



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Caracterización de bacterias asociadas a las algas del género *Jania* y *Padina* y su potencial como productoras de compuestos antibacterianos e inhibidores de biopelículas

Tesis

que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

Jazmin Garcia Cuc

DIRECTOR

Leopoldo Díaz Pérez

CODIRECTOR

Ruth Noemí Aguila Ramírez

Zapopan, Jalisco

Febrero de 2021



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

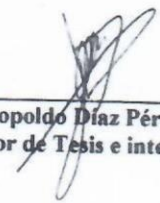
Caracterización de bacterias asociadas a las algas del género *Jania* y *Padina* y su potencial como productoras de compuestos antibacterianos e inhibidores de biopelículas.

Por

Jazmin García Cuc

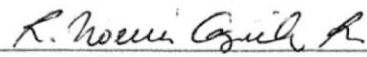
Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



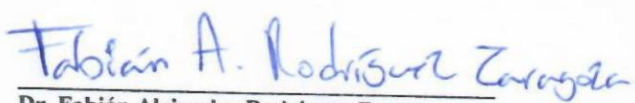
Dr. Leopoldo Díaz Pérez
Director de Tesis e integrante del jurado

27-Enero-2021
Fecha




Dra. Ruth Noemi Aguila Ramirez
Codirectora de tesis e integrante del jurado

27-Enero-2021
Fecha




Dr. Fabián Alejandro Rodríguez Zaragoza
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

28/Enero/2021
Fecha



M. en C. Idefonso Enciso Padilla
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

28-01-2021
Fecha



Dr. Manuel Ayón Parente
Sinodal e integrante del jurado

28/ene/2021
Fecha

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

A Quien Corresponda:

Por este conducto el (la) abajo firmante, autor(a) del Trabajo Recepcional (Tesis) titulada: "**Caracterización de bacterias asociadas a las algas del género *Jania* y *Padina* y su potencial como productoras de compuestos antibacterianos e inhibidores de biopelículas**", declaro que el contenido del mismo constituye un documento inédito y original por lo que cumple con los términos de originalidad a los que se hace mención en el Artículo 73 del Reglamento General de Posgrado y el Artículo 147 Fracción I del Reglamento General de Titulación de la Universidad de Guadalajara.

ATENTAMENTE

Guadalajara, Jalisco, a 28 de enero de 2021



Biol. Jazmin Garcia Cuc
Código: 207547552

Agradecimientos

A la maestría en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BIMARENA) de la Universidad de Guadalajara por el apoyo brindado durante mi formación académica mediante la beca otorgada por el Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) número (923568) y beca movilidad estudiantil para mi estancia en el Laboratorio de Microbiología del CICIMAR en la Paz, Baja California, México.

Una parte de este proyecto de tesis de maestría fue financiado por el proyecto de Ciencia Básica 2015 (257987), titulado “Biodiversidad bacteriana como indicador de salud en ecosistemas coralinos del Pacífico central mexicano y su relación con la condición del hábitat bentónico y fauna asociada” (Responsable técnico: Dr. Fabián Alejandro Rodríguez Zaragoza).

También este proyecto de tesis de maestría fue financiado por el proyecto titulado "Ensamblajes bacterianos asociados a los arrecifes de coral del Pacífico Central Mexicano". Siendo el responsable técnico del proyecto el Dr. Leopoldo Díaz Pérez, con folio UDG-PTC-1407, PROMEP-SEP 2018 - 2020.

Al laboratorio de Microbiología en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional en La Paz, Baja California, por brindarme los recursos y aprendizajes. Por financiar la tesis con el proyecto titulado “Selección de microorganismos para la conformación de un consorcio degradador de plaguicidas”. Siendo la responsable la Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez, con folio 20195503, Proyecto SIP.

A mi director de tesis el Dr. Leopoldo Díaz Pérez por aceptarme en su equipo de trabajo, aun sabiendo que no tenía idea sobre el tema, por confiar en mí para este proyecto, por los conocimientos y enseñanzas aportadas (no hubiera podido terminar sin esto) y la paciencia que fue grande.

A mi codirector la Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez por dejarme trabajar con usted, por ser tan amable en mi estadía en La Paz, por aportarme de su conocimiento y enseñarme con la paciencia que me tuvo y por siempre estar ahí cuando alguna duda surgía.

A mis asesores, el Dr. Fabián Alejandro Rodríguez Zaragoza, el Dr. Manuel Ayón Parente y el M. C Ildelfonso Enciso Padilla, porque cada uno tuvo una gran aportación en este

trabajo el cual no se hubiera concluido de la misma manera sin su contribución, por el conocimiento y enseñanzas a lo largo de estos dos años.

A mi familia por el apoyo y motivación constante, por escucharme, aunque tal vez no entendieran de lo que hablaba y sobre todo por creer en mí, los amo.

A Felipe porque estuviste conmigo en todo este proceso, por alentarme a continuar con mis proyectos y apoyarlos como si fueran tuyos, por tu paciencia los días que no eran buenos y por tu cariño.

A todas las lindas personas que pude conocer gracias al Lemitax, todo fue más divertido gracias a ustedes, por tomarse el tiempo de enseñarme, explicarme y tenerme paciencia en el proceso, por las risas que fueron muchas.

Al Dr. Enrique Godínez por confiar en mí, darme su apoyo y recomendación, por impulsarme a seguir estudiando y por ser la primera persona en darme la oportunidad de trabajar con él.

A las chicas, Eli, Erika, Chio y Magda porque pasan los años y seguimos estando juntas, apoyando nuestros proyectos personales e incentivándonos para ser más grandes y mejores.

Índice

Índice de Figuras	VIII
Índice de Cuadros	X
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	5
1. Especies de estudio.....	5
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Objetivo Particular	12
Material y métodos	13
1. Área de estudio.....	13
2. Toma de muestras.....	14
3. Obtención de concentrados bacterianos.....	14
4. Aislamiento, purificación y caracterización morfológica de las cepas bacterianas	15
5. Identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas.....	16
6. Ensayo de actividad antibacteriana.....	17
7. Ensayos de actividad biológica.....	19
8. Extractos bacterianos.....	20
9. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los extractos bacterianos....	22
10. Concentración Mínima Inhibitoria	23
11. Análisis de efectividad de los ensayos de inhibición de crecimiento y biopelícula.....	23
Resultados	25
1. Aislamiento y caracterización morfológica	25
2. Caracterización bioquímica	26
3. Ensayos de actividad biológica.....	29
4. Ensayo de actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los extractos bacterianos.....	33
5. Bioensayos en placas de poliestireno: inhibición de crecimiento y adherencia	36
Discusiones	44

Conclusiones	50
Bibliografía	51
Anexo	59
Protocolo 1: Medios de cultivos	59
Protocolo 2: Medios y reactivos para pruebas bioquímicas	60
Movilidad	60
Protocolo de pruebas bioquímicas	62

Índice de Figuras

Figura 1. Alga roja perteneciente al género <i>Jania</i> (Imagen tomada y modificada del trabajo de León-Álvarez <i>et al.</i> , 2019).....	5
Figura 2. Alga parda <i>Padina gymnospora</i> (Imagen tomada y modificada del trabajo de Chakraborty <i>et al.</i> (2018)).	6
Figura 3. Porcentaje de productos naturales derivados de organismos (Pimpliskar <i>et al.</i> , 2017).....	8
Figura 4. Sitios de muestreo localizados en el Pacífico Central Mexicano: A) Isla Isabel ubicada en Nayarit y; B) La Manzanilla en el estado de Jalisco.	13
Figura 5. Diagrama de la metodología realizada en los pre-ensayos.	18
Figura 6. Ejemplo del método de gota donde se puede observar un halo de inhibición, presentando, la ausencia del crecimiento de la cepa patógena.	19
Figura 7. Ejemplo del método Cross Streak en donde: A) Representa la cepa a probar, que en este trabajo son las cepas aisladas de las algas; B) Las líneas perpendiculares son las cepas blanco, que representan a las cepas patógenas o formadoras de biofilm y; C) Ejemplo de como se observa la inhibición de crecimiento marcado con plumón mediante una línea.....	20
Figura 8. Aislados bacterianos con diferentes características morfológicas y crecimiento. A) cepa PGI2.2, B) cepa SII.5, C) cepa PGM2.3 y D) cepa PGM2.6.	26
Figura 9. Porcentajes de aparición de las bacterias Gram negativas identificadas mediante pruebas bioquímicas utilizando el Manual de Bergey´s.	28
Figura 10. Porcentajes de aparición de las bacterias Gram positivas identificadas mediante pruebas bioquímicas utilizando el Manual de Bergey´s.	28
Figura 11. Halos de inhibición de las cepas formadoras de biopelícula <i>A. macleodii</i> y <i>A. mediterranea</i> producidos por las cepas: A) Rarobacteraceae (PGI2.2), B) Bacillaceae (PGI2.4), C) Rarobacteraceae (PGI2.2) y Cellulomonadaceae (PGI1.3) obtenidos con la técnica de difusión en pozo.	30

Figura 12. Inhibición de crecimiento de las cepas productoras de biopelícula enfrentadas a las cepas A) Vibrionaceae (JTM3.2) y B) Vibrionaceae (SI3.3) con el método Cross Streak.	30
Figura 13. Inhibición de crecimiento de las cepas patógenas para humano enfrentadas a los aislados: A) Vibrionaceae (SI1.4), B) Rarobacteraceae (PGI2.2) y C) Bacillaceaea (PGI2.4) frente a <i>S. epidermidis</i> con el método Cross Streak. y D) Rarobacteraceae (PGI2.2) frente a <i>S. aureus</i> con el método de difusión en pozo.	32
Figura 14. Porcentaje de inhibición y adherencia de las bacterias patógenas para humanos a) <i>Staphylococcus aureus</i> , b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> , c) <i>Escherichia coli</i> , frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.	37
Figura 15. Porcentaje de inhibición y adherencia de las bacterias formadoras de biopelícula A) <i>Alteromona macleodii</i> (9A), B) <i>Alteromona macleodii</i> (12M), C) <i>Alteromona macleodii</i> (7A), frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.	39
Figura 16. Porcentaje de inhibición y adherencia de las bacterias formadoras de biopelícula A) <i>Aestuariibacter</i> sp. (10D), B) <i>Alteromona mediterranea</i> (11M) frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.	40
Figura 17. Porcentaje de cepas activas localizadas en <i>Padina gymnospora</i> , <i>Jania tenella</i> y sedimento en los diferentes sitios de muestreo: A) La Manzanilla y B) Isla Isabel.	42
Figura 18. Porcentaje de familias que presentaron actividad biológica contra alguna de las cepas probadas en los sitios: A) La Manzanilla y B) Isla Isabel.	43

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Número de cepas aisladas por sitios y por sustratos (alga, sedimento y agua) ..	25
Cuadro 2. Desglose de porcentajes de cepas que dieron positivo para cada una de las pruebas bioquímicas realizadas.....	27
Cuadro 3. Promedio de la zona y/o halo de inhibición de crecimiento (mm) de las cepas formadoras de biopelícula enfrentadas a las cepas aisladas de macroalgas y sedimento con el método de difusión en pozo (números en negritas) y el método Cross Streak (números en color negro).....	31
Cuadro 4. Promedio de las zonas y/o halos de inhibición (mm) de las cepas patógenas para humanos enfrentadas a las bacterias aisladas de las macroalgas y sedimentos con el método de difusión en pozo (en negritas) y el método Cross Streak.	33
Cuadro 5. Promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) producidos por los extractos crudos de los cultivos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos con los dos solventes utilizados: M/A (Metanol-Acetato de etilo) (en negritas) y DCM (diclorometano), frente a bacterias formadoras de biopelícula.	34
Cuadro 6. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) producidos por los extractos crudos obtenidos de los cultivos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos con los dos solventes utilizados: M/A (metanol/acetato) (en negritas) y DCM (diclorometano), frente a patógenos para humanos.....	35
Cuadro 7. Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos de las bacterias que mostraron actividad frente a bacterias patógenas y productoras de biopelícula.	41

Resumen

En el océano existen micro y macroorganismos capaces de producir compuestos activos, por lo que su búsqueda ha aumentado en los últimos años de manera significativa. Las bacterias han sido una fuente importante en esta búsqueda ya que han desarrollado estrategias de supervivencia y adaptación que las han llevado a ser capaces de producir compuestos activos. Actualmente se sabe que las bacterias asociadas a la superficie de las macroalgas, así como del sedimento pueden generar compuestos bioactivos, por lo que en este proyecto se planteó la identificación bacteriana y evaluación del potencial de bioactividad de las bacterias cultivables asociadas al alga *Jania tenella* y *Padina gymnospora*, así como del sedimento circundante. Se aisló un total de 137 cepas las cuales fueron caracterizadas bioquímicamente y probadas en ensayos de actividad antimicrobiana y antibiopelícula. Se obtuvo un total de 12 cepas capaces de inhibir el crecimiento y/o adherencia frente a las cepas patógenas para humanos y formadoras de biopelícula, siendo la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) capaz de inhibir tanto el crecimiento como la adherencia de *Staphylococcus aureus*, *Alteromonas macleodii* (9A), *Alteromonas macleodii* (12M) y *Alteromonas mediterranea* (11M). Por otra parte, destacaron tres extractos capaces de mantener la actividad a una concentración de 100µg/mL (Cellulomonadaceae (PGI1.3), Bacillaceae (PGI2.4), Vibrionaceae (JTM3.2)) y dos extractos a la concentración más baja de 1 µg/mL (Listeriaceae (SM3.7), Enterobacterales (PGM3.6)). Siendo el extracto de Vibrionaceae (JTM3.2) aislado del alga *Jania tenella* el único que inhibió a cinco patógenos a una concentración de 100µg/mL. Este estudio evidenció la presencia de bacterias con capacidad para generar compuestos bioactivos, sugiriendo el seguimiento del estudio con la cepa Vibrionaceae (JTM 3.2) debido a su gran potencial de carácter biotecnológico.

Abstract

In the ocean there are micro and macro-slogans capable of producing active compounds, so their search has increased in recent years significantly. Bacteria have been an important source in this search as they have developed survival and adaptation strategies that have led them to be able to produce active compounds. Currently it is known that bacteria associated with the surface of macroalgae as well as sediment can generate bioactive compounds, so this project raised bacterial identification and assessment of the bioactivity potential of arable bacteria associated with algae *Jania tenella* and *Padina gymnospora*, as well as the surrounding sediment. A total of 137 strains were ousted which were biochemically characterized and tested in antimicrobial and antibiofilm activity trials. A total of 12 strains were obtained capable of inhibiting growth and/or adhesion against pathogenic strains for humans and biofilm formers, being the Vibrionaceae strain (JTM3.2) capable of inhibiting both the growth and adhesion of *Staphylococcus aureus*, *Alteromonas macleodii* (9A), *Alteromonas macleodii* (12M) and *Alteromonas mediterranea* (11M). In addition, three extracts capable of maintaining activity at a concentration of 100 g/mL (Cellulomonadaceae (PGI1.3), Bacillaceae (PGI2.4), Vibrionaceae (JTM3.2)) and two extracts at the lowest concentration of 1 µg/mL (Listeriaceae (SM3.7), Enterobacterales (PGM3.6)) stood out. Vibrionaceae extract (JTM3.2) isolated from *Jania tenella* seaweed is the only one that inhibited five pathogens at a concentration of 100 µg/mL. This study showed the presence of bacteria with the ability to generate bioactive compounds, suggesting the follow-up of the study with the Vibrionaceae strain (JTM 3.2) due to its great potential for biotechnological character.

Introducción

Las macroalgas son un conjunto de vegetales talófitos, diferentes de las plantas terrestres debido a la ausencia de un sistema vascular (raíces, tallos y hojas). Estos organismos son multicelulares, provistos de pigmentos fotosintetizadores y suelen permanecer fijos a un sustrato (Enciso-Padilla, 2013; APROMAR, 2014, Stincone y Brandelli, 2020). Habitan en el medio marino, siendo de gran importancia para el ecosistema ya que constituyen una fuente importante de alimento para una gran variedad de especies de peces, moluscos, crustáceos y equinodermos (Quirós-Rodríguez *et al.*, 2010).

Los ambientes marinos son altamente competitivos, principalmente por el espacio disponible para el asentamiento de larvas de invertebrados, por ello, las macroalgas pueden llegar a ser colonizadas por microorganismos, en su mayoría bacterias, que forman películas bacterianas (biofilm) sobre la superficie de las algas (Villareal-Gómez *et al.*, 2010; Flemming *et al.*, 2016; Ramanan *et al.*, 2016).

Se ha documentado que las bacterias presentes en la superficie de las algas llegan a establecer una relación simbiótica con las macroalgas, beneficiándose ambas partes. Por un lado, las bacterias tienen un espacio disponible para habitarlo, además de aprovechar los compuestos orgánicos generados por el alga como fuente de alimento; así mismo, las bacterias aerobias utilizan el oxígeno producido por el alga para su funcionamiento celular. En cuanto a las algas, éstas utilizan el CO₂, y otros compuestos producidos por las bacterias para su metabolismo (fijación de nitrógeno) (JanakiDevi *et al.*, 2013; Kouzuma y Watanabe, 2015).

La comunidad bacteriana que habita en la superficie de las algas vive en un ambiente altamente competitivo, tanto por el espacio que comparten como para la obtención de nutrientes (Stincone y Brandelli, 2020). Se sabe que éstas bacterias son capaces de producir metabolitos secundarios con el fin de inhibir el asentamiento de nuevos competidores bacterianos (Kanagasabhpathy *et al.*, 2006), lo cual ofrece también una ventaja a las macroalgas, ya que les ayudan a evitar la adhesión de otros microorganismos no deseados, así como el asentamiento de larvas de invertebrados marinos mediante compuestos antifouling y antibiopelícula producidos por las bacterias (Lachnit *et al.*, 2013; Ramanan *et al.*, 2016).

En este sentido, se ha considerado que las macroalgas al ser organismos sésiles, podrían ser altamente colonizadas por organismos epibiontes, sin embargo, muchas de ellas permanecen libres de estos. Es bien conocido que las bacterias que habitan en la superficie de las macroalgas, pueden generar compuestos bioactivos que las protejan de la colonización de epibiontes marinos (esponjas, poliquetos, balanos, etc.), así como de otros factores como la depredación y colonización de microorganismos (bacterias, hongos, etc.) (Kanagasabhapathy *et al.*, 2006).

Existen diversos estudios que se han centrado en la microbiota encontrada en la superficie de las macroalgas, enfocándose principalmente en las comunidades bacterianas (Hellio *et al.*, 2015; Ismail *et al.*, 2018; Horta *et al.*, 2019; Kizhakkekalam y Chakraborty, 2019), ya que éstas al vivir en ambientes tan competitivos, donde el espacio y los nutrientes son limitados, han desarrollado la capacidad de producir metabolitos secundarios, los cuales han mostrado tener diferentes actividades como: antimicrobianas, anticancerígenas, antibiopelícula y fungicidas, entre otros, lo que ha propiciado un aumento en la búsqueda de estos nuevos compuestos inhibidores en los últimos años (Pimpliskar *et al.*, 2017; Stincone y Brandelli, 2020).

Las macroalgas también se han destacado por la producción de compuestos activos (Corrêa-Alves *et al.*, 2016; Yong *et al.*, 2018; Peihang *et al.*, 2018), sin embargo, un punto importante a considerar en la búsqueda de compuestos bioactivos es la cantidad obtenida, ya que se requiere una gran cantidad de biomasa de algas para su obtención, lo que podría generar un impacto en las poblaciones naturales de macroalgas. De tal manera, el estudio y la obtención de las bacterias asociadas a las macroalgas permite la obtención de compuestos de interés de manera sustentable, ya que éstas bacterias pueden ser cultivadas en laboratorio y así obtener una mayor cantidad del compuesto de interés mediante el uso de bioreactores (Martínez-Matamoros, 2012; Pineda-Muños, 2014). A pesar de esto, la obtención de compuestos bioactivos mediante microorganismos también representa un gran reto debido a las diferentes condiciones necesarias de recrear en el laboratorio para la obtención de estos compuestos (Leal-Costa *et al.*, 2014).

Antecedentes

1. Especies de estudio

Las macroalgas están clasificadas en tres grandes grupos: Chlorophyta (algas verdes), Heterocontophyta (algas cafés) y Rhodophyta (algas rojas) (Enciso-Padilla, 2013). El género *Jania* (J.V. Lamouroux, 1812) (Figura 1) pertenece al grupo de las algas rojas y suele habitar en áreas sombreadas de los arrecifes o en grietas (De Kluijver *et al.*, *s.f.*), se pueden encontrar en profundidades no mayores a los 30m y con mayor abundancia en el intermareal. Éstas algas presentan talos arbustiformes, ásperos, semiduros, firmes, calcificados y con articulaciones (León-Alvarez *et al.*, 2017). Este género se distribuye en el Pacífico mexicano (Baja California Sur, Sinaloa hasta Colima), Ecuador, Costa Rica, Chile, China, Japón, Corea y las Filipinas (Cadano y Trono, 1987; Mateo-Cid *et al.*, 2013). Por otro lado, en las costas de Jalisco, la especie *Jania Tenella* (Grunow, 1874) se localiza en Puerto Vallarta, Yelapa, Chimo, Bahía Corrales, Playitas, Mayto, Tehiamixtle, Chalacatepec, Punta Pérula, Chamela, isla Cocinas, Carayes, Tenacatita, La Manzanilla, El tamarindo, Cuastecomates y Melaque. (Enciso-Padilla *et al.*, 2019).

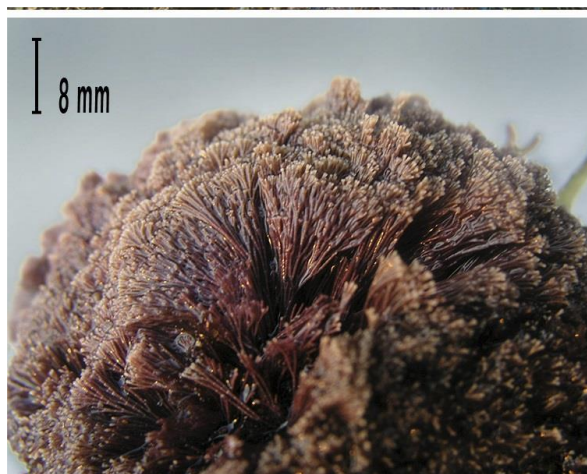


Figura 1. Alga roja perteneciente al género *Jania* (Imagen tomada y modificada del trabajo de León-Álvarez *et al.*, 2019).

El género *Padina* (Adanson, 1763) (Figura 2) pertenece al grupo de las algas cafés, normalmente habita en zonas tropicales y en arrecifes coralinos, presentes en el intermareal rocoso a pocos metros de profundidad, además se caracteriza por el número de capas de células presentes en su talo (Asturnatura, 2004). Presentan una fronda en forma de abanico,

tienen un crecimiento similar al de los matorrales y son semirrígidos, lisos o ásperos, parcialmente calcificados (superficialmente) (León-Álvarez y Reséndiz-Núñez, 2017). El género *Padina* se distribuye en aguas tropicales en todo el mundo, mientras que, la distribución de *Padina Gymnospora* (Sonder, 1871) en el estado de Jalisco es en Puerto Vallarta, Yelapa, Bahía Corrales, Chalacatepec, Punta Pérula, Chamela, Isla Cocinas, Careyes, Tenacatita, La Manzanilla, El Tamarindo, Cuastecomates, Melaque y Barra de Navidad (Enciso-Padilla *et al.*, 2019).



Figura 2. Alga parda *Padina gymnospora* (Imagen tomada y modificada del trabajo de Chakraborty *et al.* (2018)).

Las algas han sido utilizadas en diversas industrias como la farmacológica, cosmética y alimentaria. Diversas especies de algas cafés tienen un potencial económico alto como es el caso del alga *Sargassum* (C.Agardh, 1820), la cual suele ser empleada como alimento en distintos países (Velasco-González *et al.*, 2013). Por otro lado, las especies de algas trabajadas en el presente estudio no han sido ampliamente explotadas, *Padina gymnospora* es una fuente para la búsqueda de compuestos activos (Baliano *et al.*, 2016) y ha sido utilizada en el ramo de la agricultura como bioestimulante en el proceso de germinación y estimulación de plantas de tomate (Hernández-Herrera *et al.*, 2016). Por su parte, el alga *Jania rubens* también ha sido aprovechada como bioestimulante para el crecimiento vegetal (Pérez-Madruga *et al.*, 2020).

2. Las algas y su diversidad bacteriana

Algunos estudios sugieren que la diversidad bacteriana presente en las algas difiere entre hábitats y especies, así como de su ambiente circundante (Goecke *et al.*, 2010; Moreno-Herrera *et al.*, 2010; Pineda-Muñoz, 2014), y esto puede deberse a diversos factores, entre ellos los factores ambientales (Lee-Morrissey *et al.*, 2019). Se ha reportado que la biota bacteriana asociada se compone principalmente de bacterias Gram negativas. Por ejemplo, Gallardo *et al.* (2004) encontraron que en *Monostroma undulatum* (Wittrock, 1866) el 89% de las bacterias aisladas eran Gram negativas. Así mismo, se encontraron presentes diversos grupos predominando las bacterias pertenecientes a las clases Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Planctomycetes (Pal-Singh *et al.*, 2015).

En un estudio realizado con *J. rubens* por Ali *et al.* (2012) se encontraron tres grandes grupos: Proteobacterias con 14 cepas, Bacteroidetes con cuatro cepas y Firmicutes con una, predominando la familia Rhodobacteraceae, seguido de Pseudomonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Vibrionaceae, Oceanospirillaceae y Rhizobiaceae, siendo las últimas tres las que tuvieron menor representatividad, así como las pertenecientes al género *Bacillus* con la presencia de una cepa.

JanakiDevi *et al.* (2013) trabajaron con cinco especies de macroalgas aislando un total de 126 bacterias, entre las cuales el 50% fueron Gammaproteobacteria. Dentro de las macroalgas estudiadas se incluye a *P. gymnospora*, de la cual se aislaron Gammaproteobacteria (52%), Alphaproteobacteria (16%) y Firmicutes (12%). Por su parte, Kizhakkekalam y Chakraborty (2019) con siete diferentes especies de macroalgas, entre ellas un alga roja *Hypnea valentiae* y el alga parda *P. gymnospora*, lograron aislar un total de 148 bacterias, siendo esta última la que contribuyó con el mayor número de aislados bacterianos con un 24%.

Por su parte, Ismail *et al.* (2016) encontraron en *Padina pavonica* cuatro grandes grupos, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, en donde se identificaron los taxones *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter*, *Erwinia billingiae*, *Vibrio*, *Bacillus pumilus* y *Staphylococcus* y nuevamente el grupo de las Proteobacterias fue el más abundante. Por otro lado, Murti *et al.* (2016) en la búsqueda por

la obtención de nuevos pigmentos asociados con carotenoides aislaron bacterias del alga *Padina* sp., obteniendo cepas pertenecientes al género *Bacillus*.

Según un estudio realizado por Goecke *et al.* (2010) de 36 especies de macroalgas analizadas se aislaron 56 nuevas especies de bacterias (32% de *Chlorophyta*, 35% de *Phaeophyceae*, 12% *Rhodophyta* y el 21% de algas no identificadas). Yoon *et al.* (2008) identificaron una nueva especie bacteriana aislada del alga *Padina* sp. denominada *Roseibacillus ponti*, mientras que *Shewanella algae* fue aislada por primera vez del alga *Jania* sp. (Simidu *et al.*, 1990).

3. Compuestos bioactivos

Una gran variedad de productos farmacológicos que utilizamos hoy en día se han obtenido a partir de productos naturales de diversos organismos como las esponjas, celentéreos, algas, entre muchos otros (Figura 3).

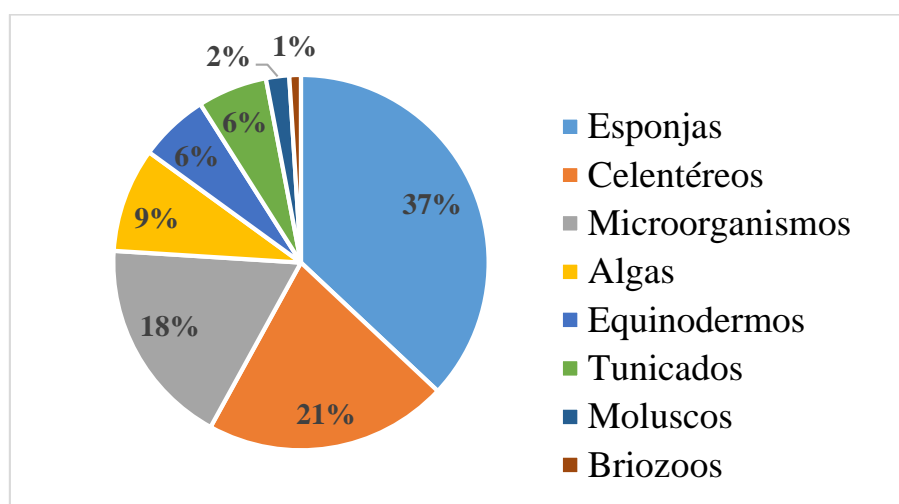


Figura 3. Porcentaje de productos naturales derivados de organismos marinos (Pimpliskar *et al.*, 2017).

A finales de los años 80's se descubrieron alrededor de 50,000 productos naturales bioactivos obtenidos de microorganismos marinos, de los cuales 8,000 compuestos presentaron actividad bactericida frente a diferentes especies bacterianas (Pimpliskar *et al.*, 2017). Como consecuencia de estos resultados, en los últimos años la búsqueda de compuestos naturales alrededor del mundo ha ido en aumento, encontrándose que alrededor del 20% de las bacterias aisladas de ambientes marinos producen compuestos bioactivos que pueden

presentar actividad antimicrobiana, antifúngica, citotóxicos, antibiobiofilm, entre otras (Pal-Singh y Reddy, 2014; Habbu *et al.*, 2016; Kim-Cuc *et al.*, 2019; Stincone y Brandelli, 2020).

En diferentes estudios se ha encontrado que los aislados bacterianos de la superficie de algas presentan actividad de tipo: antimicrobiana, antibiopelícula, antifúngica, antitumoral etc. (Harder *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2012; Pawar *et al.*, 2015; Ismail *et al.*, 2016). Por lo que al tener una mayor riqueza en macroalgas existe potencialmente una cantidad más alta de bacterias asociadas a ellas, las cuales pueden llegar a representar una fuente importante de compuestos bioactivos nuevos con valor para la biotecnología o farmacología.

En algunos trabajos realizados con algas de género *Padina* se han encontrado resultados en la obtención de bacterias con capacidad inhibitoria contra patógenos humanos o animales. JanakDevi *et al.* (2013) realizaron extractos de las bacterias aisladas de cinco especies de macroalgas incluidas a *P. gymnospora* contra diversos patógenos como: *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas aureginosa*, *Micrococcus*, *Salmonella* sp., entre otros, obteniendo, los mayores rangos de inhibición a partir de bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas* sp. Otro estudio similar fue el realizado por Thilakan *et al.* (2016) quienes también trabajaron con el alga *P. gymnospora* encontrando que un 17% del total de bacterias aisladas de esta alga presentaban actividad antimicrobiana.

Por otra parte, la capacidad de resistencia de las bacterias patógenas se ha ido incrementado con los años, en gran medida gracias al uso indiscriminado de medicamentos y a la capacidad de adaptación bacteriana, por lo que la investigación de compuestos capaces de inhibir a las bacterias es de gran importancia. Chakraloborty *et al.* (2018) aislaron la especie *Bacillus amyloliquefaciens* del alga *P. gymnospora*, la cual mostró una actividad de inhibición contra varias especies patógenas como *Vibrio harveyi*, entre otras.

Esto mismo se ha encontrado con otras especies de algas pertenecientes al género *Padina*: *P. arborescens* (Kanagasabhpathy *et al.*, 2016), *P. tetrastomatica* (Karthick y Mohanraju, 2018) y *P. pavonica* (Ali *et al.*, 2016). En esta última se encontraron 18 cepas que eran capaces de producir inhibición antibacteriana, encontrando los mayores rangos de inhibición de una especie del género *Bacillus*, quien fue capaz de inhibir 15 de las 19 cepas patógenas

probadas, presentando mayor efectividad contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Micrococcus* (Ali *et al.*, 2016).

En cuanto al género *Jania*, ésta ha tenido menor representación en este tipo de estudios. Sin embargo, los trabajos realizados han mostrado buenos resultados como lo reportado por Ali *et al.* (2012) con la especie *Jania rubens*, quienes encontraron que de 19 cepas aisladas nueve fueron activas, perteneciendo, a los géneros *Bacillus*, *Aquimarina*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Paracoccus*. De esta manera, se sabe que al menos un 35% de las bacterias asociadas a las superficies de macroalgas pueden producir sustancias antimicrobianas (Burgess *et al.*, 1999; Goecke *et al.*, 2010).

Justificación

La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de origen marino se ha incrementado de manera exponencial en los últimos años, principalmente para su uso en el área médica, industrial, agricultura, biotecnología, entre otras. El mal uso de los antibióticos ha provocado la resistencia de microorganismos patógenos a estos medicamentos, por lo que el océano y los microorganismos que habitan en él se han convertido en el principal proveedor de nuevos productos naturales con diferentes bioactividades como son los antimicrobianos, antifúngicos, antibiofilms, antifouling, anticancerígenos, antiinflamatorios, entre muchos otros. Las comunidades bacterianas que habitan sobre las algas han demostrado tener la capacidad para producir compuestos bioactivos, esto también se ha podido encontrar con las bacterias asociadas al sedimento, por lo que el estudio de la composición bacteriana de las macroalgas y el sedimento circundante a ellas es de gran interés para la producción de compuestos naturales. Las algas del género *Padina* y *Jania*, son muy abundantes en los ecosistemas costeros del Pacífico mexicano y han sido muy poco estudiadas en cuanto a su diversidad bacteriana y bioactividad de las bacterias que habitan en su superficie. De tal manera, este estudio pretende conocer la diversidad de bacterias cultivables asociadas en ambos géneros de macroalgas y el sedimento adyacente, así como determinar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de éstas bacterias.

Hipótesis

Actualmente se sabe que las bacterias son capaces de producir compuestos bioactivos, por lo que las bacterias asociadas a las algas y el sedimento pueden llegar a producir estos compuestos debido a la competencia por espacio, e incluso ayudando al alga a evitar la adhesión de microorganismos no deseados, así como de larvas de invertebrados marinos. Esto debido a que muchas algas pueden permanecer libres de epifitos o epibiontes. Por lo anterior, se asume que las bacterias aisladas de la superficie de las algas del género *Jania* y *Padina*, así como del sedimento marino adyacente, mostrarán actividad antimicrobiana y antibiopelícula frente a bacterias patógenas y formadoras de biopelícula.

Objetivo General

Evaluar la diversidad bacteriana cultivable y el potencial de las bacterias asociadas a las algas del género *Jania* y *Padina*, así como del sedimento circundante para la producción de compuestos antibacterianos e inhibidores de biopelícula.

Objetivo Particular

1. Caracterizar bioquímicamente e identificar las bacterias asociadas a las algas *Jania tenella* y *Padina gymnospora* y sedimento.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas para humanos.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de biopelícula frente a bacterias patógenas y marinas.

Material y métodos

1. Área de estudio

El área de estudio se localiza en el Pacífico Central Mexicano y comprende las costas del estado de Jalisco y Nayarit, en donde se encuentran los dos sitios de estudio de este trabajo (Figura 4). El primero de ellos, La Manzanilla localizada en el municipio de la Huerta, Jalisco ($19^{\circ}17'56''\text{N}$, $104^{\circ}47'38''\text{O}$), este sitio cuenta con acantilados y formaciones rocosas, en bajamar presenta pozas de marea y un estero de gran importancia del mismo nombre que la región “Estero de la Manzanilla”, el cual tiene interacción con el mar y cuenta con un clima cálido subhúmedo y temperatura media anual de 27°C . A lo largo de los años este sitio ha tenido asentamiento humano contando con una población en el año 2010 de 1,061 habitantes (IIEG, 2018).

El segundo sitio de muestreo es Isla Isabel, situada aproximadamente a 28 km de la costa de Nayarit ($21^{\circ}50'35.26''\text{N}$, $105^{\circ}53'06.47''\text{O}$). Este sitio cuenta con 194 hectáreas que abarcan una gran variedad de ecosistemas: laguna, manglar, playa de arena, talud y litoral, así como una diversidad de especies como son moluscos, crustáceos, mamíferos marinos, etc., siendo decretada Parque Nacional en 1980 (Ríos-Jara *et al.*, 2008).

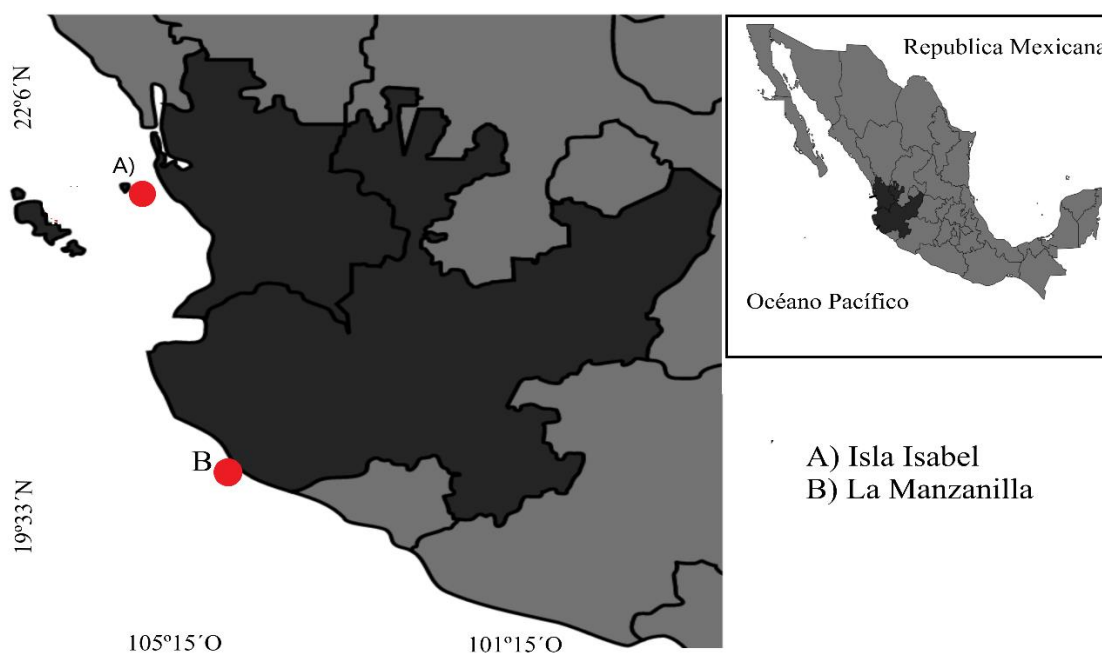


Figura 4. Sitios de muestreo localizados en el Pacífico Central Mexicano: A) Isla Isabel ubicada en Nayarit y; B) La Manzanilla en el estado de Jalisco.

2. Toma de muestras

Para la recolecta de muestras se seleccionaron dos especies de macroalgas; un alga café *Padina gymnospora* y un alga roja *Jania tenella*. Éstas especies fueron seleccionadas con base en trabajos anteriores donde se menciona la presencia de ambas especies de macroalgas a lo largo de la costa del Pacífico central mexicano (Enciso-Padilla, 2013; Enciso-Padilla *et al.*, 2019).

De cada especie de macroalga se tomó un total de tres muestras, cada una en un punto diferente seleccionado al azar dentro de cada zona de muestreo, con una distancia de cinco metros de separación entre muestras. Las algas recolectadas fueron rociadas con agua de mar estéril para quitarles cualquier rastro de sedimento, epifitos adheridos y el agua de mar circundante a ellas. Posteriormente, éstas fueron colocadas en tubos de 50mL previamente esterilizados. Además, se tomaron muestras de agua de mar y sedimento marino, en el mismo sitio donde se recolectaron las algas, con tubos de 50mL estériles. En total se tomaron tres réplicas para cada muestra (*P. gymnospora*, *J. tenella*, agua y sedimentos). Sin embargo, en Isla Isabel se recolectaron solo muestras de *P. gymnospora* y sedimento, ya que no se encontraron individuos de *J. tenella*. Todas las muestras fueron colocadas en hieleras a 4°C y transportadas al laboratorio de Ecología, Molecular, Microbiología y Taxonomía (LEMITAX) del Departamento de Ecología del CUCBA.

3. Obtención de concentrados bacterianos

Concentrado bacteriano de las algas

En el laboratorio, se realizó un frotis con hisopos estériles a lo largo de toda la superficie de cada especie de alga, abarcando desde la fronda hasta el ápice sin omitir ningún lugar, cada hisopo fue colocado en un microtubo con 1mL de agua de mar estéril y se aplicó vortex de uno a dos minutos. Este procedimiento se realizó para separar las células bacterianas del algodón del hisopo, posterior a esto, el hisopo fue retirado con pinzas estériles y desechado.

Concentrado bacteriano del agua de mar

Los 50mL de agua de mar fueron depositados en diferentes microtubos de 2mL previamente esterilizados. Estos fueron centrifugados a 13,000 rpm por tres minutos a 4°C. Esto se realizó

para precipitar las células bacterianas al fondo del microtubo. Posteriormente, se desechó el sobrenadante de todos los microtubos y todos los pellets obtenidos fueron resuspendidos con el remanente de agua que se dejó en el fondo del microtubo después de tomar el sobrenadante. A continuación, todos los pellets resuspendidos previamente fueron colocados en un microtubo nuevo hasta obtener un concentrado bacteriano de 1mL. Este procedimiento se realizó con todas las muestras de agua obtenidas.

Concentrado bacteriano del sedimento

Los tubos de 50mL con sedimento, recolectados en los sitios de muestreo, contenían restos de agua de mar, que fueron retirados por completo y se agregó nueva agua de mar estéril. A todos los tubos se les aplicó agitación intensa por vortex de uno a dos minutos para resuspender las células bacterianas de los granos de arena en el agua de mar. A continuación, toda el agua de mar fue depositada en microtubos de 2mL y centrifugados a 13,000 rpm por tres minutos a 4°C para la obtención de los pellets bacterianos (bacterias sedimentadas en el fondo), los cuales una vez obtenidos fueron concentrados en un microtubo a 1mL.

4. Aislamiento, purificación y caracterización morfológica de las cepas bacterianas

Para aislar las cepas bacterianas de las diferentes muestras de los concentrados bacterianos se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-20} para las muestras de macroalgas, diluciones de 10^{-1} a 10^{-18} para las muestras de sedimento y diluciones de 10^{-1} a 10^{-11} para las muestras de agua de mar, utilizando, agua de mar previamente esterilizada. De cada dilución se tomaron 50 μ L (muestras de algas y sedimento) y 100 μ L (muestras de agua) y se sembraron por separado con la técnica de extensión con rastrillo en caja de Petri con medio agar Zobell marino rico en nutrientes, permitiendo así la separación de las células, las cajas se incubaron de tres a cuatro días a 28°C.

Una vez transcurridos los días de incubación de cada caja Petri de las diferentes diluciones, se seleccionaron las colonias que tuvieran diferentes características morfológicas como: forma, margen, tamaño, textura, elevación, apariencia, pigmentación y propiedad óptica. Las colonias seleccionadas fueron aisladas mediante picadura con palillo de madera estéril y colocados en tubos de ensayo con 2mL de medio líquido Zobell marino e incubados con agitación constante a 28°C de uno a dos días (hasta observar turbidez en el medio de cultivo).

Para comprobar el grado de purificación, cada cepa fue sembrada en cajas Petri con medio agar Zobell sólido con el método de estriado con asa bacteriológica y posteriormente las cajas fueron incubadas a 28°C de dos a cinco días. Si se observaba la presencia de contaminación bacteriana (colonias con otra morfología) se procedía a realizar nuevamente los pasos ya mencionados anteriormente hasta obtener crecimiento de solo un tipo de cepa.

Una vez purificadas las cepas a cada una se les asignó un código de identificación el cual contenía características de la muestra y recolecta: el tipo de muestra a la que pertenecía; alga o sedimento, en caso de ser alga se tomó en cuenta el nombre de las especies a trabajar, el lugar de recolección de la muestra (Isla Isabel o La Manzanilla) y el número de muestra al que pertenecen, un ejemplo de esto es PG11.1 en referencia a *P. gymnospora* recolectada de Isla Isabel, muestra 1, individuo 1. Cada cepa fue criopreservada con glicerol al 45% por duplicado y almacenadas en ultracongelador a -80°C. Todo esto con el fin de crear el primer cepario de bacterias aisladas de macroalgas realizado en el LEMITAX del Departamento de Ecología del CUCBA.

5. Identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas

Para determinar las características metabólicas y celulares de cada cepa se realizaron un total de 12 pruebas bioquímicas diferentes (ver protocolo en la sección de Anexos):

- Movilidad para ver el grado de migración de las células desde la línea de siembra.
- Oxido-Fermentación de glucosa para determinar la forma en que utilizan los hidratos de carbono.
- Tolerancia a la salinidad para determinar la capacidad de desarrollo en medios con mayor o menor salinidad.
- Medio TCBS para determinar si son fermentadoras de sacarosa, aparte de ser un medio selectivo para especies del género *Vibrio*.
- Medio MacConkey para determinar la fermentación de lactosa.
- Oxidasa que se utiliza para observar si se oxida el citocromo C oxidasa.
- Catalasa para observar si las bacterias hidrolizan el peróxido de hidrógeno.
- Vogues Proskauer y Rojo de metilo que son utilizados para determinar la capacidad de fermentar glucosa por vía ácido mixta o por vía butanodiólica, respectivamente.

- Prueba de Indol para determinar la capacidad bacteriana de producir indol a partir de triptófano.
- Tinción Gram que es una tinción diferencial muy utilizada, ya que permite determinar el tipo de pared y morfología celular.
- Prueba de hidróxido de potasio que se usa para ratificar los resultados obtenidos en la tinción Gram.

Para la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas se utilizó el Manual de Bergey Systematic Bacteriology (Brenner *et al.*, 2005).

6. Ensayo de actividad antibacteriana

Pre-ensayos

Para determinar cuáles cepas presentaban actividad inhibitoria se realizó una prueba preliminar con todas las cepas aisladas de las muestras de algas y sedimento frente a cepas patógenas para humano. Se agregaron 100µL de cada cepa en microtubos con 500µL de caldo Zobell marino, los cuales se incubaron a 28°C durante 48 horas. Al mismo tiempo se realizó un pre-inóculo de las cepas patógenas en placas de Petri con medio sólido Müller-Hilton y se incubaron por 24 h a 35°C. Pasado el tiempo de incubación se ajustó la densidad óptica de cada cepa patógena a 585 nm en tubos con 5mL de solución salina (2.5%) por medio de un espectrofotómetro a una densidad celular de 1×10^8 cel/mL –estimado previamente mediante curva de crecimiento y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)–, a partir de esta suspensión celular se inocularon 100µL en cajas de Petri con agar Müller-Hilton, esparciendo de forma masiva con hisopo en toda la placa.

A continuación, los microtubos con el cultivo de las cepas aisladas de las macroalgas y el sedimento se centrifugaron a 13,500 rpm durante 20 minutos y se tomaron 20µL del sobrenadante de cada una de ellas (Figura 5). La prueba se realizó por el método de gota, en cada una de las cajas inoculadas con la cepa patógena y se dejó incubar por 24 y 48 h a 28°C. Los ensayos antimicrobianos se realizaron frente a cinco cepas patógenas de referencia ATCC: *Staphylococcus aureus* BAA-42, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus epidermidis* 14990, *Salmonella enterica* 14028 y *Escherichia coli* BAA-196. Transcurrido el tiempo se evaluó la presencia de zonas de inhibición del crecimiento de las cepas patógenas.



Figura 5. Diagrama de la metodología realizada en los pre-ensayos.

Estos ensayos se realizaron también contra cepas marinas productoras de biopelícula como son: *Vibrio sinaloensis* (110), *Pseudoalteromonas prydzensis* (116), *Alteromonas* sp. (1D), *Alteromonas simiduii* (4M), *Alteromonas mediterranea* (11M) *Aestuariibacter* sp. (10D), y varias cepas de *Alteromonas macleodii* (12M, 7A, 9A). En paréntesis se muestran los códigos de cada una de las cepas, tomadas de un cepario del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR-IPN. Para éstas pruebas se realizó el procedimiento mencionado anteriormente. Sin embargo, la única diferencia fue que se utilizó agar marino (peptona bacteriológica, levadura, agar, cloruro férrico) en lugar del agar Müller-Hilton para sembrar las cepas blanco.

Para la detección de las cepas que fueron capaces de inhibir a las cepas blanco se observaron los halos de inhibición alrededor de la gota, si se observaba la presencia de la cepa blanco de manera uniforme entonces se obtenía un resultado negativo (Figura 6).

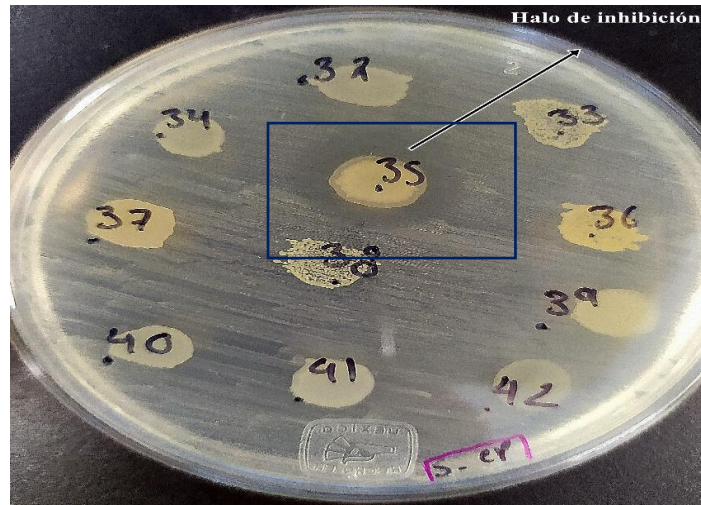


Figura 6. Ejemplo del método de gota donde se puede observar un halo de inhibición, presentando la ausencia del crecimiento de la cepa patógena.

7. Ensayos de actividad biológica

Una vez realizados los ensayos preliminares se seleccionaron solo las cepas que mostraron actividad biológica. Para los ensayos se utilizaron dos metodologías: el método de difusión en pozo y el método de Cross Streak, con el fin de obtener resultados más certeros. Para la difusión en pozo se realizó la metodología propuesta por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1993) con algunas modificaciones. Así que una vez ajustado el inóculo de los patógenos como se mencionó previamente, se prosiguió a realizar perforaciones al medio sólido con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro obteniendo siete pozos por caja Petri. A cada uno de los pozos se les agregó 40 μ L de la suspensión bacteriana a probar (sobrenadante bacteriano), que se dejó en incubación por 48 h. Una vez terminados de llenar los pozos, las placas se refrigeraron a 4°C durante 1 h para permitir la difusión de los compuestos activos. Posteriormente, se incubaron durante 24 y 48 h a 35°C. Transcurrido el tiempo se evaluó la presencia de halos de inhibición alrededor de los pozos.

El segundo método (Cross Streak) tomado de Velho-Pereira y Kamat (2011) consistió en realizar una línea transversal del inóculo de las cepas a probar (cepas aisladas de las algas)

en el centro en placas Müller Hilton (patógenos humanos) o Agar Marino (formadoras de biopelícula) y se incubaron a 28°C por 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó un inóculo de las cepas blanco (cepas patógenas o formadoras de biofilm), que se sembraron mediante una línea perpendicular sin tocar la línea transversal de la cepa a probar, inoculada previamente, las cajas se vuelven a incubar 28°C por 24 y 48 h. Después de este tiempo se evaluaron las zonas de inhibición entre las cepas enfrentadas (Figura 7).

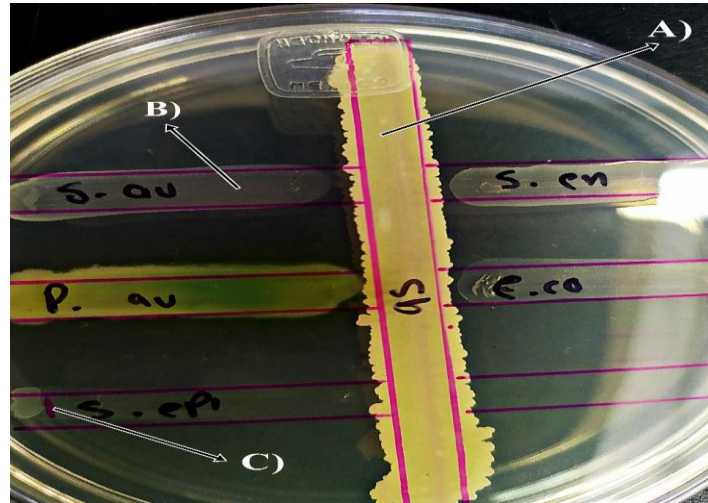


Figura 7. Ejemplo del método Cross Streak en donde: A) Representa la cepa a probar, que en este trabajo son las cepas aisladas de las algas y sedimento; B) Las líneas perpendiculares son las cepas blanco, que representan a la cepas patógenas o formadoras de biofilm y; C) Ejemplo de como se observa la inhibición de crecimiento marcado con plumón mediante una línea.

8. Extractos bacterianos

Metanol/Acetato de etilo

Las bacterias que mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas blanco se cultivaron en matraces de 250mL con 100mL de medio Zobell líquido y se incubaron de cuatro a cinco días a 28°C con agitación constante a 150 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación los cultivos fueron centrifugados a 4,000 rpm y se obtuvo el sobrenadante, al cual se le agregó la resina Diaion HP20 (50g/L), y posteriormente, se incubó en agitación constante a 28°C durante 12 h. Después, la resina fue filtrada con papel Whatman no.1 tratando de evitar retirar la resina del matraz y el sobrenadante fue desechado. La resina se

dejó secar a temperatura ambiente en el matraz y luego se agregó 100mL de metanol, permaneciendo en agitación constante durante 30 minutos. A continuación, la resina se vuelve a filtrar para obtener los metabolitos que se liberaron con el disolvente, evitando retirar la resina del matraz para una segunda extracción, mientras que el metanol fue concentrado a presión reducida en un rota-evaporador. Mientras tanto, a la resina filtrada con anterioridad, la cual permaneció en el matraz, se le agregó 100mL de acetato de etilo y se mantuvo en agitación constante por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se filtró el solvente y se concentró en el rota-evaporador, junto con el concentrado obtenido en la primera extracción con metanol y se desechó la resina utilizada. Estos extractos se pasaron a viales de vidrio para su almacenamiento, para ello, se utilizó metanol en pequeñas cantidades para recuperar los compuestos del matraz y fueron nuevamente concentrados por medio de presión reducida con un rota-evaporador.

Diclorometano

Por otro lado, se realizó una extracción de metabolitos con diclorometano como solvente. Se realizó un cultivo de 250mL el cual se incubó en agitación constante de cuatro a cinco días. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 30 minutos para obtener el sobrenadante que fue colocado en un embudo de decantación junto con el diclorometano en una proporción 1:1 (sobrenadante/solvente). Al embudo se le colocó un tapón y se agitó vigorosamente con el fin de obtener los metabolitos de la muestra. Después se retiró el tapón del embudo y se dejó reposar unos minutos hasta observar la separación de las fases (orgánica y acuosa). La fase orgánica fue colocada en un matraz y concentrada a presión reducida en un roto-evaporador, mientras que a la fase acuosa se le agregó nuevamente diclorometano, repitiendo los pasos ya mencionados. Una vez realizados los dos lavados con diclorometano y concentrados, se recuperaron del matraz con metanol para ser colocados en viales de vidrio y concentrados a presión reducida en un roto-evaporador para su almacenamiento.

9. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los extractos bacterianos

Difusión en disco

Para confirmar que los extractos obtenidos contenían los compuestos con actividad antimicrobiana se realizaron pruebas con el método de difusión en disco tomado de JanakiDevi *et al.* (2013), se inocularon las cepas blanco (patógenos y productores de biopelícula) en medio sólido Müller Hilton y Agar marino, respectivamente. Posteriormente, se utilizaron discos de papel filtro Whatman no.1 con un diámetro de 6mm. A los discos se le impregnaron 20µL del extracto a una concentración de 1mg/mL. Estos fueron colocados con pinzas estériles en las cajas Petri previamente inoculadas y fueron refrigerados por 1h. Posteriormente, éstas fueron incubadas a 28°C por 24 y 48 h para evaluar la presencia de halos de inhibición alrededor del disco.

Microdilución en placas de poliestireno: inhibición de crecimiento

Con el fin de tener información más precisa se realizaron pruebas en placas de poliestireno, los extractos fueron ajustados a una concentración de 1mg/mL los cuales fueron diluidos con metanol. Se tomaron de cada extracto 100µL de la solución y fueron colocados en los pozos de las placas de poliestireno, éstas se dejaron a temperatura ambiente por 12 horas para evaporar el disolvente. Pasado el tiempo, la microplaca fue esterilizada mediante luz UV por 30 minutos. A continuación, se agregaron blancos (caldo marino sin inocular) y controles negativos (caldo inoculado) y positivos (antibióticos: estreptomycin y ampicilina a una concentración de 1mg/mL) cada uno por triplicado.

Antes de la realización del experimento las bacterias blanco se dejaron incubando en caldo marino o Müller Hilton (dependiendo de la cepa) por 24 h y en agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo, el cultivo bacteriano fue diluido con el método de Amsterdam (Hellio *et al.*, 2015) para obtener una densidad bacteriana de 1×10^8 células por mililitro.

Del cultivo bacteriano ajustado a la densidad mencionada anteriormente, se tomaron 100µL y se agregó en cada uno de los pozos de la microplaca que ya contenían los extractos bacterianos y controles. Después, la microplaca se incubó a 35°C por 48 h. Posterior a esto,

se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de placas para determinar las lecturas de inhibición de crecimiento bacteriano.

Microdilución en placas de poliestireno: inhibición de adherencia

Una vez realizada la lectura de inhibición de crecimiento bacteriano, se prosiguió a realizar las lecturas de inhibición de la adhesión (biopelícula). Esto se realizó retirando todo el medio de la microplaca trabajada con anterioridad y enjuagándola con agua destilada estéril para remover las partículas no adheridas a la placa y se dejaron secar a temperatura ambiente. A la microplaca seca se le agregaron 100µL de cristal violeta al 1% y se dejó reposar por 20 minutos para después retirar la solución y realizar varios lavados con agua destilada estéril, retirando, la mayor cantidad de colorante posible no adherido a los pozos. Luego se agregó 100µL de etanol al 70% y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

10. Concentración Mínima Inhibitoria

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) definida como la concentración mínima necesaria para producir la inhibición del crecimiento bacteriano, se realizó mediante un stock del extracto bacteriano a una concentración de 1mg/mL. De este extracto se hicieron diluciones de 100, 50, 10, 5 y 1µg/mL, siguiendo la metodología previamente mencionada realizada con microplacas para la lectura de inhibición de crecimiento y biopelícula.

11. Análisis de efectividad de los ensayos de inhibición de crecimiento y biopelícula

Para determinar el efecto de los compuestos de los extractos bacterianos en la inhibición del crecimiento y formación de biopelícula, se tomó la fórmula realizada por Martínez-Díaz (2010):

$$PF = \frac{BFC}{C} \times 100\%$$

C

$$PI = 100 - PF$$

dónde: PF = Porcentaje de formación; PI = Porcentaje de inhibición; C = Biopelícula formada por la cepa pura sin adición de compuestos (control negativo); y BFC = Resultado de biopelícula formada en presencia del compuesto.

Los resultados se evaluaron con las lecturas de densidad óptica en el espectrofotómetro (620 nm lecturas de crecimiento y 595 nm lecturas de adhesión) y fueron expresadas en porcentajes de inhibición, ya que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos bacterianos, donde a mayor porcentaje mejores resultados inhibitorios.

Resultados

1. Aislamiento y caracterización morfológica

Las bacterias aisladas fueron clasificadas con base en el sustrato de obtención teniendo un total de 137 cepas, de las cuales 53 correspondieron a las macroalgas, 53 al sedimento y 31 de agua (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de cepas aisladas por sitios y por sustratos (alga, sedimento y agua)

Sitio de muestreo	Tipo de muestra	Total de cepas
La Manzanilla	<i>P. gymnospora</i>	18
	<i>J. tenella</i>	17
	Agua	16
	Sedimento	22
Isla Isabel	<i>P. gymnospora</i>	18
	Agua	15
	Sedimento	31
	Total general	137

En relación con las características morfológicas observadas se pudo establecer que el 57% de las cepas fueron de un tamaño pequeño y forma redondeada (86%), con colonias elevadas (54%) y planas (36%), presentando en su mayoría falta de pigmentación (blanco, crema, transparente), y obteniendo ~10% con coloraciones amarillas y naranjas, con superficies brillantes y opacas (Figura 8).

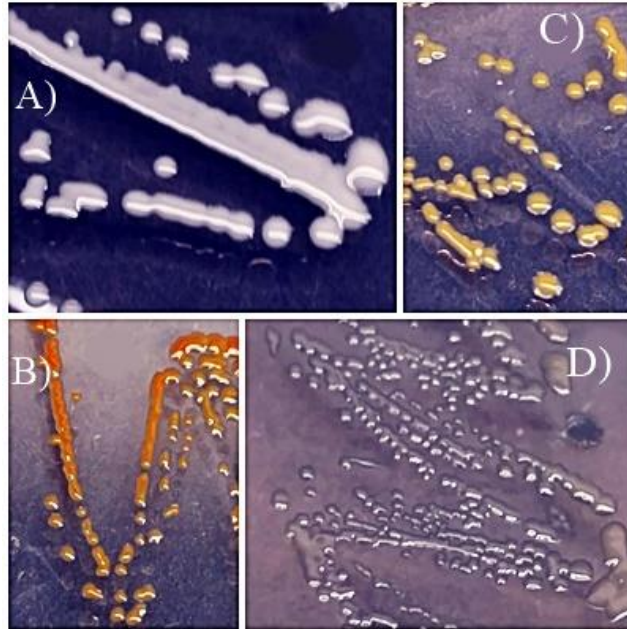


Figura 8. Aislados bacterianos con diferentes características morfológicas y crecimiento. A) cepa PGI2.2, B) cepa SI1.5, C) cepa PGM2.3 y D) cepa PGM2.6.

2. Caracterización bioquímica

Se realizaron un total de 11 pruebas bioquímicas con el fin de determinar la capacidad metabólica de cada cepa. De las 137 cepas aisladas se obtuvo un 84% de bacterias Gram negativas y un 16% de bacterias Gram positivas, siendo los bacilos la forma celular más recurrente con un 50%, mientras que las bacterias con morfología de cocos aparecieron en un 19%. Los resultados generales se presentan en el Cuadro 2.

Con los resultados se pudo establecer que de las 137 cepas bacterianas 100 fueron capaces de crecer en el medio selectivo MacConkey. Sin embargo, solo 44 de ellas fueron capaces de fermentar lactosa. Algo bastante similar ocurrió con el medio selectivo TCBS para *Vibrio* donde, sólo una cepa pudo fermentar la sacarosa a pesar de que crecieron 46 cepas. Al trabajar con cepas aisladas del ambiente marino se puede esperar la resistencia a concentraciones de salinidad más alta de las de su medio natural como ocurrió en los resultados de este trabajo. No obstante, se pudo apreciar una gran capacidad de adaptación a medios no salinos, donde 85 cepas crecieron en ausencia de sal, cabe mencionar que en algunos de los casos el crecimiento se veía disminuido o muy poco concentrado.

Cuadro 2. Desglose de porcentajes de cepas que dieron positivo para cada una de las pruebas bioquímicas realizadas.

Pruebas bioquímicas	Porcentaje de cepa positivo
Oxidasa	56%
Catalasa	85%
Movilidad	88%
Salinidad 0%	62 %
6%	93%
8%	85%
MacConkey	45%
TCBS	35%
Facultativa	53%
Fermentadora	28%
Oxidativa	10%
Inerte	9%
Fermentadora de sacarosa	1%
Fermentadora de lactosa	32%
Rojo de metilo	44%
Voges proskauer	19%
Indol	4%
Gram Negativas	79%
Gram Positivas	21%
cocos	19%
bacilos	50%
cocobacilos	30%
espirilo	1%

En cuanto a la identificación de las cepas mediante las pruebas bioquímicas, para la mayoría se pudo llegar a determinar al nivel de Familia, sin embargo, en algunos casos solo se pudo llegar a identificar a nivel de Orden. La clasificación bacteriana se divide en bacterias Gram negativas y positivas. En el caso de las Gram negativas, el grupo que tuvo mayor representatividad en las muestras fue la Familia Vibrionaceae con un 35%, seguido del Orden Enterobacterales, siendo las familias con menor representatividad: Morganellaceae, Spirillaceae y Halomonadaceae con un 2% cada una, identificando la presencia de 10 Familias y un Orden en todas las muestras obtenidas (Figura 9).

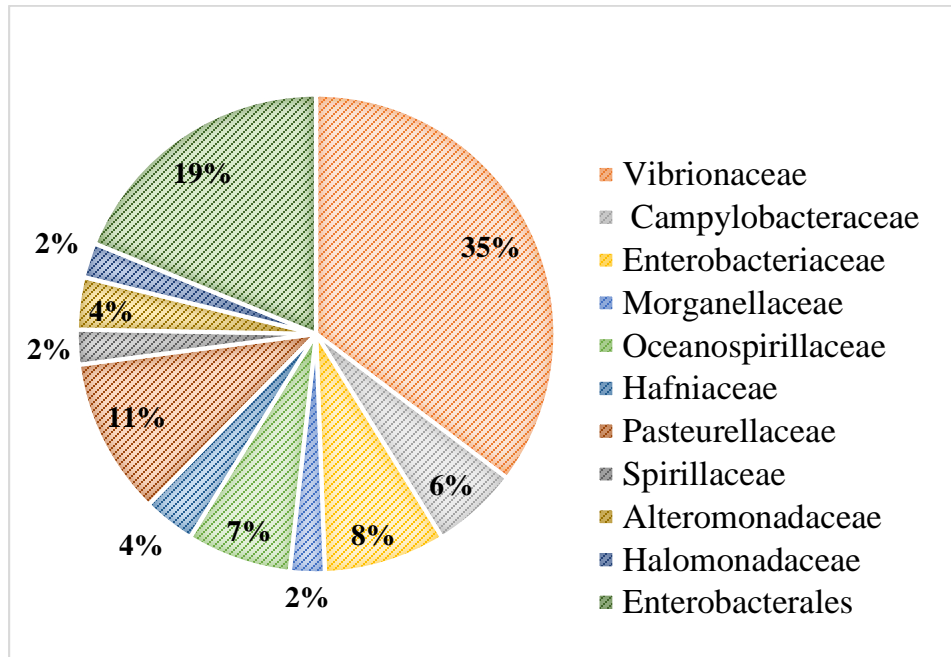


Figura 9. Porcentajes de aparición de las bacterias Gram negativas identificadas mediante pruebas bioquímicas utilizando el Manual de Bergey's.

En el caso de las bacterias Gram positivas se pudo observar que la Familia con mayor representatividad fue Bacillaceae con un 43% de presencia, seguida de Rarobacteraceae con un 14% y teniendo la menor presencia de Micrococcaceae con tan solo un 4% (Figura 10).

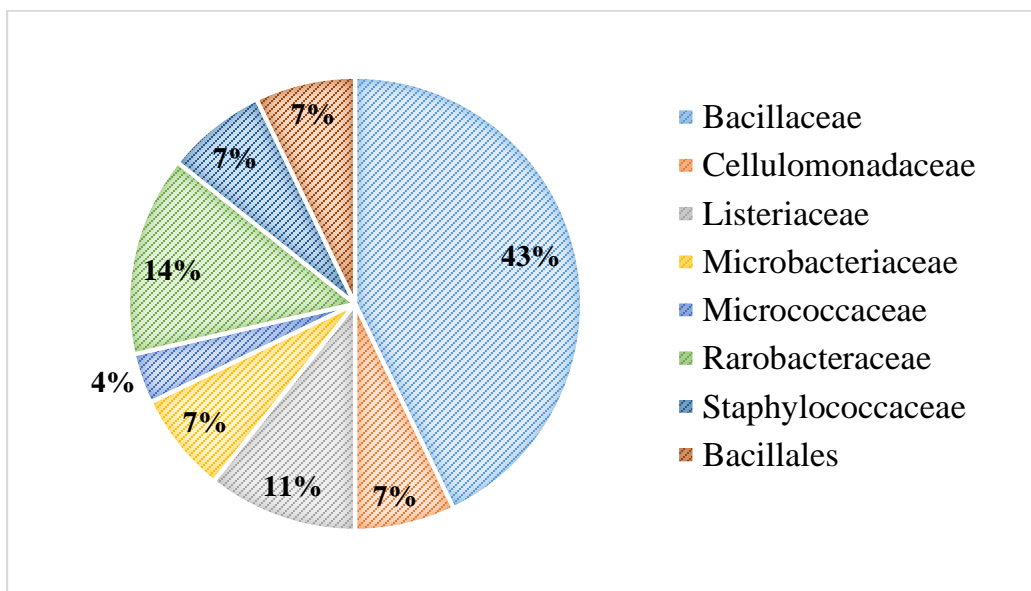


Figura 10. Porcentajes de aparición de las bacterias Gram positivas identificadas mediante pruebas bioquímicas utilizando el Manual de Bergey's.

3. Ensayos de actividad biológica

Los ensayos de actividad solo fueron realizados con las bacterias aisladas de algas y sedimentos de ambos sitios de muestreo.

En un primer ensayo preliminar frente a las bacterias formadoras de biopelícula, 26 cepas mostraron actividad, de las cuales 12 fueron aisladas de macroalgas y 14 de sedimento. En relación a lo encontrado en los ensayos frente a bacterias patógenas para humanos, el número de cepas activas fue similar, encontrando, 14 aislados de macroalgas y 10 de sedimento. No obstante, en los ensayos posteriores no se pudo reproducir el mismo resultado para todas las cepas. Por lo tanto, solo fueron consideradas aquellas bacterias que mantuvieron la actividad tanto en los ensayos con el método de difusión en pozo, como mediante el método Cross Streak. En total se seleccionaron 12 cepas con actividad antibacteriana tanto frente a patógenos humanos como a cepas formadoras de biopelícula, de las cuales ocho fueron aisladas de macroalgas y cuatro de sedimento.

En el caso de la inhibición frente a bacterias formadoras de biopelícula solo se presentó actividad frente a cinco de éstas cepas, las cuales fueron: *Alteromonas mediterranea* (11M), *Aestuariibacter* sp. (10D) y *Alteromonas macleodii* (7A, 9A y 12M). La cepa que tuvo actividad frente al mayor número de bacterias patógenas fue la cepa PGI2.2 perteneciente a la familia Rarobacteraceae, mientras que las cepas que presentaron mayor halo de inhibición fueron: Cellulomonadaceae (PGI1.3) con 9 mm frente a *A. mediterranea* (11M), Rarobacteraceae (PGI2.2) y Bacillaceae (PGI2.4) con halos de inhibición de 9 y 8 mm, respectivamente, frente a la cepa *A. macleodii* (12M). Estos resultados fueron obtenidos con el método de difusión en pozo (Figura 11).

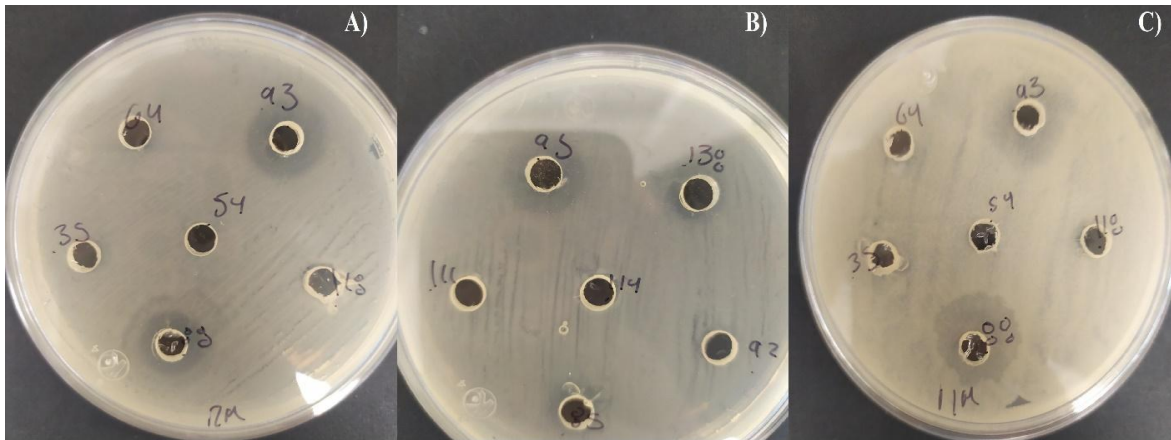


Figura 11. Halos de inhibición de las cepas formadoras de biopelícula *A. macleodii* y *A. mediterranea* producidos por las cepas: A) Rarobacteraceae (PGI2.2), B) Bacillaceae (PGI2.4), C) Rarobacteraceae (PGI2.2) y Cellulomonadaceae (PGI1.3) obtenidos con la técnica de difusión en pozo.

Mientras que con el método Cross Streak la que tuvo mayor inhibición fue la cepa Vibrionaceae (SI3.3) frente a la bacteria *Aestuariibacter* sp. con una zona de inhibición de 26 mm, seguido de la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) con 7 mm frente a *A. mediterranea* (11M) (Figura 12, Cuadro 3).

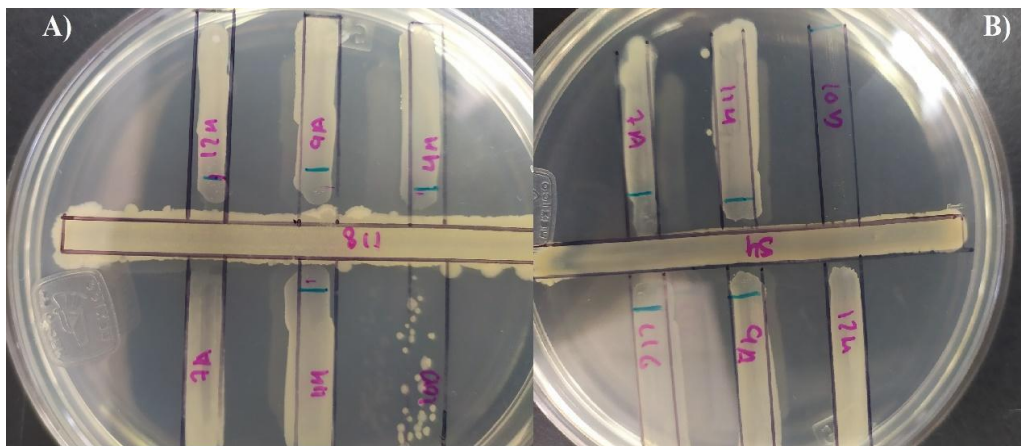


Figura 12. Inhibición de crecimiento de las cepas productoras de biopelícula enfrentadas a las cepas A) Vibrionaceae (JTM3.2) y B) Vibrionaceae (SI3.3) con el método Cross Streak.

Cuadro 3. Promedio de la zona y/o halo de inhibición de crecimiento (mm) de las cepas formadoras de biopelícula enfrentadas a las cepas aisladas de macroalgas y sedimento con el método de difusión en pozo (en negritas) y el método Cross Streak (números en color negro).

Cepas productoras de biopelícula										
Cepas bacterianas	<i>Alteromonas mediterranea</i> (11M)		<i>Aestuariusibacter</i> sp. (10D)		<i>Alteromonas macleodii</i> (7A)		<i>Alteromonas macleodii</i> (9A)		<i>Alteromonas macleodii</i> (12M)	
Vibrionaceae (SI1.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (SI3.3)	-	-	-	26	-	-	-	5	-	-
Campylobacteraceae (SM1.2)	-	-	-	4	3	-	-	-	-	-
Listeriaceae (SM3.7)	6	3	-	-	-	-	4	-	3	5
Cellulomonadaceae (PGI1.3)	9	-	3	-	-	-	4	-	6	-
Pasteurellaceae (PGI2.1)	-	2	-	-	-	-	-	4	-	2
Rarobacteraceae (PGI2.2)	6	-	3	-	3	-	4	-	9	-
Bacillaceae (PGI2.4)	7	-	-	-	-	-	4	-	8	-
Vibrionaceae (JTM2.3)	-	4	-	2	-	-	-	4	-	3
Pasteurellaceae (JTM2.6)	2	3	-	2	3	-	-	6	-	-
Vibrionaceae (JTM3.2)	-	7	-	-	-	4	-	5	-	3
Enterobacterales (PGM3.6)	6	-	-	-	-	-	4	-	3	-

En el caso de las cepas patógenas para humanos se obtuvo un menor número de cepas que fueron inhibidas por los aislados de las macroalgas y sedimentos. Mediante la técnica de difusión en pozo, la cepa que produjo el mayor halo de inhibición de *S. aureus* fue Rarobacteraceae (PGI2.2) con 4 mm de diámetro. En el caso de la actividad observada con el método Cross Streak se encontró que un mayor número de cepas aisladas de las macroalgas y sedimentos inhibieron el crecimiento de la cepa patógena *S. epidermidis*, siendo las cepas Vibrionaceae (SI1.4), Rarobacteraceae (PGI2.2), Bacillaceae (PGI2.4) las que produjeron las mayores zonas de inhibición con 27 mm y 24 mm (Figura 13).

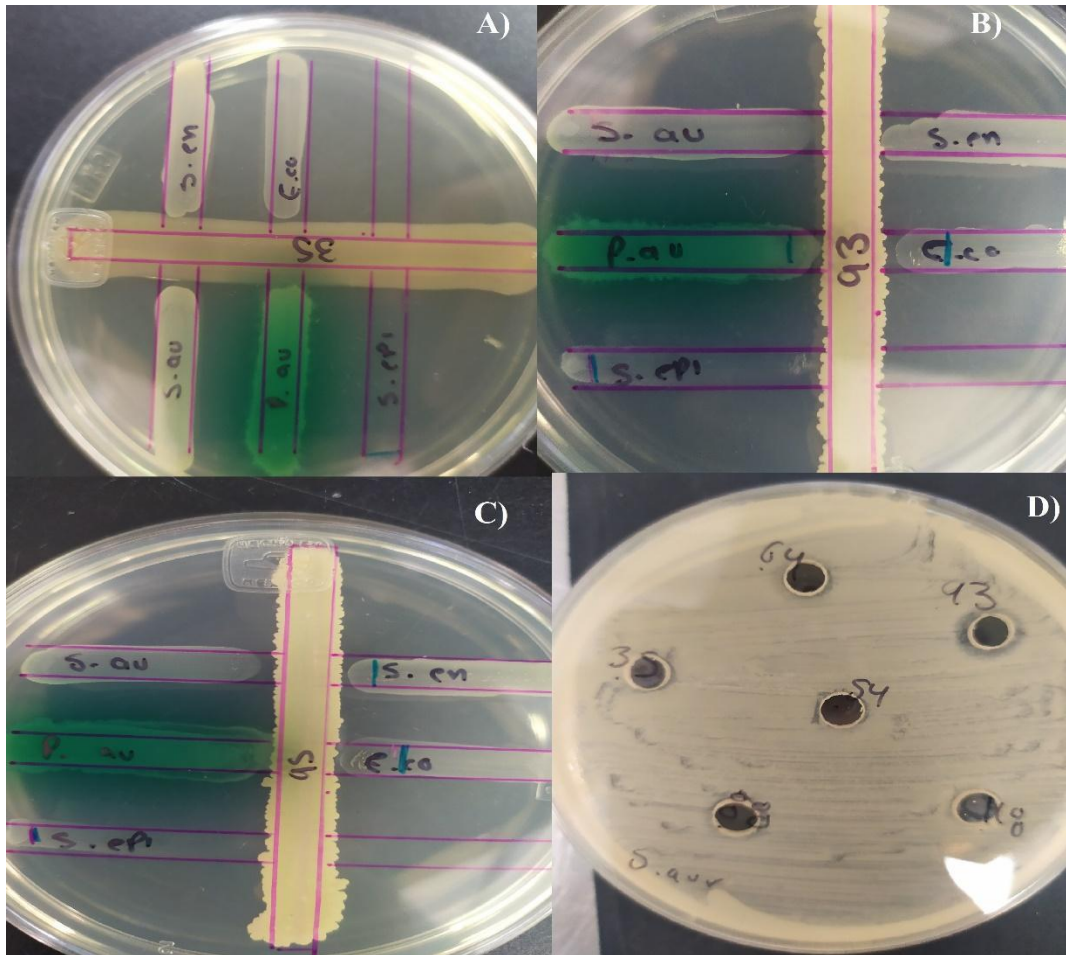


Figura 13. Inhibición de crecimiento de las cepas patógenas para humano enfrentadas a los aislados: A) Vibrionaceae (SI1.4), B) Rarobacteraceae (PGI2.2) y C) Bacillaceae (PGI2.4) frente a *S. epidermidis* con el método Cross Streak. y D) Rarobacteraceae (PGI2.2) frente a *S. aureus* con el método de difusión en pozo.

El método Cross Streak mostró mayores zonas de inhibición en comparación con el método de difusión en pozo, siendo *S. epidermidis* la cepa que presentó mayor sensibilidad a la inhibición, presentando, hasta 24 mm de inhibición al enfrentarla a las cepas Rarobacteraceae (PGI2.2) y Bacillaceae (PGI2.4) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de las zonas y/o halos de inhibición (mm) de las cepas patógenas para humanos enfrentadas a las bacterias aisladas de las macroalgas y sedimentos con el método de difusión en pozo (en negritas) y el método Cross Streak.

Cepas patógenas para humanos								
Cepas bacterianas	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Vibrionaceae (SI1.4)	-	-	-	-	-	27	-	-
Vibrionaceae (SI3.3)	-	-	-	-	-	17	-	-
Campylobacteraceae (SM1.2)	-	-	3	-	2	10	-	4
Listeriaceae (SM3.7)	-	5	-	-	-	-	-	5
Cellulomonadaceae (PGI1.3)	-	7	-	-	-	15	-	3
Pasteurellaceae (PGI2.1)	-	5	-	-	-	9	-	3
Rarobacteraceae (PGI2.2)	-	-	4	-	-	24	-	-
Bacillaceae (PGI2.4)	-	6	3	-	-	24	-	-
Vibrionaceae (JTM2.3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Pasteurellaceae (JTM2.6)	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (JTM3.2)	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacterales (PGM3.6)	-	5	3	-	-	16	-	4

4. Ensayo de actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los extractos bacterianos

Se realizaron los extractos crudos de los cultivos de las 12 cepas seleccionadas con anterioridad: el extracto metanol-acetato del sobrenadante del cultivo de Vibrionaceae (JTM3.2) mostró inhibición de crecimiento de las cinco cepas formadoras de biopelícula, con halos de inhibición de 25 mm para *A. macleodii* (7A) y 22 mm para *Aestuariibacter* sp. (10D), mientras que los extractos obtenidos con diclorometano solo inhibieron a la cepa *A. macleodii* (12M), mostrándose, el mayor halo de inhibición con el extracto crudo del cultivo de la cepa Pasteurellaceae (JTM2.6) con 4 mm de diámetro (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) producidos por los extractos crudos de los cultivos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos con los dos solventes utilizados: M/A (Metanol-Acetato de etilo) (en negritas) y DCM (diclorometano), frente a bacterias formadoras de biopelícula.

Cepas productoras de biopelícula										
	M/A	DCM	M/A	DCM	M/A	DCM	M/A	DCM	M/A	DCM
Cepas bacterianas	<i>Alteromonas mediterranea</i> (11M)		<i>Alteromonas macleodii</i> (12M)		<i>Aestuariibacter sp.</i> (10D)		<i>Alteromonas macleodii</i> (7A)		<i>Alteromonas macleodii</i> (9A)	
Vibrionaceae (SI1.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (SI3.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campylobacteraceae (SM1.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeriaceae (SM3.7)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Cellulomonadaceae (PGI1.3)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pasteurellaceae (PGI2.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rarobacteraceae (PGI2.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillaceae (PGI2.4)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (JTM2.3)	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Pasteurellaceae (JTM2.6)	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (JTM3.2)	7	-	11	-	22	-	6	-	25	-
Enterobacterales (PGM3.6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En cambio, en el caso de la actividad frente a bacterias patógenas para humanos, el extracto metanol-acetato del cultivo de la cepa Vibrionaceae JTM3.2 fue también el que mostró el mayor halo de inhibición para *E. coli* con 6 mm y 4 mm para *S. epidermidis*, mientras que con los extractos obtenidos con diclorometano se obtuvieron halos de inhibición de menor tamaño (Cuadro 6).

Con los solventes utilizados para la extracción de los compuestos activos se obtuvieron diferentes resultados, encontrando que el diclorometano no fue tan efectivo para extraer estos compuestos, ya que solo mostraron inhibición de crecimiento de *A. macleodii* (12M). Aunque los halos de inhibición fueron muy pequeños, se pudieron recuperar los metabolitos de algunas cepas que ya no mostraron actividad con el extracto metanol-acetato.

Cuadro 6. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) producidos por los extractos crudos obtenidos de los cultivos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos con los dos solventes utilizados: M/A (metanol/acetato) (en negritas) y DCM (diclorometano), frente a patógenos para humanos

Cepas patógenas para humanos						
	M/A	DCM	M/A	DCM	M/A	DCM
Cepas bacterianas	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Vibrionaceae (SI1.4)	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (SI3.3)	-	-	-	-	-	2
Campylobacteraceae (SM1.2)	-	-	-	-	-	-
Listeriaceae (SM3.7)	-	-	-	-	-	-
Cellulomonadaceae (PGI1.3)	-	-	-	-	-	2
Pasteurellaceae (PGI2.1)	-	-	-	-	-	-
Rarobacteraceae (PGI2.2)	-	-	-	2	-	-
Bacillaceae (PGI2.4)	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (JTM2.3)	-	-	-	-	-	-
Pasteurellaceae (JTM2.6)	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae (JTM3.2)	6	-	4	-	-	-
Enterobacterales (PGM3.6)	-	-	-	-	-	-

5. Bioensayos en placas de poliestireno: inhibición de crecimiento y adherencia

Frente a cepas patógenas para el humano

En este ensayo se evaluó tanto la inhibición del crecimiento como de la formación de biopelículas. En la Figura 14 se puede observar que nuevamente el extracto que mostró mayor porcentaje de inhibición de crecimiento fue el obtenido del cultivo de la cepa Vibrionaceae (JTM3.2), inhibiendo en un 55% el crecimiento de *S. aureus* (Figura 14A), *S. epidermidis* en un 74% (Figura 14B), y *E. coli* con el 59% (Figura 14C), siendo el único extracto que causó inhibición del crecimiento de este último patógeno (*E. coli*).

En cuanto a la formación de biopelículas evaluada con la inhibición de la adherencia de las cepas, ocho de los extractos fueron capaces de inhibir entre un 36 a 46% la formación de biopelícula de la cepa *S. aureus* (Figura 14A). Para *S. epidermidis*, solo tres extractos fueron capaces de disminuir el porcentaje de adhesión de la cepa, el extracto de Vibrionaceae (JTM3.2) en este caso no logró inhibir la formación de la biopelícula, solo el crecimiento (Figura 14B). Frente a *E. coli*, ninguno de los extractos logró tener efecto sobre la formación de la biopelícula (Figura 14C). Con estos resultados se pudo observar que algunos extractos son capaces de inhibir la adherencia o formación de las biopelículas sin inhibir el crecimiento de la cepa (Figura 14).

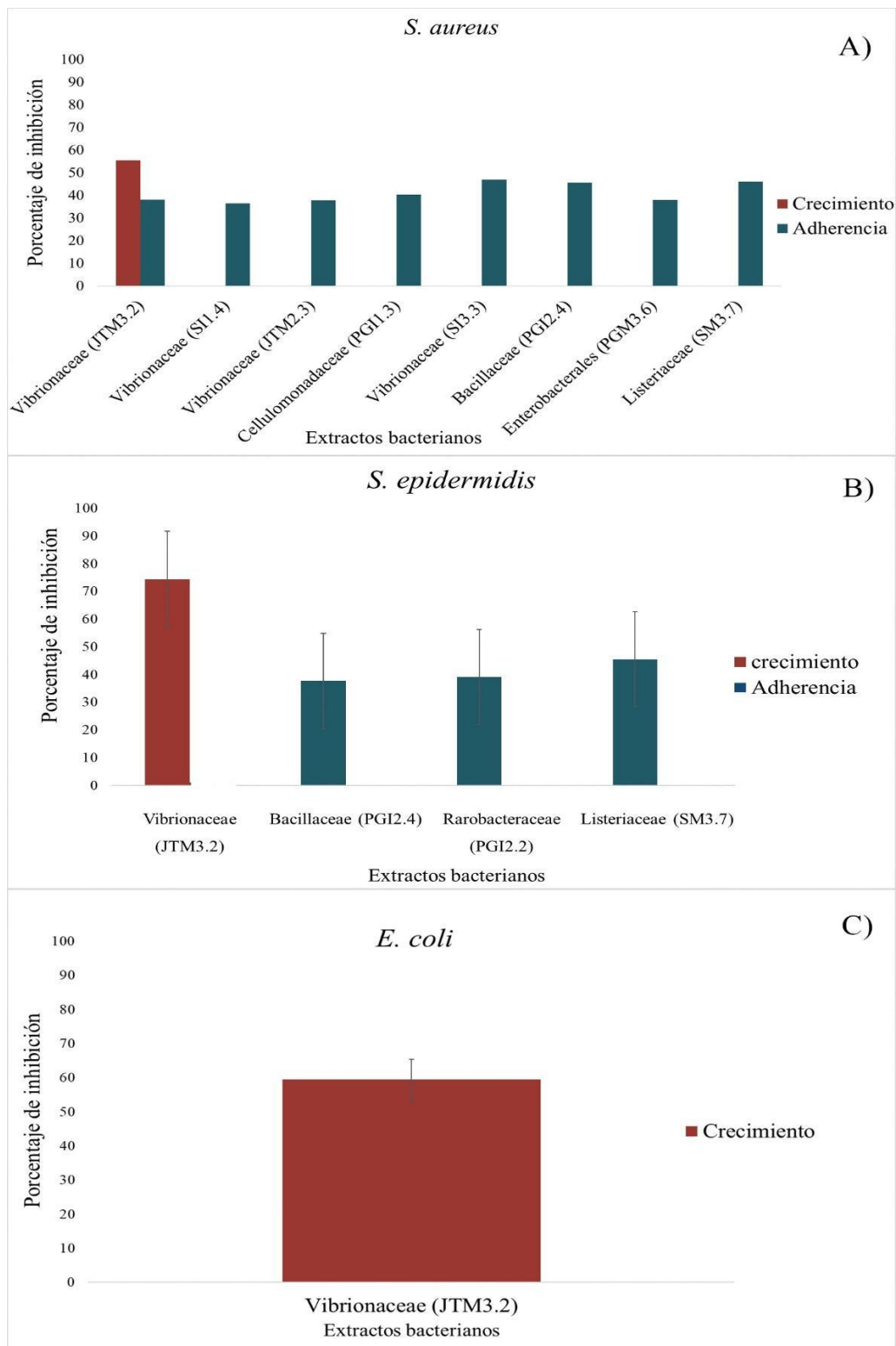


Figura 14. Porcentaje de inhibición y adherencia (formación de biopelícula) de las bacterias patógenas para humanos a) *Staphylococcus aureus*, b) *Staphylococcus epidermidis*, c) *Escherichia coli*, frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.

Frente a cepas marinas implicadas en el proceso de biofouling

En el caso de los extractos frente a las bacterias marinas formadoras de biopelícula se observó la inhibición de crecimiento así como de adherencia de *A. macleodii* (9A) con tres extractos, donde el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento ocurrió con el extracto de la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) con un 49%, inhibiendo también la adherencia en menor porcentaje con un 37%. Por otra parte, el extracto Vibrionaceae (SI3.3) también presentó inhibición del crecimiento y la adherencia con un 48% y un 26% respectivamente. La cepa *A. macleodii* (9A) fue la más sensible a los extractos bacterianos, se encontraron nueve extractos capaces de inhibir su adherencia todos por debajo del 50 por ciento de inhibición, siendo el extracto bacteriano Vibrionaceae (SI1.4) el que presentó el mayor porcentaje con un 47% (Figura 15A).

Por otra parte, con la cepa *A. macleodii* (12M) solo el extracto Vibrionaceae (JTM 3.2) fue capaz de causar su inhibición, tanto de crecimiento como de adherencia con un 31 y 48%, respectivamente (Figura 15B). Mientras para la cepa *A. macleodii* (7A) se observó la inhibición con el mismo extracto bacteriano antes mencionado (Vibrionaceae JTM3.2), pero en este caso se presentó solo la inhibición del crecimiento de la cepa con un porcentaje del 44% (Figura 15C).

Aunque se trata de la misma especie bacteriana (*A. macleodii*), se pueden observar que los diferentes morfotipos mostraron diferencias en cuanto a la inhibición, siendo la cepa *A. macleodii* (9A) la que presentó la mayor sensibilidad a los diferentes extractos bacterianos. Aunque, se encontró que el extracto Vibrionaceae (JTM3.2) tuvo efecto frente a las tres cepas.

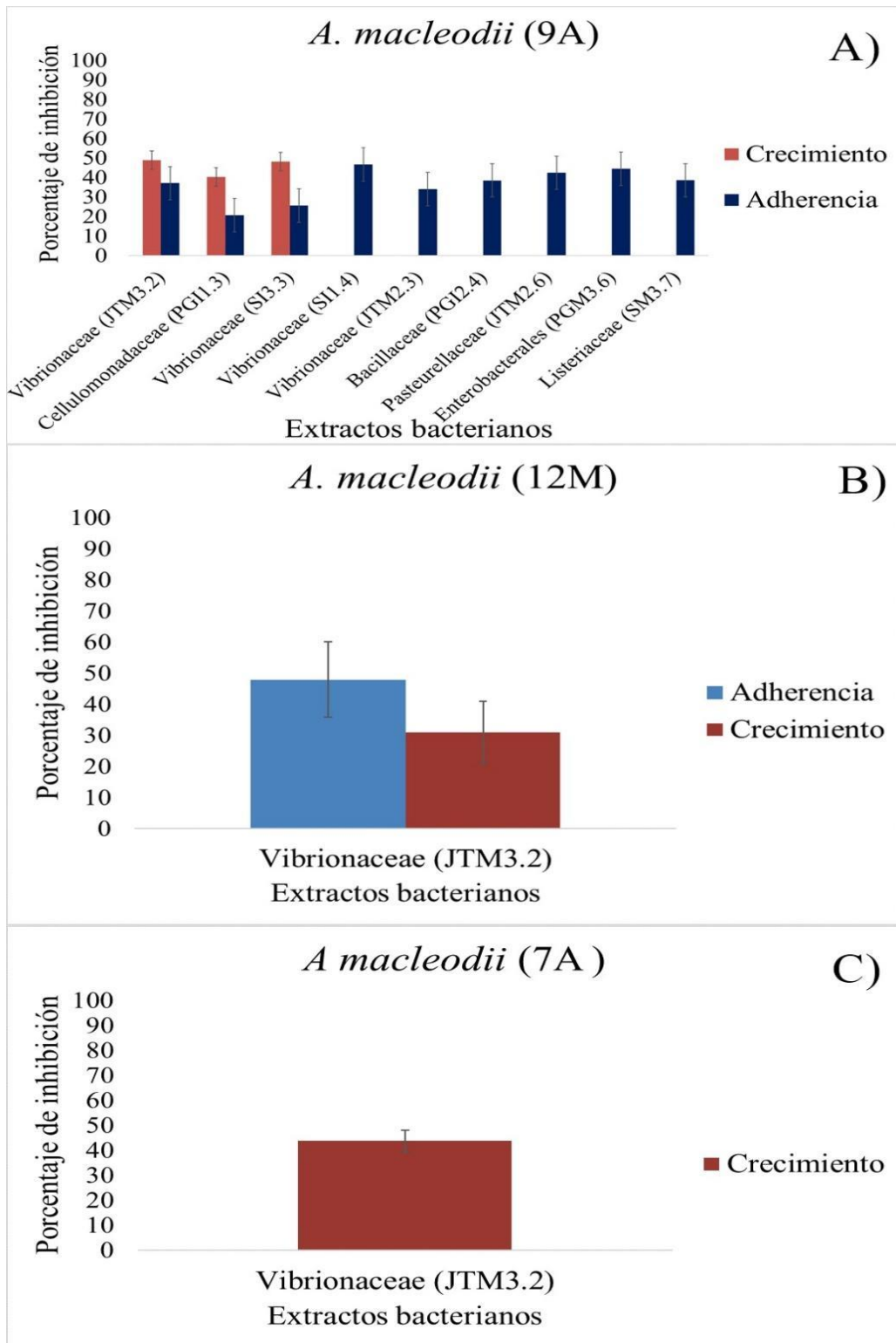


Figura 15. Porcentaje de inhibición y adherencia de las bacterias formadoras de biopelícula A) *Alteromonas macleodii* (9A), B) *Alteromonas macleodii* (12M), C) *Alteromonas macleodii* (7A), frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.

Para la cepa *Aestuariibacter sp.* (10D) ningún extracto fue capaz de inhibir su crecimiento. A pesar de este resultado, cuatro extractos inhibieron su adherencia, donde el extracto de la cepa Bacillaceae (PGI2.4) presentó el mayor porcentaje de inhibición con un 43% (Figura 16A). Por su parte, para la cepa *A. mediterranea* (11M) solo uno de los extractos Vibrionaceae (JTM3.2) fue capaz de disminuir el crecimiento, y adherencia con un 37 y 52%, respectivamente, mostrando mejores resultados para la inhibición de adherencia (Figura 16B).

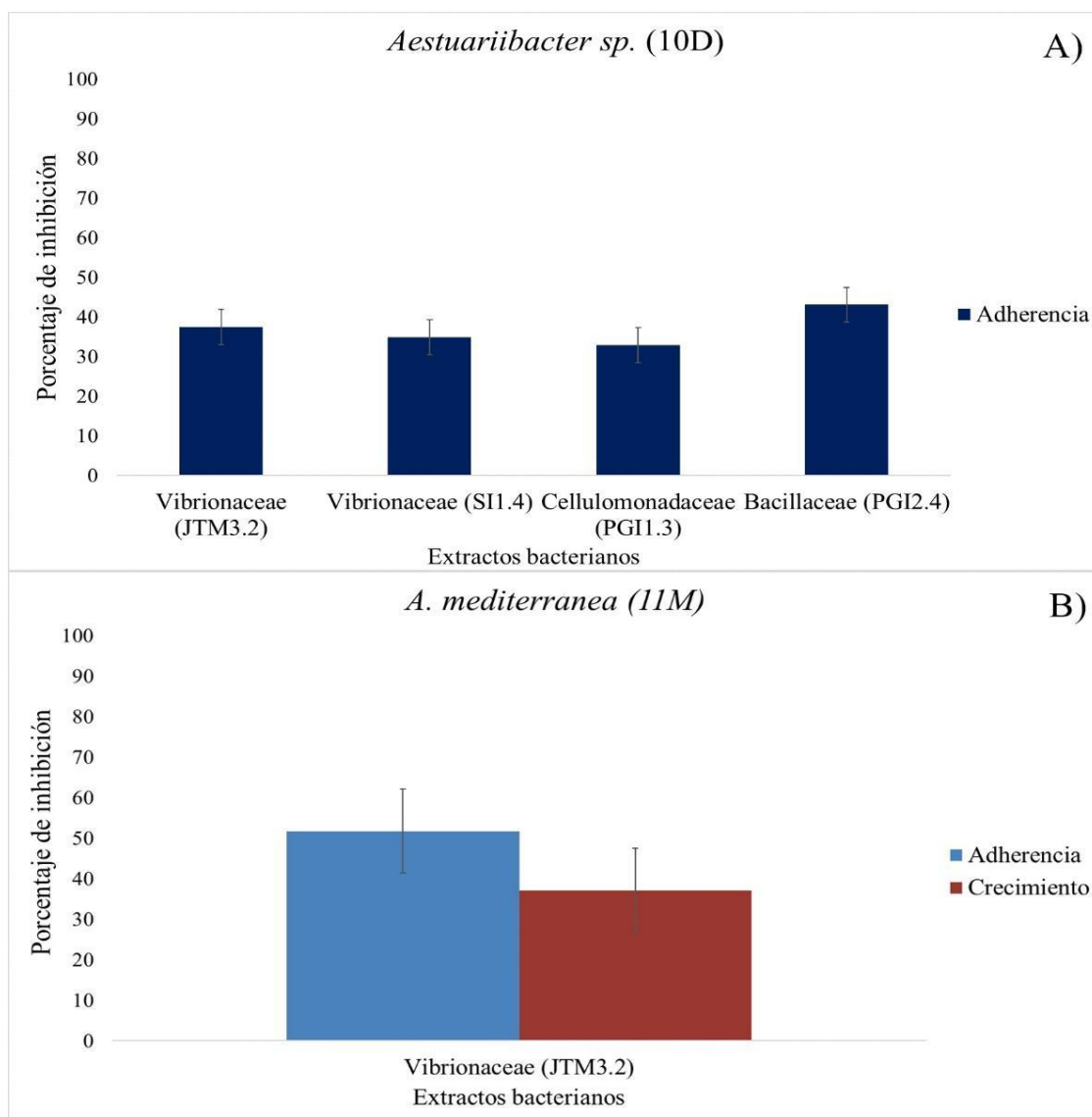


Figura 16. Porcentaje de inhibición y adherencia de las bacterias formadoras de biopelícula A) *Aestuariibacter sp.* (10D), B) *Alteromona mediterranea* (11M) frente a los extractos de las bacterias aisladas de algas y sedimentos.

De acuerdo con los resultados anteriores, la concentración mínima inhibitoria (CMI) solamente se determinó para aquellos extractos que mostraron una inhibición por arriba del 40%.

Como resultado de esta evaluación, se encontró que la mayoría de los extractos mantuvieron su actividad inhibitoria a concentraciones de 100 µg/mL, siendo la mayor concentración probada. Solo dos de los extractos de las cepas Listeriaceae (SM3.7) y Enterobacterales (PGM3.6) lograron inhibir a *S. epidermidis* y *A. macleodii* (9A), respectivamente, a la mínima concentración probada (1µg/mL) (Cuadro 7). El extracto de la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) mantuvo su actividad inhibitoria frente a cinco de las cepas blanco a una concentración de 100µg/mL. La cepa *A. macleodii* (9A) fue la cepa más sensible siendo inhibida por tres extractos en concentraciones de 100 y 1µg/mL.

Cuadro 7. Concentraciones mínimas inhibitorias (µg/mL) de los extractos de las bacterias que mostraron actividad frente a bacterias patógenas y productoras de biopelícula.

Extracto	<i>S. epidermidis</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (9A)	<i>Aestuariibacter sp.</i> (10D)	<i>Alteromonas mediterranea</i> (11M)	<i>Alteromonas macleodii</i> (12M)	<i>Alteromonas macleodii</i> (7A)
Listeriaceae (SM3.7)	1					
Cellulomonadaceae (PGI1.3)		100				
Bacillaceae (PGI2.4)			100			
Vibrionaceae (JTM3.2)	100	100		100	100	100
Enterobacterales (PGM3.6)		1				

En este trabajo se encontró que tanto en los sitios de La Manzanilla como en Isla Isabel se obtuvieron el mismo número de bacterias con capacidad inhibitoria antibacteriana (6 y 6), con actividad de al menos una cepa por cada sustrato estudiado (algas y sedimento) para las pruebas de actividad biológica (*Jania tenella* no estuvo presente en Isla Isabel). En el caso de La Manzanilla el alga de la que se obtuvo un mayor número de cepas con actividad biológica fue *Jania tenella* con un 50% (Figura 17A), mientras que en Isla Isabel del alga *Padina gymnospora* el 67% de las cepas fueron bioactivas (Figura 17B). Por otro lado, el

sedimento presentó el mismo porcentaje (33%) y mismo número de cepas activas (2) en cada sitio. No obstante, esto no ocurrió así para el alga *P. gymnospora* aunque estuvo presente en ambos sitios, se encontró un mayor número de bacterias activas (4) en Isla Isabel a comparación de las encontradas en La Manzanilla (1).

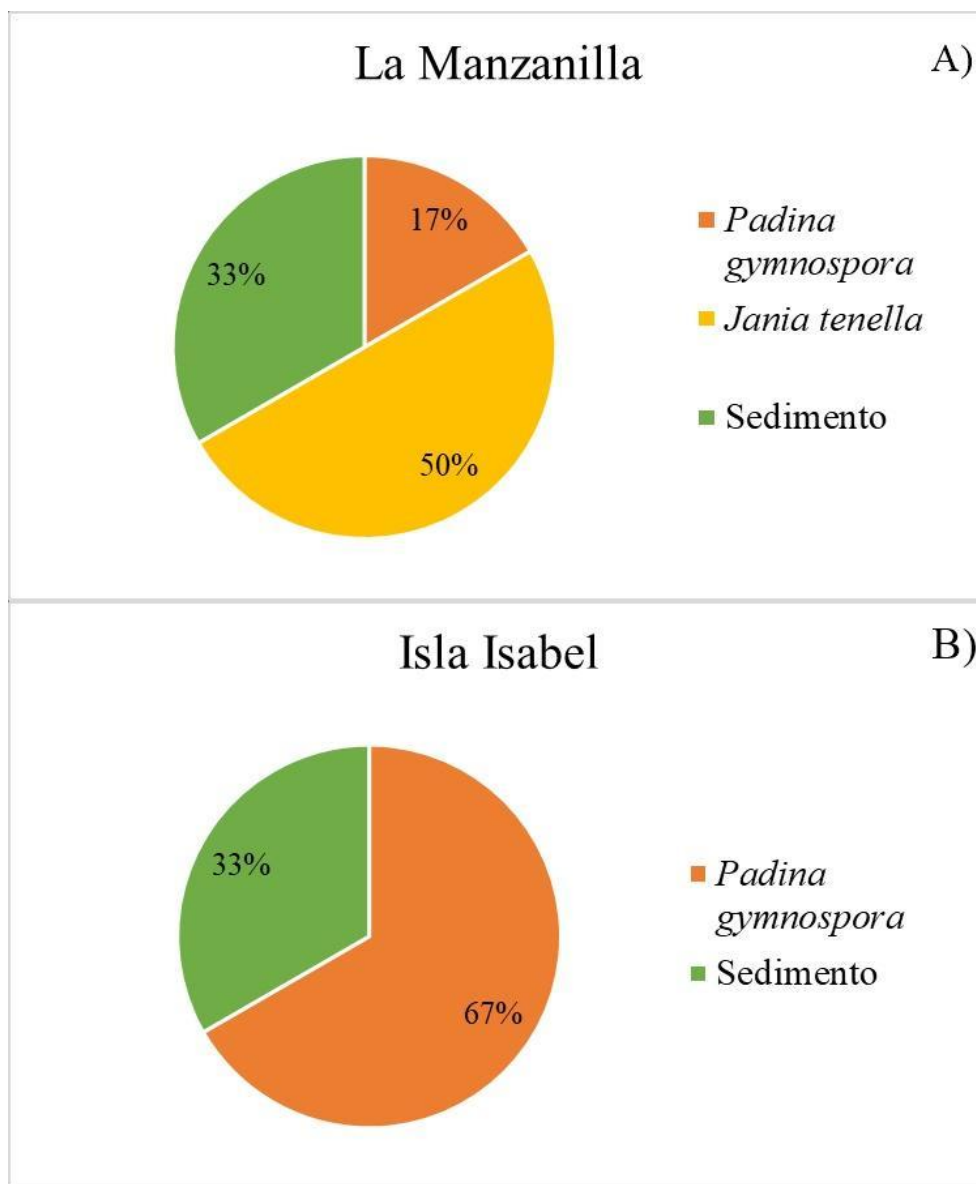


Figura 17. Porcentaje de cepas activas localizadas en *Padina gymnospora*, *Jania tenella* y sedimento en los diferentes sitios de muestreo: A) La Manzanilla y B) Isla Isabel.

En las muestras recolectadas en La Manzanilla se determinaron cinco familias diferentes, siendo Vibrionaceae la que presentó mayor porcentaje de cepas capaces de inhibir alguna de

las cepas probadas en este estudio con un 33% (Figura 18A), en Isla Isabel se obtuvo el mismo resultado con el mayor número de bacterias activas provenientes de la familia *Vibrionaceae* (Figura 18B). Sin embargo, se puede observar que cinco de las cepas que presentaron actividad biológica solo estuvieron en un sitio determinado como es el caso de la familia *Bacillaceae* aisladas de *P. gymnospora* en Isla Isabel.

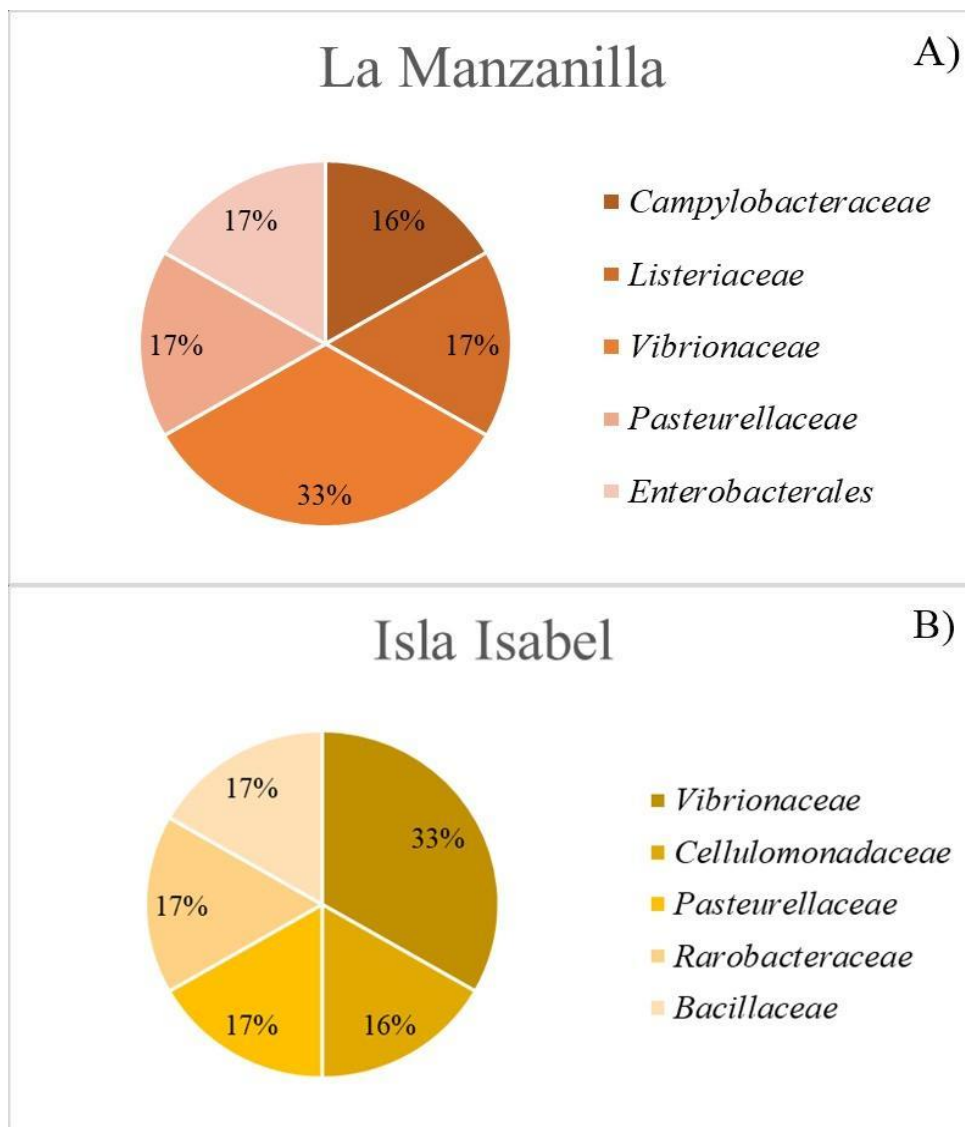


Figura 18. Porcentaje de familias que presentaron actividad biológica contra alguna de las cepas probadas en los sitios: A) La Manzanilla y B) Isla Isabel.

Discusiones

En distintos trabajos se ha encontrado la presencia de bacterias epífitas asociadas a las macroalgas, siendo en su mayoría bacterias Gram negativas (Lemos *et al.*, 1985; Villareal-Gómez *et al.*, 2010; Abdalhamed-Albakosh, 2014). De manera similar, en este trabajo el 84% de las bacterias obtenidas corresponden a Gram negativas. Además, se encontró que los filos Proteobacterias y Firmicutes, han sido también reportados en la superficie de algas verdes, pardas y rojas destacando las clases Gammaproteobacteria (alrededor del 50%), Alphaproteobacteria y Cyanobacterias (Simonato *et al.*, 2010; JanakiDevi *et al.*, 2013).

Las Proteobacterias son el grupo de bacterias Gram negativas más abundantes, tienen gran versatilidad fisiológica y morfológica lo que las hace adaptables a diferentes nichos, por lo que suelen ser comúnmente encontradas en ambientes acuáticos (Shin *et al.*, 2015; Stincone y Brandelli, 2020). En el presente trabajo dentro de este filo la clase más abundante fue Gammaproteobacteria, donde el orden Enterobacteriales y la familia Vibrionaceae fueron las que aparecieron con mayor frecuencia con un 19 y 35%, respectivamente. Estos taxones fueron también encontrados por Ali *et al.* (2012) quienes aislaron del alga *J. rubens* diversas familias pertenecientes al filo Proteobacterias, entre ellas la familia Vibrionaceae.

El filo Firmicutes está conformado por bacterias Gram positivas siendo el género *Bacillus* el mejor representado en este grupo. Los taxa de la familia Bacillaceae son bacterias con una gran resistencia debido a la producción de endosporas, lo que las hace resistentes a varios factores como el calor, fármacos, entre otras variables (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; Stincone y Brandelli, 2020). En este trabajo se encontró que la familia Bacillaceae fue de las más frecuentes con 43% del total de las bacterias Gram positivas aisladas, seguida por la familia Rarobacteraceae (14%) perteneciente al filo Actinobacteria. Diferentes autores han reportado la presencia del filo Firmicutes en aislados bacterianos de algas como: *Sargassum* sp., *Padina* sp. y *Ulva rigida*, destacando, las bacterias del género *Bacillus* (Ismail *et al.*, 2016; Lunggani *et al.*, 2018).

Las bacterias presentes en la superficie de las algas pueden llegar a producir metabolitos secundarios capaces de presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antibiopelícula,

anticancerígena, entre otras bioactividades (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010; Ismail *et al.* 2018; PeiHang *et al.*, 2018). Esto puede deberse en gran medida a la competencia por el espacio y a las adversidades ambientales en las que se encuentren e incluso con base en los requerimientos que necesite el hospedador.

La búsqueda de compuestos capaces de inhibir la actividad antimicrobiana y antibiopelícula se ha vuelto de gran importancia, ya que la resistencia bacteriana a fármacos cada vez es mayor. También, la formación de la biopelícula bacteriana presenta uno de los mayores problemas, ya que incrementa la resistencia bacteriana (Martínez-Díaz, 2010), afectando diversos ramos farmacéuticos como la dental (placa bacteriana) e incluso industrial siendo la formación de biopelícula la etapa inicial para el asentamiento de fouling marino sobre los sustratos sumergidos. Dobretsov y Qian (2002) han demostrado que algunas bacterias epífitas de las macroalgas pueden ayudarles a evitar la colonización de micro y macro organismos por la producción de metabolitos secundarios.

En este trabajo se pudieron encontrar sustancias capaces de inhibir la adhesión de bacterias formadoras de biopelícula, lo cual es de gran importancia, inhibiendo en algunos casos incluso el crecimiento de las mismas, como la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) frente a *Alteromonas macleodii* (12M). Por otro lado, se presentaron algunos casos donde se observó inhibición de adherencia sin verse afectado el crecimiento bacteriano. Sin embargo, esto podría ser beneficioso porque al no adherirse la cepa y formar la matriz polimérica extracelular de la biopelícula que les aporta varias ventajas de sobrevivencia (Martínez-Díaz, 2010), podrían ser eliminadas con mayor facilidad, ya que se ha visto que las bacterias que forman biopelícula son 1,000 veces más resistentes que las que permanecen en estado planctónico (Johnjulio *et al.*, 2012).

Aunque, en algunos trabajos se comenta que la mayoría de las bacterias productoras de metabolitos secundarios son pigmentadas (Lemos *et al.*, 1985), no es algo generalizado. En este trabajo, la mayoría de las cepas que presentaron actividad no mostraron pigmentos. Estos resultados son muy similares a lo publicado por Pimpliskar *et al.* (2017), quienes encontraron que sus aislados bacterianos presentaron efecto antagónico contra cepas patógenas aun siendo cepas no pigmentadas.

Existen diferentes metodologías con las que se ha podido detectar la capacidad bacteriana para producir la inhibición de algunas cepas patógenas, entre ellas: el método de difusión en pozo, difusión en disco, método de Cross Streak, con microdiluciones realizadas en medio líquido o microplacas. Sin embargo, en ciertas ocasiones se han dado casos en donde los resultados pueden variar dependiendo del método seleccionado (Ali *et al.*, 2016; Karthick y Mohanraju, 2018). Esto puede deberse a diferentes variantes como puede ser: la selección del medio de cultivo, la temperatura e incluso la cantidad de agar puede causar la falta de difusión de los metabolitos (Karthick y Mohanraju, 2018; Sánchez-Hinojosa *et al.*, 2018).

Por ello la importancia de probar diferentes métodos, como los que se llevaron a cabo en este trabajo (Cross Streak y difusión en pozo). El método de Cross Streak evidenció mayores zonas de inhibición bacteriana frente a la cepa patógena *Staphylococcus epidermidis*. Esto concuerda con lo realizado por Lertcanawanichakul y Sawangnop (2008) quienes trabajaron con cuatro especies de *Bacillus* y compararon los mismos métodos teniendo mejores resultados con el método de Cross Streak contra las cepas *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Ellos mencionan también que estos resultados pueden deberse a la presencia de metabolitos y bacteriocinas en las células bacterianas; por el contrario, con el uso y la obtención del sobrenadante utilizado en la técnica de difusión en pozo, se puede afectar los resultados e incluso llegar a perder las bacteriocinas presentes en la célula, generando resultados negativos. Otra de las causas que pueden hacer que el método de Cross Streak presente mayor inhibición puede ser la competencia directa de las cepas bacterianas, dando lugar a la producción de metabolitos secundarios (Pimpliskar *et al.*, 2017), siendo esto una de las bases primordiales para la producción de metabolitos secundarios.

Existen algunos casos en los que se ven influenciados también los resultados debido a las resiembras (Ali *et al.*, 2012), ya que las cepas van perdiendo éstas características productoras debido a la ausencia de competencia, e incluso por las características de siembra donde pueden intervenir la temperatura, el medio utilizado, el pH y la falta de nutrimentos. Tal como se ha mencionado en diferentes estudios en los que se ha reportado que alrededor del 40% de los microorganismos aislados pueden llegar a perder la producción de los compuestos (Arnold y Aiqi Fang, 2000; Moreno-Herrera *et al.*, 2010). En este trabajo también se observó que algunas de las cepas dejaron de presentar actividad antibacteriana y antibiopelícula,

donde solo 12 cepas fueron capaces de producir y mantener la inhibición de al menos uno de los microorganismos probados, correspondiendo al 11% del total de los aislados bacterianos.

Se aislaron bacterias de la superficie de algas, sedimento y agua, sin embargo, las bacterias aisladas de agua no fueron probadas en los ensayos de actividad debido a la gran cantidad de cepas obtenidas. Por lo anterior, solo se trabajó con las cepas de las algas y sedimento ya que han destacado por su actividad inhibitoria, por otra parte, las bacterias aisladas de agua han mostrado tener poca actividad e incluso nula, como lo sugieren Suvega y Arunkumar (2014) quienes aislaron bacterias de agua marina y realizaron pruebas antimicrobianas sin obtener algún resultado. Lo anterior puede deberse a la falta de competencia por el espacio y nutrimentos que podrían ocasionar que las bacterias no sean capaces de producir metabolitos secundarios.

Con base en lo anterior, en este trabajo se obtuvo cepas con capacidad inhibitoria, tanto de los aislados bacterianos de las algas como de sedimento, siendo activas el 15% de las cepas aisladas de las algas, mientras que el 8% de las cepas activas provenían del sedimento, esto en proporción a las cepas totales aisladas por cada sustrato. Estos porcentajes son similares a los encontrados por Suvega y Arunkumar (2014) quienes aislaron 36 cepas bacterianas de algas y sedimentos marinos, de las cuales el 14% y 11% (algas y sedimentos respectivamente) presentaron actividad antibiótica.

En cuanto a los metabolitos secundarios reportados en la literatura, que han sido aislados de microorganismos, el 70% son provenientes de las Actinobacterias, un 20% de hongos, 7% de Firmicutes y entre el 1 - 2% de otras bacterias, siendo las principales las Proteobacterias (Stincone y Brandelli, 2020). Estos tres grupos de bacterias son considerados excelentes productores de metabolitos secundarios (JanakiDevi *et al.*, 2013). Entre las bacterias aisladas de las algas (*Jania* y *Padina*) se encontró que las bacterias Gram negativas representaban el mayor porcentaje de bacterias activas (58%), siendo las Proteobacterias el 75%, mientras que las bacterias Gram positivas representaron el 42% del total de las cepas activas, de las cuales 17% de bacterias son del filo Firmicutes, seguido del filo Actinobacteria con un 8%. Esto coincide con lo encontrado por Rebolledo-Corales (2016) quien obtuvo cinco cepas, las cuales mostraron actividad antimicrobiana, cuatro de ellas del grupo Gram negativas y solo una Gram positiva.

La familia que presentó el mayor porcentaje de cepas activas en el presente trabajo fue Vibrionaceae con un 50%, también se encontraron familias como Rhodobacteraceae y Bacillaceae, que han presentado actividad anteriormente, Ali *et al.* (2012) encontraron los géneros, *Paracoccus* (familia Rhodobacteraceae) y *Bacillus* (familia Bacillaceae) en el alga *Padina pavonica* los cuales presentaron actividad antibacteriana. Así mismo, la cepa Rhodobacteraceae (PGI2.2) presentó actividad frente a todas las cepas productoras de biopelícula, con un máximo de inhibición de 9 mm frente a la cepa *Alteromonas macleodii* (12M). No obstante, no se consiguió aislar los compuestos responsables de esta actividad con el método de extracción utilizado. En los trabajos realizados por Ali *et al.* (2012) e Ismail *et al.* (2016) con *Jania rubens* y *Padina pavonica*, encontraron la presencia de cinco cepas aisladas de *J. rubens* y una de *P. pavonica* pertenecientes a esta familia, aunque solo una de las cepas recolectadas de *J. rubens* presentó actividad.

En diversos estudios se ha reportado que las especies del género *Bacillus* y *Vibrio* son grandes productores de compuestos bioactivos. El género *Bacillus* se encuentra tanto en algas pardas como en algas rojas, siendo de enorme interés para su estudio debido a su gran diversidad de especies bacterianas y a sus características bioquímicas con posibles aplicaciones en biotecnología (Stincone y Brandelli, 2020). Burgess *et al.* (2003) aislaron bacterias pertenecientes al género *Bacillus* capaces de inhibir cepas formadoras de biopelículas. Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo donde una especie perteneciente a la familia Bacillaceae fue capaz de inhibir a las bacterias formadoras de biopelícula *Alteromonas mediterranea* (11M) y *Alteromonas macleodii* (12M).

Por su parte, las cepas pertenecientes a la familia Vibrionaceae han sido también catalogadas como productoras de antibióticos (Moreno-Herrera *et al.*, 2010). Kanagasabhpathy *et al.* (2006) trabajaron con nueve extractos bacterianos de los cuales destacan por su actividad las cepas identificadas como *Vibrio* sp. Este trabajo evidenció que la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) tuvo la mayor capacidad inhibitoria (fue capaz de inhibir a todas las cepas productoras de biopelícula y a dos cepas patógenas con halos de inhibición de 25mm). Incluso esta cepa fue capaz de inhibir la adherencia de cuatro de las cepas blanco probadas, por lo que esta cepa podría presentar buenos resultados con un gran potencial de carácter biotecnológico si se continua su estudio.

En este trabajo se obtuvieron extractos bacterianos con el fin de obtener los metabolitos secundarios encontrados de las cepas que presentaron actividad en las pruebas preliminares, estos extractos bacterianos fueron capaces de producir actividad inhibitoria contra las cepas patógenas *S. epidermidis*, *S. aureus* y *E. coli*, así mismo, contra bacterias formadoras de biopelícula como *A. macleodii* (9A), *Aestuariibacter* sp. (10D), *A. mediterranea* (11M), *A. macleodii* (7A y 12M). Sin embargo, no todos los extractos mostraron la misma actividad que lo encontrado con el sobrenadante de las cepas, esto puede estar influenciado por el método de extracción o el tipo de solvente utilizado y la pérdida de la actividad durante las resiembras de las cepas (Águila-Ramírez, 2012).

En este estudio se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que mostraron buena capacidad de inhibición, siendo el extracto de la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) capaz de inhibir a un mayor número de cepas (cinco) a una concentración de 100 µg/mL. Corrêa-Alves *et al.* (2016) con las bacterias aisladas del alga *J. adhaerens* y *P. gymnospora*, reportaron un CMI de 6.25mg/mL frente a las cepas *B. subtilis* y *Micrococcus*, encontrando así, en el presente trabajo una concentración más baja para la efectividad de la inhibición.

La presencia de actividad antimicrobiana y antibiopelícula de las bacterias aisladas de la superficie de las algas y sedimento sugieren que tienen potencial para controlar el crecimiento y la adherencia de algunas cepas patógenas y formadoras de biopelícula lo que también puede presentar un beneficio para las algas ayudándolas en el asentamiento de bacterias competidoras y de esta forma proteger la superficie del alga (Kanagasabhpathy *et al.*, 2006).

Conclusiones

Al igual que en otros estudios relacionados con los géneros *Padina* y *Jania* se obtuvieron bacterias pertenecientes a los filos Proteobacterias y Firmicutes siendo las familias más representativas las pertenecientes a Vibrionaceae y Bacillaceae, las cuales han sido ampliamente reportadas con anterioridad.

En el presente estudio se pudo corroborar que las bacterias aisladas tanto de algas como de sedimento pueden presentar actividad antimicrobiana y antibiopelícula, ya que se obtuvo un total de 12 cepas activas contra al menos uno de los patógenos probados, destacando la cepa Vibrionaceae (JTM3.2) con los mejores resultados. Esta cepa fue capaz de presentar inhibición contra las cepas patógenas para humanos, así como con las cepas formadoras de biopelícula. Además, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria para cinco de las cepas blanco.

La familia Vibrionaceae puede llegar a representar una gran fuente para la obtención de compuestos activos, ya que se han tenido buenos resultados con cepas aisladas de algas provenientes de esta familia, como lo ocurrido en el presente trabajo, siendo las cepas que presentaron mayor producción de actividad antibacteriana. Por lo anterior se sugiere estudiar más a fondo el potencial de la cepa Vibrionacea (JTM3.2) debido a su gran capacidad para inhibir tanto a cepas patógenas como a cepas productoras de biopelícula.

Con este trabajo se confirmó la hipótesis planteada, se obtuvo actividad de al menos una cepa de cada género de alga (*Jania* y *Padina*) así como de sedimento.

Bibliografía

Abdalhamed-Albakosh, M. (2014). Identification and characterization of microorganisms associated with marine macroalgae *Splachnidium rugosum*. (pp. 97) Cape Town, South Africa, University of the Western Cape.

Ali, I.A., El Bour, M., Ktari, L. y Bolhuis, H. (2012). *Jania rubens*-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. *Journal of Applied Phycology*. (24), 525-534.

APROMAR, (2014). Estudio general: Una primera aproximación al sector de las macroalgas. S.l.: Asociación Empresarial de Acuicultura de España, Gobierno de España. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/0B4_4E-v9oqL_M1hZelJiVjJteHM/view, fecha de búsqueda: 02/07/19

Arnold, L. y Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *History of Modern biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (69), 1-39.

Asturnatura (2004). *Padina. Naturalez: Flora y Fauna*. Recuperado de: <https://www.asturnatura.com/genero/padina.html>, fecha de búsqueda 20/09/19

Baliano, A.P., Pimentel, E.F., Buzin, A.R., Vieira, T.Z., Romao, W., Tose, L.V., Lenz, D., Andrade, T.U., Fronza, M., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C. (2016). Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (26), 714-719.

Brenner, D.J., Krieg, N.R. y Staley, J.T. (2005). *Bergerys manual of Systematic Bacteriology*, (1-1191) Michingan, State University. Springer.

Burgess, J.G., Boyd, K. G., Armstrong, E., Jiang, Z., YanL, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, G. y Adams, D.R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, (19), 197-205.

Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A. y Boyd, K.G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal Biotechnology*, (70), 27-32.

Cadano, M.A. y Trono, G.C. (1987). The genus *Jania* (Cryptonemiales, Rhodophyta) in the Philippines. Diliman, Quezon. University of the Philippines.

Chakraborty, K. y Thilakan, B. (2018). Previously undescribed antibacterial polyketides from heterotrophic *Bacillus amyloliquefaciens* associated with seaweed *Padina gymnospora*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (184), 716-732.

Corrêa-Alves, R.C., Figueiredo das Mercês, P.F., Arruda de Souza², I. R., Alves de Almeida, C.M., Sant'Anna da Silva, A.P., Menezes Lima V.L., Dos Santos Correia, M. T., Vanusa da Silva M. y Gomes da Silva, A. (2016). Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco northeastern coast of Brazil. *African Journal of Microbiology Research*.

De Kluijver, M., Gijswijt, G., De Leon, R. y Da Cunda, I. (s.f). Interactive Guide to Caribbean Diving. Marine Species Identification Portal. Recuperado de: http://species-identification.org/species.php?species_group=caribbean_diving_guide&menuentry=soorten&id=479&tab=beschrijving fecha de búsqueda: 14/01/20

Dobretsov, S. V. y Qian, P. (2002). Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro-and macrofouling. *Biofouling*, (18), 217-228.

Enciso-Padilla (2013). Macroalgas marinas de la costa sur de Jalisco en Franco-Gordo, C (Ed.) *Inventario de biodiversidad de la costa sur de Jalisco y Colima* (4-23). Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

Enciso-Padilla, I., Ríos-Jara, E. y Esqueda-González, M.C. (2019). Inventario y diversidad taxonómica de las macroalgas de la costa de Jalisco, México. *Revista Bio Ciencias*, (6).

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. y Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Microbiology*, (14).

Gallardo, A.A., Risso, S., Fajardo, M.A. y Belchior, S.E. (2004). Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock. *Archivos Latinoamericanos Nutrición*, (3), 337-345.

Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. y Imhoff, J.F. (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, (409), 267-300.

- Habbu, P., Warad, V., Shastri, R., Madagundi, S. y Kulkarni, V. H. (2016). Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chinese journal of Natural Medicines*, (14), 0101-0116.
- Hellio, C., Trepos, R., Aguila, N. y Hernandez-Guerrero, C. (2015). Protocol for Assessing Antifouling Activities of Macroalgal Extracts, en Stengel, D.B. y Connan, S. (Ed.). *Natural product from marine algae* (421-35). Springer New York.
- Hernández-Herrera, R.M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Zañudo-Hernández, J. y Hernández-Carmona, G. (2016). Activity of seaweed extracts and polysaccharide-enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato and mung bean plants. *Journal of Applied Phycology*, (28), 2549-2560.
- Horta, A., Alvez, C., Pinteus, S., Lopes, C., Fino, N., Silva, J., Ribeiro, J., Rodrigues, D., Francisco, J., Rodrigues, A. y Pedrosa, R. (2019). Identification of *Asparagopsis armata* associated bacteria and characterization of their bioactive potential. *Microbiology Open Journal*, (18), 217 – 228.
- IIEG (2018). La Huerta: Diagnóstico del municipio. Instituto de Información estadística y Geografica.
- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A., Stal, L. J., Cretoiu, M. S. y El Bour, M. (2016). Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown alga *Padina gymnospora*. *Frontiers in Microbiology*, (7), 1072.
- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Bouhaouala-Zahar, B., Stal, L.J., Boudabbous, A., El Bour, M. (2018). Heterotrophic bacteria associated with the green alga *Ulva rigida*: identification and antimicrobial potential. *Journal of applied Phycology*, (30), 2883-2899
- JanakiDevi, V., YokeshBabu, M., Umarani, R. y Kumaraguru, A.. K. (2013). Antagonistic activity of seaweed associated bacteria against human pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, (2), 140-147.
- Johnjulio, W.F., Fuge, L.H., Kad, M. y Post, C. (2012). Introduccion to biofilms in family medicine. *Southern medical journal*, (105), 24-9.

Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S. y Nagata, S. (2006). Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Annals of Microbiology*, (2), 167-173.

Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S. y Nagata, S. (2006). Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Annals of Microbiology*, (56), 167-173.

Karthick, P. y Mohanraju, R. (2018). Antimicrobial potential of epiphytic bacteria associated with seaweeds of Little Andaman, India. *Frontiers in Microbiology*, (9), 611.

Kazhakkekalam, K.V. y Chakraborty, K. (2019). Marine macroalgae-associated heterotrophic Firmicutes and Gamma-proteobacteria: prospective anti-infective agents against multidrug resistant pathogens. *Archives of Microbiology*, (202), 905-920.

Kim-Cuc, N.T., Hong, T.T., Kim-Dung, T.T., Phuong-Hoa, N. y Viet-Cuong, P. (2019). Antimicrobial activity of bacteria associated with sponge *Xestospongia testudinaria* in Vietnam. *International Journal of Development Research*, (09), 26384-26388.

Kouzuma, A. y Watanabe, K., (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current opinion in Biotechnology*, (33), 125-129..

Lachnit, T., Fischer, M., Kunzel, S., Baines, J.F. y Harder, T. (2013). Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiology Ecology*, (84), 411-420.

Leal-Costa, M., Sheridan, C., Osinga, R., Dionísio, G., Miranda-Rocha, R.J., Silva, B., Rosa, R. y Calado, R. (2014). Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “supply problema” in the initial steps of drug discovery. *Marine drugs*, (12), 3929-3952.

Lee-Morrissey, K., Cavas, L., Willems, A. y De Clerck, O. (2019). Disentangling the influence of environment, host specificity and thallus differentiation on bacterial communities in *Siphonous* green seaweeds. *Frontiers in Microbiology*, (10), 717.

Lemos, M.L., Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1985). Antibiotic Activity of Epiphytic Bacteria Isolated from Intertidal Seaweeds. *Microbial Ecology*, (11), 149-163.

León-Álvarez, D y Núñez Reséndiz, M. L (2017). Genero de algas marinas tropicales de México. Algas Pardas. Coyoacan, Ciudad de México, Universidad Autónoma de México.

León-Álvarez, D y Núñez Reséndiz, M. L (2019). Genero de algas marinas tropicales de México. Algas Pardas. Coyoacan, Ciudad de México, Universidad Autónoma de México.

Lertcanawanichakul, M. y Sawangnop S. (2008). A comparison of two methods. Used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* Species. *Walailak Journal of Science and Technology*, (5), 161-171.

Lunggani, A. T., Darmanto, Y. S., Radjasa, O. K. y Sabdono, A. (2018). Prospective Source of Antimicrobial Compounds from Pigment Produced by Bacteria associated with Brown Alga (Phaeophyceae) Isolated from Karimunjava island, Indonesia. *Earth and Enviromental Science*. (116).

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.

Martínez-Matamoros, D. (2012). Busqueda de compuestos bioactivos a partir de bacterias del phylum *Firmicutes* aisladas del Octocoral *Pseudopterogorgia ellasabethae* recolectado en la isla de providencia. Bogotá, Colombia. Universidad nacional de Colombia.

Mateo-Cid, L., Mendoza-González, A., Aguilar-Rosas, L. y Aguilar-Rosas, R. (2013). Occurrence and distribution of the genus *Jania* J. V. Lamouroux (Corallinales, Rhodophyta) in the Pacific Coast of Baja California and Gulf of California, México. *American Journal of Plant Sciences*. (4), 1-13.

Moreno-Herrera, C.X., Gómez-Ocampo, E., Pérez, O., Romero, M. y Cadavid, G.E. (2010). Atividade antimicrobiana de bacterias asociadas al caracol pala (*Strombus gigas*) de la costa caribe colombiana. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Eliana_Gomez-Ocampo/publication/259844067_69_ACTIVIDAD_ANTIMICROBIANA_DE_BACTERIAS_ASOCIADAS_AL_CARACOL_PALA_Strombus_gigas_DE_LA_COSTA_CARIBE_COLOMBIANA/links/00b4952e1b4777b509000000/69-ACTIVIDAD-ANTIMICROBIANA-DE-BACTERIAS-ASOCIADAS-AL-CARACOL-PALA-Strombus-gigas-DE-LA-COSTA-CARIBE-COLOMBIANA.pdf

- Murti, D.B., Susanto, A., Radjasa, O.K. y Rondonuwu, R.S. (2016). Pigments characterization and molecular identification of bacterial symbionts of brown algae *Padina* sp. Collected from Karimunjawa Island. *Ilmu Kelautan*, (21), 59-64.
- Pal Singh, R. y Reddy, C.R.K. (2014). Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, (88), 213-230.
- Pal-Singh R., Kumari, P. y Reddy, C. R. K. (2015). Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (99), 1571-1586.
- Peihang, Xu., Huaqiang, T., Weiguang, J., Yanfei, L., Santhoshkumar, C., Ping, L. y Wenhua, L. (2018). Antioxidative and antimicrobial activities of intertidal seaweeds and possible effects of abiotic factors on these bioactivities. *Journal of Oceanology and Limnology*, (36), 2243-2256.
- Pérez-Madruga, Y., López-Padrón, I. y Reyes-Guerrero, Y. (2020). Las algas como alternativa natural para la producción de diferentes cultivos. *Cultivos Tropicales* (4).
- Pimpliskar, M., Pagaram P. y Jadhav, R. (2017). Antagonistic activity of marine bacterial isolates on common human pathogenic bacteria. *Progress Bioscience and Bioengineering*, (2), 81–88.
- Pimpliskar, M., Pagaram P. y Jadhav, R. (2017). Antagonistic activity of marine bacterial isolates on common human pathogenic bacteria. *Progress Bioscience and Bioengineering*, (2), 81–88.
- Pineda-Muñoz, M.B. (2014). Estudios sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de bacterias epífitas aisladas desde el alga marina *Nothogenia fastigiata* en la costa de Valdivia Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.
- Quirós-Rodríguez, J.A., Arias-Ríos, J.E. y Ruiz-Vega, R. (2010). Estructura de las comunidades macroalgales asociadas a litoral rocoso del departamento del Córdoba, Colombia. *Caldasia*, (2), 339-354. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-52322010000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M y Kim, H.S (2016). Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, (34), 14-29.

Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M y Kim, H.S (2016). Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, (34), 14-29.

Rebolledo-Corales, M. C. (2016). Diversidad y potencial biosintético de metabolitos secundarios de bacterias epífitas del alga antártica *Georgiella confluens*. (pp. 50) Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.

Ríos-Jara, E., Esqueda-González, M.C. y Galván-Villa, C.M. (2008). Estudios sobre la Malacología y Conquiliología en México. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Sánchez-Hinojosa, V., Asenjo, J. y Leiva, S. (2018). Agaralytic culturable bacteria associated with three antarctic subtidal macroalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (34), 73.

Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T, e Yotsu M (1990). Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *International Journal Systematic Bacteriology*, (40), 331–336.

Simonato, F., Gomez-pereira, P. R., Fuchs, B. M. y Amann, R. (2010). Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Applied Microbiology*, (33), 128-138.

Stincone, P. y Brandelli, A. (2020). Marine bacteria as source of antimicrobial. *Critical Reviews in Biotechnology*, (3), 306-319

Suvega, T. y Arunkumar, K. (2014). Antimicrobial activity of bacteria associated with seaweeds against plant pathogens on par with bacteria found in seawater and sediments of South India Coasta. *British Microbiology Research Journal*, (4), 841-855.

Thilakan, B., Chakraborty, K. y Chakraborty R.D. (2016). Antimicrobial properties of cultivable bacteria associated with seaweeds in Gulf of Mannar of South East Coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*.

Velasco-González, O., Echavarría-Almeida, S., Sifuentes-Díaz de León, A. y Casas-Valdez, M. (2013). Uso del alga marina *Sargassum* spp. Adicionada a la harina de trigo para preparar galletas alimenticias para consumo humano. *Bioagro*, (3).

Velho-Pereira, S. y Kamat, N.M. (2011). Screening of Actinobacteria for antimicrobial activities by a modified “Cross-Streak” method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Villarreal-Gómez, L.J., Soria-Mercado, I.E, Guerra-Rivas, G. y Ayala-Sánchez, E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their Surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, (2), 267-275.

Yong, L., Siqui, S., Xiaowei, P., Yuzhe, Y., Fei, Z., Shouyu Z. y Nianjun X. (2018). Evaluation of antimicrobial activities of seaweed resources from Zhejiang Coast, China. *Sustainability*, (10) 2158.

Yoon J, Matsuo Y, Adachi K, Nozawa M, Matsuda S, Kasai H, Yokota A (2008). Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohpeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum ‘Verrucomicrobia’, and emended descriptions of the class *Verrucomicrobiae*, the order *Verrucomicrobiales* and the family *Verrucomicrobiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (58), 998–1007.

Anexo

Protocolo 1: Medios de cultivos

Medio Sólido Zobell marino

Bactopeptona	5g
Extracto de levadura	1g
Cloruro Férrico al 1%	1mL
Bacto Agar	13g
Agua marina	1L
pH	7.6

1. Se agregan todos los ingredientes y se calientan hasta que el agar se disuelva completamente
2. Esterilizar 15 min a 121 °C
3. Al estar tibio verter en cajas Petri

Caldo Marino

Bactopeptona	5g
Extracto de levadura	1g
Cloruro Férrico al 1%	1mL
Agua marina	1L
pH	7.6

1. Agitar hasta disolver todos los ingredientes
2. Esterilizar 15 min a 121 °C
3. Usar una vez esta frio

Solución Salina

Cloruro de sodio	0.85g
Agua destilada	100mL

1. Disolver todos los ingredientes
2. Esterilizar 15 min a 121 °C

Agar Muller Hilton

1. Medio preparado (extracto de carne, peptona de caseína, almidón, agar agar)
2. Disolver 38g de medio en 1 litro de agua destilada
3. Calentar hasta disolver el agar
4. Esterilizar durante 15 min a 121 °C

Protocolo 2: Medios y reactivos para pruebas bioquímicas

Movilidad

1. Se utiliza el protocolo de Medio solido Zobell marino
2. Una vez disuelto se agregan 2mL en tubos de ensayo tapados
3. Esterilizar 15 min

Tolerancia a la salinidad

Bactopeptona	5g
Extracto de levadura	1g
Cloruro Férrico al 1%	1mL
NaCl 3.4%	34g
NaCl 6%	60g
NaCl 8%	80g
Agar	13g
Agua destilada	1L
pH	7.6

1. Se agregan todos los ingredientes (la cantidad de sal dependerá del porcentaje que se requiera)
2. Calentar hasta disolver
3. Esterilizar por 15 min
4. Al estar tibio servir en cajas de Petri

Oxidasa

1. Preparar una solución de dimethyl-para-phenylenediamine hydrochloride al 1% (0.1 de reactivo, 10mL agua destilada)

Catalasa

1. Preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (0.3 mL de H₂O₂, 9.7 mL agua destilada)

Oxido-Fermentación

Bactopeptona	1g
Extracto de levadura	0.2g
Cloruro Férrico al 1%	0.2mL
Rojo de fenol	0.002g
Tris HCL	0.1g
Bacto agar	0.6g
Agua de mar	200mL

1. Solución para 200 mL
2. Calentar hasta disolver el agar
3. Esterilizar por 15 min

4. Cuando este tibio agregar glucosa al 10% estéril (por cada 90 mL de cultivo agregar 10 mL de glucosa)
5. Agitar hasta integrar la glucosa
6. Verter 2 mL de la solución en tubos de ensayo esterilizados previamente
7. Prepara dos por muestra y un blanco.

Medio TCBS

1. Medio preparado
2. Agregar 89g en 1 litro de agua de mar previamente estéril
3. Calentar hasta disolver el agar
4. Verter en cajas de Petri

Medio MacConkey

1. Medio preparado
2. Añadir g en 1 litro de agua de mar
3. Calentar hasta disolver el agar
4. Esterilizar por 15 min
5. Agregar en cajas de Petri
6. Esperar a que estén solidificadas

Rojo de metilo y Voges Proskauer

1. Solución para 100 mL
2. Agregar 1.7g de medio RMVP en 100 mL de agua de mar
3. Agitar hasta disolver
4. Agregar 2 mL de solución en tubos de ensayo tapados
5. Esterilizar por 15 min

Solución indicadora de Rojo de metilo

Rojo de metilo	0.1g
Alcohol etílico	300 mL
Agua destilada	200 mL

Reactivo prueba Voges Proskauer (α - naftol al 5%)

Naftol	5g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Hidróxido de potasio al 40%

Hidróxido de potasio	40g
Agua destilada	100 mL

Prueba de Indol

Triptona	1.5g
Agua de mar	100 mL

1. Preparación para 100 mL
2. Agitar hasta disolver
3. Agregar 2 mL de la solución en tubos de ensayos tapados
4. Esterilizar por 15 min

Protocolo de pruebas bioquímicas

Movilidad

1. Prepara un cultivo en caldo marino de 24 horas
2. Inocular con el cultivo previo por picadura un tubo de ensayo con medio solido
3. Incubar a 28 °C de 5 a 7 días y realizar lectura

Esta prueba nos indica si la bacteria tiene la capacidad de moverse, si el crecimiento se propaga desde la línea inoculada a lo largo del tubo se presentaría un resultado positivo.

Tolerancia a la salinidad

1. Prepara un cultivo en caldo marino de 24 horas
2. Estriar la cepa del cultivo anterior en cajas Petri con diferentes porcentajes de salinidad
3. Si se presenta crecimiento es un resultado positivo

Se realizan siembras a diferentes concentraciones de sal, con el fin de determinar si son capaces de crecer en las diferentes concentraciones, en caso de presentar crecimiento se considera un resultado positivo.

Oxidasa

1. Cultivar una cepa en medio Zobell solido
2. En una tira de papel filtro colocar una muestra de la cepa
3. Agregar una gota de la solución
4. Si la muestra adquiere una coloración purpura o azul es una prueba positiva

Esta prueba sirve para identificar la enzima Citocromo C oxidasa, la cual produce peróxido de hidrogeno. Una prueba positiva nos daría como resultado el cambio de coloración de la colonia en una tonalidad azul o morada.

Catalasa

1. Cultivar una cepa en medio Zobell sólido
2. Colocar una colonia en un portaobjetos
3. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno
4. Si se presentan burbujas en la muestra es positiva

Esta prueba nos dice la presencia de la enzima catalasa, la cual se encarga de hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua liberando el oxígeno, por lo que si al agregar peróxido de hidrógeno a la colonia bacteriana se observa la presencia de burbujas obtendremos un resultado positivo.

Oxido-Fermentación

1. Prepara un cultivo en caldo marino de 24 horas
2. Inocular por picadura 2 tubos de ensayo con medio O/F
3. Agregar a uno de los tubos alrededor de 200 μ L de aceite mineral
4. Incubar por 5 a 7 días a 28 °C

Esta prueba sirve para determinar cómo utilizan las bacterias los hidratos de carbono ya sea por vía oxidativa (aerobio) o vía fermentativa (anaerobio).

5. Los resultados se determinarán con base en la coloración de los tubos cambiando de rojo a amarillo
6. Si es oxidativo el tubo sin aceite mineral cambiará a color amarillo
7. Si es fermentador el tubo con aceite mineral cambia a una coloración amarilla
8. Si es inerte no existe un cambio de coloración permaneciendo en una coloración roja ambos tubos

Esta prueba sirve para determinar cómo utilizan las bacterias los hidratos de carbono ya sea por vía oxidativa (aerobio) o vía fermentativa (anaerobio).

Medio TCBS

1. Prepara un cultivo en caldo marino de 24 horas
2. Estriar la cepa del cultivo anterior en cajas Petri con medio TCBS
3. Se registra la presencia de coloración y crecimiento de la cepa

Con esta prueba se determina la capacidad bacteriana de fermentar la sacarosa. Las colonias que presentaban crecimiento y eran de una coloración amarilla nos indicaría la fermentación de sacarosa. Es un medio de cultivo selectivo para bacterias de la familia Vibrionaceae.

Medio MacConkey

1. Prepara un cultivo en caldo marino de 24 horas
2. Estriar la cepa del cultivo anterior en cajas Petri con medio MacConkey

3. Se registra la presencia de coloración y crecimiento de la cepa

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad bacteriana de fermentar la lactosa, si se presenta crecimiento bacteriano con una tonalidad rosada da como resultado la fermentación de lactosa. Es un medio de cultivo selectivo para bacterias de la familia Enterobacteriaceae.

Rojo de metilo y Voges Proskauer

1. Inocular 2 tubos con medio RMVP a 35 °C por 48 h
2. Pasado el tiempo de incubación añadir a un tubo 10 gotas α - naftol al 5% y 4 gotas de KOH al 40% y reposar por 5 min

Con esta prueba se determina si una bacteria fermenta la glucosa por vía butanodiólica con la obtención de un producto final neutro (acetoina)

3. Si se presenta un halo rojo o rosa es una reacción positiva
4. Al segundo tubo se le agregan 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo

En esta prueba el rojo de metilo actúa como un indicador de pH, indicando la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa por vía acida mixta obteniendo un producto ácido.

5. Si se presenta una coloración roja significa una reacción positiva
6. Todas las lecturas se tendrán que realizar antes de 30 min de añadidos los reactivos

Prueba de Indol

1. Inocular una cepa en un tubo por 48 h a 35 °C
2. Añadir 3 gotas de reactivo Kovak

Esta prueba nos dice si un microorganismo posee la enzima triptofanasa, la cual hidroliza el triptófano en indol indicando la producción del mismo.

3. La presencia de un anillo rojo significa un resultado positivo

Tinción de Gram

1. A un portaobjeto se le agrega una gota de agua destilada y con asa se le agrega una colonia bacteriana realizando un frotis en el portaobjetos
2. Se deja secar a temperatura ambiente para fijar la muestra
3. Se agrega cristal violeta durante 1 min y posteriormente se enjuaga con agua
4. Se agrega Lugol durante 1 min y se enjuaga nuevamente con agua
5. Se añade alcohol-acetona y se deja durante 15 seg y se enjuaga
6. Por último, se agrega safranina durante 1 min y se enjuaga nuevamente
7. Observar en microscopio a 100X.

Esta prueba permite visualizar las bacterias y poder observar su forma celular, diferenciándolas en dos grandes grupos:

8. Las bacterias Gram negativas, las cuales cuentan con una membrana celular externa y una capa delgada de peptidoglicanos, éstas presentan una coloración rosa
9. Las bacterias Gram positivas,, no presentan membrana celular externa, sin embargo, si presentan una amplia capa de peptidoglicanos dando como resultado la tinción morada

Prueba de Hidróxido de potasio al 3%

1. Colocar una colonia en un portaobjetos
2. Agregar 2 gotas de solución de KOH al 3%
3. Mezclar la colonia en la solución con movimientos giratorios

Esta prueba es utilizada para diferenciar ente bacterias Gram positivas o negativas y de esta forma corroborar lo visualizado con la técnica de tinción de Gram

4. Si aparece una hebra viscosa al separar el asa de la muestra, significa un resultado positivo, indicando la presencia de una bacteria Gram negativa
5. Mediante el hidróxido de potasio las paredes de las células Gram negativas se descomponen liberando material cromosómico viscoso