2017). Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *The ISME journal*, **11**(10), 2167-2174. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.66>
- Zhang, H. L., Hua, H. M., Pei, Y. H. & Yao, X. S. (2004). Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **52**, 1029-1030.