

Actividad antibacteriana de bacterias aisladas de sistemas hidrotermales de Baja California Sur, México

Antibacterial activity of bacteria isolated from hydrothermal systems of Baja California Sur, Mexico

Yessica Peña-Pelayo¹, Karla Gutiérrez-Almada², Rocío G. Cervantes-Gómez¹, Ruth Noemí Aguila-Ramírez^{2*}

Recibido: 25 de febrero de 2022.

Aceptado: 23 de mayo de 2022.

Publicado: agosto de 2022.

RESUMEN

Antecedentes. Los sistemas hidrotermales son una fuente novedosa para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y/o metabolitos con potencial biotecnológico. **Objetivos.** En este sentido, en el presente trabajo se realizó una prospección de bioactividad de microorganismos aislados de sistemas hidrotermales someros con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos de interés en salud humana, acuícola e industrial. **Métodos.** Se aislaron bacterias de dos sistemas hidrotermales ubicados en Bahía Concepción y uno en El Sargento, B.C.S. en época de lluvias y temporada de estiaje. Se evaluó la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de humano, patógenas acuícolas y formadoras de biopelículas marinas, utilizándose la técnica de difusión en pozo. **Resultados.** El 73 % de las bacterias aisladas produjeron sustancias capaces de inhibir el crecimiento de al menos uno de los microorganismos evaluados. Solo se observó antagonismo para 15 de las 36 bacterias diana, donde *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* fue la más sensible, observándose una inhibición de su crecimiento en presencia de más de la mitad de las bacterias marinas aisladas de sistemas hidrotermales (51 %). En cuanto a la actividad por sitio y temporada de obtención se observó un mayor número de aislados activos frente a los patógenos acuícolas, predominando los aislados de temporada de estiaje para Mapachitos y Santispac, mientras que en El Sargento el mayor número de aislados activos frente a este grupo de bacterias diana se obtuvo durante la temporada de lluvias. **Conclusión.** Las bacterias marinas aisladas de ambientes extremos sintetizan compuestos antimicrobianos que podrían ser utilizados en el campo de la salud y la industria.

Palabras clave: Antagonismo, Patógenos acuícolas, Patógenos de humanos, Biopelículas

¹ Departamento de Estudios para el Desarrollo Sustentable de Zonas Costeras, Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara. Gómez Farias 82, San Patricio-Melaque, Jalisco, 48980. México.

² Departamento de Desarrollo de Tecnologías, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23096. México

***Corresponding author:**

Ruth Noemí Aguila-Ramírez: e-mail: raguilar@ipn.mx

To quote as:

Peña-Pelayo, Y., K. Gutiérrez-Almada, R. G. Cervantes-Gómez & R. N. Aguila-Ramírez. 2022. Actividad antibacteriana de bacterias aisladas de sistemas hidrotermales de Baja California Sur, México. *Hidrobiológica* 32 (2): 105-115.

DOI:10.24275/uam/izt/dcbshidro/2022v32n2/Pena

ABSTRACT

Background. Hydrothermal systems are a novel source for the discovery of new antimicrobial compounds and/or metabolites with biotechnological potential. **Objectives.** In the present research, a bioactivity screening of microorganisms isolated from shallow hydrothermal systems with the capacity to inhibit the growth of microorganisms of interest in human, aquaculture, and industrial health was carried out. **Methods.** Bacteria were isolated from two hydrothermal systems located in Bahía Concepción and other in El Sargento, B.C.S. in rainy and dry season. The antimicrobial activity against human pathogens, aquaculture pathogens, and marine biofilm-forming bacteria was evaluated, using the well diffusion technique. **Results.** 73 % of the isolated bacteria produced substances capable of inhibiting the growth of at least one of the microorganisms evaluated. Antagonism was only observed for 15 of the 36 target bacteria, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* was the most sensitive, which was inhibited by 51 % of the marine bacteria. Regarding the activity by site and season of collection, a greater number of active isolates against aquaculture pathogens was observed, predominating the dry season isolates for Mapachitos and Santispac, while in El Sargento the highest number of active isolates was obtained during the rainy season. **Conclusion.** Marine bacteria from hydrothermal systems are able to produce antimicrobial metabolites that could be used in different areas e.g. health and industry.

Keywords: Antagonism, Aquaculture pathogens, Human pathogens, Biofilm

INTRODUCCIÓN

Los sistemas hidrotermales suelen estar relacionados con actividad volcánica costera (Tarasov *et al.*, 2005), aunque también se pueden llegar a encontrar en márgenes continentales afectados por procesos activos de extensión tectónica (Prol-Ledesma & Canet, 2014; Rodríguez-Urbe *et al.*, 2018), como es el caso de los que se encuentran en México. En Bahía Concepción, Baja California Sur, se localizan dos sistemas hidrotermales; uno de ellos en la zona del manglar de Santispac sobre la línea costera, y una ventila hidrotermal somera a 15 m de profundidad en la zona oceánica, conocida como Mapachitos.

Otro sistema hidrotermal en las costas de Baja California Sur está localizado en la línea de costa de Playa Agua Caliente en El Sargento, una zona de falla geológica con actividad hidrotermal, que es alimentada por canales subacuáticos costeros (Nava-Sánchez *et al.*, 1995).

Los sistemas hidrotermales son calentados geotérmicamente y están enriquecidos con compuestos químicos inorgánicos; estas zonas presentan condiciones fisicoquímicas inusuales a otras áreas marinas, tales como: temperaturas elevadas, concentraciones altas de dióxido de carbono, ácido sulfhídrico, hidrocarburos y metales pesados; entre otras características que los hacen sistemas únicos (Lentini *et al.*, 2014), por lo cual se han convertido en el objeto de estudio de diversos investigadores (Forrest *et al.*, 2005; Villanueva-Estrada *et al.*, 2005). Algunos de estos sistemas hidrotermales considerados como ambientes extremos presentan ventilas o fisuras en el sedimento marino de las que emanan fluidos, están ubicadas en diferentes sitios oceánicos y son divididas en ventilas profundas (mayores a 200 m) y someras (menores de 200 m) (Tarasov *et al.*, 2005).

En los sistemas hidrotermales se han encontrado microorganismos extremófilos (afectos a ambientes inusuales como altas temperaturas y concentraciones de H₂S, hidrocarburos, metales pesados, entre otros), los cuales han sido estudiados con un enfoque ecológico para interpretar la función que ejercen en el medio (Van Dover, 2000). Estos sitios son influenciados por organismos fotosintéticos, de forma que se caracterizan como ambientes de alta energía que benefician a la microbiota (Giovannelli *et al.*, 2013).

La ecología microbiana se ha estudiado en varios sitios de sistemas hidrotermales, en donde evalúan las relaciones simbióticas, ecología fisiológica, adaptaciones al sulfuro, tolerancias térmicas y adaptaciones sensoriales, así como las formas en que se establecen las comunidades y por qué persisten en estos ambientes (Cerqueira *et al.* 2018; Meier *et al.*, 2019; Mars-Brisbin *et al.*, 2020; Dede *et al.*, 2022); sin embargo, hay pocas investigaciones con un enfoque especial en la bioprospección. La adaptación a estos microhábitats, donde las condiciones son oscilantes, induce una serie de modificaciones en las vías metabólicas primarias y secundarias, por lo que se hipotetiza que los microbios afines a estos sitios son capaces de producir metabolitos estructuralmente únicos (Wilson & Brimble, 2009). Estas características han despertado el interés por el estudio de los sistemas hidrotermales, convirtiéndolos además en una fuente de microorganismos y/o metabolitos con potencial biotecnológico (Gugliandolo *et al.*, 2012) así como para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos (Butler, 2008; Blunt *et al.*, 2012; Rodríguez-Valdez, 2017). En este sentido, en el presente trabajo se realiza una bioprospección de microorganismos aislados de sistemas hidrotermales someros con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos para el humano, patógenos acuícolas y de interés industrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio. Los sistemas hidrotermales en Baja California Sur, México, son dados por fallas tectónicas (Leal-Acosta & Prol-Ledesma, 2016). En dirección NO-SE pasan por Mapachitos en Bahía Concepción (McFall *et al.*, 1968), y por el estero del manglar Santispac, el cual cuenta con manantiales de fluidos hidrotermales que son mezclados con agua salada antes de su descarga (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). Hacia el Sur del Estado, se encuentra la zona de la falla geológica activa El Sargento, en el abanico delta de Playa Agua Caliente, en donde se ha registrado actividad hidrotermal que atraviesa una larga extensión de playa alimentada por canales subterráneos con los fluidos termales (Nava-Sánchez *et al.*, 1995).

Se recolectaron muestras de agua y sedimento en época de lluvias-verano y en estiaje-invierno en los dos sistemas hidrotermales dentro de Bahía Concepción: Mapachitos (26° 40' 27.58" N; 111° 50' 37.13" O) y Santispac (26° 45' 46.21" N; 111° 53' 36.91" O), además de muestras de sedimento en la línea de costa en Playa Agua Caliente, El Sargento (24° 6' 51.01" N; 109° 59' 54.80" O).

En Mapachitos las muestras se recolectaron mediante buceo SCU-BA a una profundidad de 10 a 15 m, en donde la temperatura del agua osciló entre los 75 y 80 °C. Para llegar a esta zona de ventilas se utilizó una lancha con motor fuera de borda.

En Santispac las muestras de agua y sedimento se recolectaron en la zona de manglar a una profundidad aproximada de 2 m y en pozas de marea a 50 cm de profundidad. Las temperaturas en estas zonas oscilaron entre los 50 y 75 °C.

En Mapachitos y Santispac el sedimento se recolectó utilizando nucleadores de plástico de 15 cm de altura, previamente esterilizados, en las zonas de mayores temperaturas, registradas con un termómetro digital. Las muestras de agua se tomaron directamente de los fluidos hidrotermales en bolsas de polietileno estériles, registrando también la temperatura *in situ*. Las muestras se mantuvieron en una bolsa térmica a una temperatura promedio de 60 °C hasta su procesamiento.

En el Sargento, debido a que los fluidos hidrotermales son subterráneos, no se logró llegar hasta ellos, por lo que solo se tomaron muestras de sedimento en las zonas de playa influenciadas por el sistema hidrotermal excavando a una profundidad aproximada a los 2 m, que alcanzaban una temperatura de 70 °C, registrada mediante un termómetro de vástago. Se utilizó un nucleador de plástico de 15 cm de altura y las muestras se mantuvieron en una bolsa térmica a 60 °C para su transporte al laboratorio.

Aislamiento de bacterias. Se realizaron diluciones decimales en solución salina, en condiciones de esterilidad. Posteriormente se sembraron de forma masiva las diluciones 10⁴ a 10⁷ en cajas Petri con Agar Marino (AM: agar bacteriológico 17 g L⁻¹, peptona de carne 5 g L⁻¹, extracto de levadura 1 g L⁻¹, FeSO₄ 5 mg L⁻¹ y agua marina filtrada y esterilizada), y fueron incubadas a 60 °C (temperatura máxima de la incubadora) de 24 a 96 horas. Al observarse crecimiento bacteriano, se aislaron individualmente las distintas colonias mediante la técnica de estría cruzada en AM, confirmando su pureza al observar en el microscopio estereoscópico una sola morfología, basados en la forma, borde, elevación y color, en caso de encontrar dos o más se repitió el proceso. Con el fin de conocer si las cepas eran termotolerantes o termófilas, éstas se sembraron por duplicado, colocándolas a temperatura de incubación de 35 y 60 °C. Cada uno de los aislados fue criopreservado con glicerol a -80 °C.

Actividad antibacteriana. Las bacterias aisladas se reactivaron en caldo marino a 60 °C durante 48 h. Posteriormente se centrifugó a 17530 g durante 30 min para obtener el sobrenadante.

Se analizó la actividad antibacteriana de las bacterias aisladas contra patógenos de humanos, patógenos acuícolas y bacterias marinas formadoras de biopelículas que forman parte de la colección del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR-IPN (Tabla 1) mediante el método de difusión en pozo (NCCLS, 1993). Para ello, se preparó una suspensión celular de cada cepa diana en solución salina (2.5 %) ajustada a 1×10^8 cel mL⁻¹, se tomaron 100 µL y se realizó una

siembra masiva en medio sólido AM, TSA o Müller-Hinton, dependiendo de la bacteria (Tabla 1). Posteriormente, se perforaron pozos de seis milímetros de diámetro en las placas previamente sembradas con cada una de las cepas diana. Se añadieron 50 µL del sobrenadante de los aislados de los sistemas hidrotermales a los pocillos y las placas se incubaron a 4 °C durante al menos una hora para permitir la difusión de las sustancias activas, seguido de incubación durante 24 h a 35 °C. Se realizaron tres réplicas para cada aislado, como control se utilizó estreptomycin (1 µg mL⁻¹). Se evaluó la presencia de zonas de inhibición alrededor de los pocillos.

Tabla 1. Cepas diana patógenas de humano, patógenas acuícolas y formadoras de biopelículas marinas.

CLAVE	IDENTIDAD	ORIGEN	INTERÉS	MEDIO DE CULTIVO
ATCC BAA-196	<i>Escherichia coli</i>	De referencia	Humano	MH
ATCC BAA-42	<i>Staphylococcus aureus</i>	De referencia	Humano	MH
ATCC 14990	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	De referencia	Humano	MH
ATCC 14028	<i>Salmonella enterica</i>	De referencia	Humano	MH
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	De referencia	Humano	MH
PA01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	De referencia	Humano	MH
ScH3	<i>Aeromonas caviae</i>	De referencia	Humano	MH
AH	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Puntis conchonus</i>	Acuícola	TSA
Cf	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Puntis conchonus</i>	Acuícola	TSA
Es	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Puntis conchonus</i>	Acuícola	TSA
Sx	<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>Puntis conchonus</i>	Acuícola	TSA
1838	<i>Streptococcus sp</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	TSA
1875	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Acuícola	TSA
321	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	<i>Salmo salar</i>	Acuícola	TSA
331	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>damsela</i>	<i>Damsela damsela</i>	Acuícola	TSA
346	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Salmo salar</i>	Acuícola	AM
347	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Salmo gairdneri</i>	Acuícola	AM
375	<i>Shewanella haliotis</i>	<i>Litopenaeus sp.</i>	Acuícola	AM
527	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Inia geoffrensis</i>	Acuícola	TSA
696	<i>Listonella anguillarum</i>	<i>Gadus morhua</i>	Acuícola	TSA
G4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
G6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
G7	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
G9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
G10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
ATCC 17802	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
ATCC CVP2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Acuícola	AM
4M	<i>Alteromonas simiduii</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
6M	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
11M	<i>Alteromonas mediterranea</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
12M	<i>Alteromonas macleodii</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
7A	<i>Alteromonas macleodii</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
8A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
9A	<i>Alteromonas macleodii</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
1D	<i>Alteromonas sp.</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM
10D	<i>Aestuariatibacter sp.</i>	Biopelículas marinas *	Biopelículas	AM

* Aisladas de probetas metálicas sumergidas. **MH:** Agar Müller Hinton, **AM:** Agar marino, **TSA:** Agar soya tripticaseina.

Identificación molecular. Solo las bacterias aisladas que presentaron mayor actividad y amplio espectro fueron identificadas molecularmente siguiendo la metodología de Sambrook & Russell (2006). Para ello, se inocularon las bacterias en agar marino por 24 h a 60 °C, posteriormente se tomaron las colonias y se colocaron en microtubos con agua libre de nucleasas, los cuales fueron centrifugados a 17530 g por 10 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en 575 µL de TE pH 8.0 (0.1 M Tris pH 7.6, 0.001 M EDTA pH 7.5), 30 µL de SDS al 10 % (Dodecil sulfato de sodio), 3 µL de proteinasa K (10 mg mL⁻¹), se mezcló y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Después se les añadió 100 µL de NaCl 5 M, se mezclaron y se incubaron 10 min a 65 °C. Posteriormente se agregó 0.8 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) (Fenol:CHCl₃: C₅H₁₂O Alcohol isoamílico) y se homogenizó, se centrifugó 10 min a 17530 g, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo. Fue añadido cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1 (v/v), se mezcló y centrifugó 10 min a 17530 g, se recuperó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de isopropanol y se incubó a -20 °C por 24 h. Posteriormente se centrifugó a 17530 g a 4 °C por 20 min, se decantó y se agregaron 500 µL de etanol frío al 70 %, se centrifugó y se decantó el sobrenadante, se volvió a agregar 500 µL de etanol frío al 70 %, se centrifugó nuevamente y se decantó el sobrenadante. Se permitió la evaporación del etanol, posteriormente la pastilla de ADN se resuspendió en 100 µL de TE. Finalmente se agregaron 3 µL de ARNasa (10 mg mL⁻¹) y se incubó a 60 °C por 10 min. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro UV-VIS de barrido de microgota (NanoDrop 2000, Thermo Sc).

La amplificación de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para bacterias: 27F/1385R (GAGTTTGATCCTGGCTA/CGGTGTGTTCAAGGCC) (Rheims *et al.*, 1996) o los oligos específicos para el género *Bacillus*: rpoB 1206F/rpoB 3202R (ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAACAT/ACACCCTTGTACCGTGA-CGACC) (Ulyanova *et al.*, 2016). Se usó 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de dNTPs, 5 µL de amortiguador de PCR 10X, 2.5 µL de MgCl₂, 0.2 µL de Taq DNA polimerasa y agua libre RNAsas para ajustar a 50 µL el volumen de cada reacción. Finalmente se añadió la mezcla a cada tubo y se agregó el ADN (50 ng/µL). La reacción para el oligo 27F/1385R se llevó a cabo en un termociclador (MJ Mini, Biorad) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 29 ciclos de Desnaturalización a 95 °C por 1 min; alineamiento de oligos a 58 °C por 1 min; y extensión/síntesis a 72 °C por 1:30 min; finalmente, una última extensión a 72 °C por 10 min. Mientras que para los cebadores específicos para el género *Bacillus*, se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de Desnaturalización a 95 °C por 20 seg; alineamiento de oligos a 55.9 °C por 30 seg; extensión, síntesis a 72 °C por 1:30 min; finalmente, una última extensión a 72 °C por 5 min.

La calidad del producto de PCR resultante se evaluó en un gel de agarosa al 1 % con regulador de carga TBE 1X. La muestra (2 µL) se mezcló con buffer de carga (2 µL) a base de LB y GelRed en una proporción 1:8, respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1,000 pares de bases. La electroforesis se llevó a cabo a 75 V. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias se editaron con el programa FinchTV, posteriormente se ensamblaron con el programa Codon Code Aligner y se compararon con otras secuencias genéticas en la base de datos del GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

RESULTADOS

De un total de 120 bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales, se encontró que 87 de ellas (73 %) fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos uno de los microorganismos evaluados (Tablas 2 y 3), con variaciones en los tamaños de los halos desde 2 mm hasta 26 mm de diámetro (Figura 1), los controles con el antibiótico mostraron halos en un rango entre los 22 y 28 mm de diámetro. Solo se mostró antagonismo para 15 de las 36 cepas blanco, siendo las de interés acuícola las más sensibles a los compuestos producidos por las bacterias de los sistemas hidrotermales (Tabla 2). Se presentó una mayor actividad de los aislados contra *Photobacterium damsela* subsp *damsela* (331) siendo inhibida por un 51 % de las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales, considerándose como la cepa más sensible. Por otro lado, se observó una mínima sensibilidad de *Enterobacter* sp. (Es), ya que solo una bacteria aislada mostró actividad antagonista frente a ella (Tabla 2).

Se destaca la bacteria SL108 identificada como *Bacillus paralicheniformis* por presentar mayor actividad inhibitoria, con un halo de 26 mm de diámetro frente al patógeno *Listonella anguillarum* 696 (Tabla 2), frente a este mismo patógeno, la cepa *Bacillus firmus* (SRE61) mostró un halo de inhibición de 24 mm (Tabla 2).

Siete bacterias aisladas (6 %) fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos uno de los patógenos de humano evaluados, siendo más activas frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC14990 (Tabla 3).

Frente a bacterias formadoras de biopelículas marinas, ocho cepas aisladas de los sistemas hidrotermales fueron capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos evaluados, siendo la bacteria *Aestuariibacter* sp. (11M) la que mayor sensibilidad mostró y solamente con las bacterias aisladas durante temporada de lluvia.

Las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales que mostraron los mayores halos y que inhibieron el mayor número de cepas blanco fueron identificadas molecularmente como *Bacillus firmus* (SRE61), *B. sonorensis* (ME87), *B. paralicheniformis* (SL108), *Virgibacillus salarius* (SE88), y *Brevibacillus thermoruber* (ME99) (Tabla 4), siendo en su mayoría de temporada de estiaje.

El mayor número de cepas con actividad antimicrobiana fueron aisladas de El Sargento, de un total de 41 cepas aisladas, 38 (92 %) fueron activas frente a alguna de las cepas diana (Tabla 5).

De acuerdo con la temporada en que se obtuvo el aislado bacteriano hidrotermal, se observó que, de las 58 bacterias aisladas durante temporada de lluvias, 36 (62 %) mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de al menos uno de los patógenos. En el caso de las 62 bacterias aisladas durante temporada de estiaje, 51 mostraron actividad (82 %) (Tabla 6).

Los aislados provenientes de Mapachitos predominaron durante la época de estiaje (24) con un 79 % de bacterias productoras de compuestos antimicrobianos, en El Sargento se aisló un menor número de bacterias durante esta temporada; sin embargo, se obtuvo un mayor porcentaje de bacterias con actividad antimicrobiana, siendo el más alto porcentaje de todas las localidades y temporadas de estudio. De Santispac se aisló el menor número de bacterias en la temporada de lluvias y solo el 35 % de ellas mostró actividad antimicrobiana (Tabla 6).

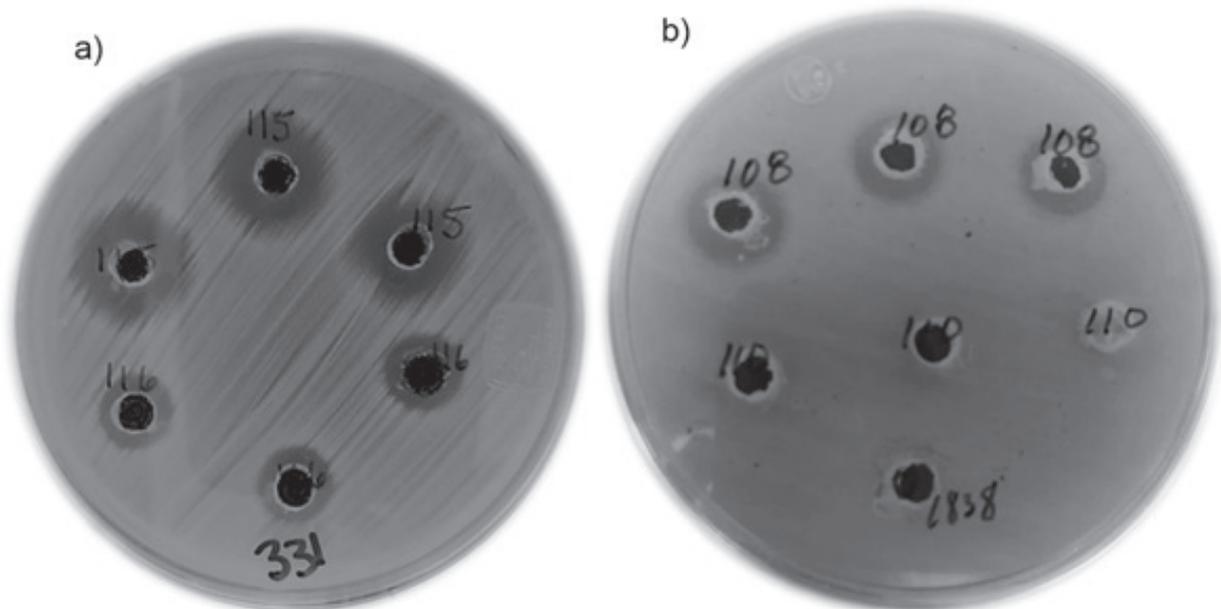


Figura 1. Halos de inhibición producidos por las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales frente a dos patógenos acuícolas; a) 331 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) y b) 1838 (*Streptococcus* sp.).

De acuerdo con el número de aislados bacterianos con actividad antimicrobiana respecto al sitio, temporada de obtención y bacteria diana probada se observó un mayor número de aislados activos frente a los patógenos acuícolas, predominando los de la temporada de estiaje para Mapachitos y Santispac, mientras que en El Sargento el mayor número de aislados activos frente a este grupo de bacterias diana se obtuvo durante la temporada de lluvias. Por otro lado, se observó baja y en algunos casos nula actividad antagónica frente a bacterias formadoras de biopelículas y patógenos humanos (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los microorganismos de ambientes extremos (extremófilos) son caracterizados por la capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles con altas temperaturas, pH, presión, salinidad y otros parámetros físico-químicos o la combinación de los mismos (Antranikian *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2013), lo cual resulta en la producción de metabolitos con características únicas que pueden aplicarse en una amplia gama de procesos biotecnológicos (Maugeri *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Gugliandolo *et al.*, 2012; Reed *et al.*, 2013), como es el caso de bacterias aisladas de agua en ventilas hidrotermales someras de Portugal, que son capaces de degradar enzimas como las amilasas, asimismo, especies del género *Bacillus* aisladas de sedimentos de ventilas hidrotermales profundas en Okinawa son productoras de diversas proteasas (Mohandass *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Estos sistemas son también considerados una fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos, especialmente antibacterianos, por ello, las bacterias aisladas en los sistemas hidrotermales muestreados para este trabajo las vuelve candidatas para la exploración de compuestos con potencial biotecnológico.

Al igual que en el presente estudio, existen otros trabajos en donde se comprueba que los sistemas hidrotermales son sitios con gran diversidad de bacterias productoras de compuestos activos, como el realizado por Eyþórsdóttir (2007) quien encontró que 96 bacterias aisladas de organismos como esponjas, anemonas y algas de los sitios de ventila hidrotermal de Eyjafjörour, Islandia, mostraron actividad antimicrobiana frente a uno o más patógenos evaluados, 42 frente a *Escherichia coli*, 8 frente a *Enterococcus fecalis*, y 56 frente a *Candida albicans*. También, exopolisacáridos producidos por bacterias extremófilas de las ventilas de Isla Eolian, en el Mar Mediterráneo, han mostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram Positivas y Gram negativas como *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como contra el hongo *C. albicans* (Scala *et al.*, 2019), dentro de estas bacterias activas, destacan las de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus*, las cuales han sido registradas también por otros autores (Caccamo *et al.*, 2000, Maugeri *et al.*, 2002a, 2002b) demostrando ser potentes inhibidores microbianos (Ravindran *et al.*, 2016).

Las especies del género *Bacillus* están adaptadas a ambientes cálidos y por lo general son capaces de colonizar nichos oligotróficos como es el caso de marismas, aguas termales y suelos desérticos (Khiyami *et al.*, 2012). En el presente estudio, de 120 bacterias aisladas en las temporadas de lluvias y estiaje, 87 (73 %), fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos uno de los patógenos evaluados, las que mostraron mayor actividad en cuanto al tamaño del diámetro del halo de inhibición y el espectro frente a un mayor número de bacterias diana pertenecen al género *Bacillus* (*Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus firmus*, y *Bacillus sonorensis*), coincidiendo con lo antes mencionado. De estas especies se conoce que, por ejemplo, *B. paralicheniformis* produce sustancias como antibióticos, vitaminas, aminoácidos y en-

zimas, adicionalmente han mostrado notable actividad antimicrobiana de amplio espectro, siendo eficaces contra bacterias, levaduras y hongos (Ahire *et al.*, 2020). La cepa termofílica POD1 identificada como *B. paracheliformis* aislada de una fuente termal de la India por Ojha *et al.* (2021) produce una lisozima con actividad frente a bacterias multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Lactobacillus reuteri*. También se ha reportado la producción de biosurfactantes con actividad antimicrobiana por cepas termotolerantes del género *Bacillus* aisladas de fuentes termales de Tailandia, entre ellas, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. pumilus* (Pakpicharoen *et al.*, 2008), y de péptidos antimicrobianos como bacteriocinas, producidos por *B. sonorensis* con actividad frente a *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Chopra *et al.*, 2014).

En el presente estudio, se identificó a las especies *Virgibacillus salarius* y *Brevibacillus thermoruber* como antagonistas de algunos de los patógenos diana. Otros autores han reportado que estas especies son

productoras de compuestos que inhiben el crecimiento de patógenos multirresistentes (Radchenkova *et al.*, 2011; Ayuningrum *et al.*, 2020) y se menciona también que están emparentadas filogenéticamente con el género *Bacillus* (Hua *et al.*, 2008; Yohandini *et al.*, 2015), por lo que se puede inferir que estas cepas, al igual que *Bacillus*, producen diversos compuestos capaces de inhibir a diferentes microorganismos.

Gutiérrez-Almada *et al.* (2020) realizaron el aislamiento de las cepas bacterianas con las que se trabajó en el presente estudio, probando el potencial de extractos para inhibir la formación de biopelículas frente a dos cepas patógenas de humano (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Aeromonas caviae*) y una cepa patógena de interés acuícola (*Vibrio parahaemolyticus*), por lo que, con los resultados de dicho trabajo, en conjunto con el presente estudio, se confirma su potencial para la producción de compuestos antibacterianos en diferentes campos de aplicación.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales (SH) frente a patógenos acuícolas (Datos expresados en mm como la media \pm desviación estándar de los ensayos por triplicado).

Aislados de SH	Cepas diana									
	1838	1875	331	G7	346	347	696	375	Cf	Es
ME40			2 \pm 0.0							
ME41							19 \pm 0.2			
ME42			4 \pm 0.0				20 \pm 0.1			
ME48			4 \pm 0.0							
ME50			4 \pm 0.0							
ME51			12 \pm 0.0							
ME52			10 \pm 0.0							
ME55			12 \pm 0.0				20 \pm 0.2			
ME73			10 \pm 0.0							
ME80							6 \pm 0.0			
ME81	2 \pm 0.0									
ME82	7 \pm 0.0		14 \pm 0.1				20 \pm 0.1			
ME87			11 \pm 0.1			2 \pm 0.0	20 \pm 0.2			10 \pm 0.0
ME89			9 \pm 0.0				10 \pm 0.1			
ME95	4 \pm 0.0						18 \pm 0.1			
ME96	2 \pm 0.0									
ME98	2 \pm 0.0	3	10 \pm 0.0						2 \pm 0.0	
ME99	9 \pm 0.0	2	23 \pm 0.3		6 \pm 0.0				3 \pm 0.0	
ME100			4 \pm 0.0							
ML102			2 \pm 0.0		4 \pm 0.0					
ML103			7 \pm 0.0							
ML104	6 \pm 0.0		8 \pm 0.0		7 \pm 0.0					
SE36			10 \pm 0.1							
SE38			8 \pm 0.0							
SE39			9 \pm 0.1							
SE43			8 \pm 0.0				20 \pm 0.5			
SE44			6 \pm 0.0							
SE46			2 \pm 0.0							
SE47			2 \pm 0.0							
SE53			8 \pm 0.0							

Aislados de SH		Cepas diana			
SE54		6±0.0			
SE88				18±0.1	
SE91		10±0.1	6±0.0	20±0.0	
SE92		12±0.2			
SE94	5±0.0	6±0.0	12±0.0		
SE97	2±0.0				
SL101		2±0.0			
SL105	4±0.0	12±0.1	7±0.0		
SL106		10±0.0	7±0.0	2±0.0	
SL108	7±0.0	10±0.0	6±0.0		26±0.3
SRE56		2±0.0			
SRE57		4±0.0			8±0.0
SRE58		6±0.0			
SRE59		2±0.0			
SRE60		8±0.1			10±0.0
SRE61		7±0.0			24±0.4
SRE62		4±0.0			18±0.2
SRE63		2±0.0			
SRE65		12±0.1			
SRE66		10±0.0			
SRE67		6±0.0			
SRE78			4±0.0	12±0.2	
SRE79				4±0.0	7±0.0
SRE83	2±0.0				
SRE84				10±0.3	
SRE85		10±0.0		20±0.3	
SRE86				7±0.0	
SRL107		12±0.0	5±0.0	7±0.0	
SRL109			2±0.0		
SRL110			2±0.0		
SRL111		8±0.0	6±0.0		
SRL112		8±0.0	8±0.0		
SRL113		8±0.0	4±0.0	2±0.0	
SRL114		10±0.0	4±0.0		
SRL115		12±0.3			
SRL116		6±0.0	6±0.0	4±0.0	
SRL117		6±0.0	10±0.0	8±0.0	5±0.0
SRL118		4±0.0		2±0.0	
SRL119		10±0.0	9±0.3		
SRL68		8±0.0			
SRL69		10±0.0	2±0.0		
SRL70		6±0.0			
SRL71					
SRL72	4±0.0	2±0.0			
SRL74		8±0.0	4±0.0		
SRL75		14±0.2			
SRL76		7±0.0	4±0.0		
SRL77		2±0.0			14±0.5

1838: *Streptococcus* sp, 1875: *Edwardsiella tarda*, 331 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, G7: *Vibrio parahaemolyticus*, 346: *Aeromonas salmonicida*, 347: *A. hydrophila*, 696: *Listonella anguillarum*, 375: *Shewanella haliotis*, Cf: *Citrobacter freundii*, Es: *Enterobacter* sp.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales (SH) frente a patógenos de humanos y bacterias formadoras de biopelículas (Datos expresados en mm como la media \pm desviación estándar de los ensayos por triplicado).

Aislados de SH		Cepas diana				
ID	ScH3	ATCC14028	ATCC14990	10D	11M	
ME52			4 \pm 0.0			
ML10					4 \pm 0.0	
ML11			4 \pm 0.1		6 \pm 0.2	
ML12					2 \pm 0.0	
ML14					2 \pm 0.0	
ML19					2 \pm 0.0	
ML20		2 \pm 0.0			5 \pm 0.0	
ML9				20 \pm 0.5		
SE38			4 \pm 0.0			
SL23		4 \pm 0.0			6 \pm 0.3	
SRE56						
SRE61			6 \pm 0.0			
SRL107	6 \pm 0.7					

ScH3: *Aeromonas caviae*, ATCC14028: *Salmonella enterica*, ATCC14990: *Staphylococcus epidermidis*, 10D: *Aestuariibacter* sp., 11M: *Alteromonas mediterranea*.

En cuanto a las cepas blanco, nueve de los patógenos acuícolas mostraron sensibilidad frente a las bacterias de origen termal, siendo *P. damselae* subsp *damselae* la más sensible con 61 casos de inhibición con halos desde 2 mm hasta 26 mm de diámetro. Este es uno de los patógenos bacterianos más devastadores en la acuicultura marina, al tratarse de una bacteria que prevalece a temperaturas de 37 °C utilizando los sedimentos marinos como reservorio y el agua de mar como vehículo de transmisión de infecciones. Como ejemplo de afecciones que ocasiona, se incluyen la pasteurelisis en organismos marinos y úlceras o septicemias en humano a causa de la exposición en heridas cutáneas superficiales en contacto al medio marino, en ambos casos puede llegar a provocar la muerte del individuo (Botella *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2013). Otra cepa sensible fue *Listonella anguillarum* (*Vibrio*), una bacteria marina patógena de un gran número de organismos acuáticos, incluidas especies de importancia en la industria acuícola como camarón, bivalvos y peces, causando ulceraciones internas y externas, distensión abdominal, letargo, pérdida de apetito, necrosis y eventualmente la muerte (Hickey & Lee, 2018). Por otro lado, bacterias formadoras de biopelículas como *Aestuariibacter* sp. se adhieren a sustratos sumergidos, como es el caso de embarcaciones, muelles, plataformas marinas y sistemas acuícolas; estas bacterias son pioneras en el proceso de sucesión de las comunidades que forman el conocido “*biofouling*” que incluye bacterias, microalgas, esporas, larvas y macroorganismos, lo cual causa deterioro y problemas económicos principalmente para la industria naviera, petrolera y acuícola (Moura *et al.*, 2018; Erni-Cassola *et al.*, 2020). Por lo que los resultados obtenidos en este estudio muestran un buen potencial para atender la problemática que causan estos microorganismos en las diferentes industrias.

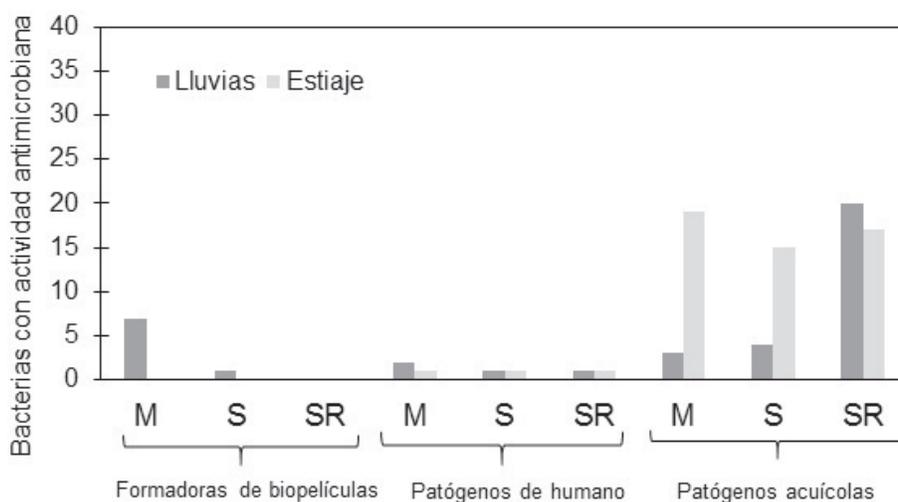


Figura 2. Número de bacterias con actividad antimicrobiana de acuerdo con el sitio de recolecta (M: Mapachitos, S: Santispac, SR: El Sargento), temporada de obtención y cepa diana.

Tabla 4. Identificación molecular de las bacterias aisladas de los sistemas hidrotermales que mostraron mayor actividad antibacteriana.

ID	Especie más cercana	% de identidad	Sitio de recolecta	Muestra	Temporada
SRE61	<i>Bacillus firmus</i>	100	El Sargento	Sedimento	Estiaje
ME87	<i>Bacillus sonorensis</i>	99	Mapachitos	Sedimento	Estiaje
SL108	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99	Santispac	Sedimento	Lluvias
SE88	<i>Virgibacillus salarius</i>	99	El Sargento	Sedimento	Estiaje
ME99	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	98	Mapachitos	Sedimento	Estiaje

Tabla 5. Bacterias aisladas de sistemas hidrotermales que presentan actividad antimicrobiana frente a cepas blanco respecto al sitio de obtención.

Sitio	Bacterias aisladas	Número de bacterias con actividad antimicrobiana	Porcentaje de bacterias con actividad antibacteriana
Mapachitos	45	29	64
Santispac	34	20	58
El Sargento	41	38	92
Total	120	87	73

Tabla 6. Bacterias aisladas de sistemas hidrotermales que presentan actividad antimicrobiana frente a las cepas diana respecto a la temporada de obtención y sitio de recolecta.

Sitio	Bacterias aisladas		Número de bacterias con actividad antibacteriana		Porcentaje de bacterias con actividad antibacteriana	
	Lluvias	Estiaje	Lluvias	Estiaje	Lluvias	Estiaje
Mapachitos	21	24	10	19	48	79
Santispac	14	20	5	15	35	75
El Sargento	23	18	21	17	91	94
Total	58	62	36	51	62	82

Al parecer, las bacterias con actividad antagonista que se desarrollan en El Sargento no están afectadas por la época (lluvia o estiaje) pues en ambos casos se obtuvo un número considerable de este tipo de bacterias, sin embargo, para los otros sitios el estiaje parece influenciar la presencia de bacterias con bioactividad contra los patógenos probados. Esto pudiera estar relacionado a que El Sargento es una localidad con playas arenosas que cuentan con manifestaciones termales constantes a lo largo de su línea de costa (Nava-Sánchez *et al.*, 1995), con temperaturas registradas en el momento de las recolectas, que oscilan entre los 45 y 70 °C, sin presentar emanaciones con fluido termal que pudieran tener un efecto sobre las variaciones en estas comunidades microbianas.

Debido a que un mayor número de aislados fueron activos contra patógenos de peces, estos resultados nos brindan la oportunidad de dirigir futuros estudios para su uso potencial en sistemas acuícolas,

tanto de agua dulce como salada, teniendo mayor interés en las cepas identificadas como *Bacillus firmus*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Virgibacillus salarius* y *Brevibacillus thermoruber* que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *Photobacterium damsela* subsp *damsela* y *Listonella anguillarum*.

Se concluye que las bacterias provenientes de sistemas hidrotermales poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos acuícolas, humanos y formadoras de biopelículas marinas convirtiéndose en una alternativa para el uso de antibióticos.

REFERENCIAS

- AHIRE, J. J., M. S. KASHIKAR, S. G. LAKSHMI & R. MADEMPUDI. 2020. Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. *3 Biotech* 10: 112-113.

- ANTRANIKIAN, G., C. E. VORGAS & C. BERTOLDO. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 96: 2019-262.
- AYUNINGRUM, D., S. I. MUCHLISSIN, A. TRIANTO, O. K. RADJASA & A. SABDONO. 2020. Crude extract from a hardcoral-associated bacterium *Virgibacillus salarius* PHC-44-04 inhibiting growth of Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* human pathogen. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry* 18 (2): 78-83.
- BLUNT, J. W., B. R. COPP, R. A. KEYZERS, M. H. MUNRO & M. R. PRINSEP. 2012. Marine natural products: review article. *Natural Product Reports* 29 (2): 144-222.
- BOTELLA, S., M. J. PUJALTE, M. C. MACIÁN, M. A. FERRÚS, J. HERNÁNDEZ & E. GARAY. 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology* 93 (4): 681-688.
- BUTLER, M. S. 2008. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports* 25 (3): 475-516.
- CACCAMO, D., C. GUGLIANDOLO, E. STACKEBRANDT & T. MAUGERI. 2000. *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2009-2012.
- CERQUEIRA, T., C. BARROSO, H. FROUFE, C. EGAS & R. BETTENCOURT. 2018. Metagenomic signatures of microbial communities in deep-sea hydrothermal sediments of Azores vent fields. *Microbial Ecology* 76 (2): 387-403.
- CHOPRA, L., G. SINGH, V. CHOUDHARY & D. K. SAHOO. 2014. Sonorensin: an antimicrobial peptide, belonging to the heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (10): 2981-2990.
- DEDE, B., C. T. HANSEN, R. NEUHOLZ, B. SCHNETGER, C. KLEINT, S. WALKER, S. W. BACH, R. AMANN & A. MEYERDIERKS. 2022. Niche differentiation of sulfur-oxidizing bacteria (SUP05) in submarine hydrothermal plumes. *The ISME Journal* 16:1479-1490. DOI:10.1038/s41396-022-01195-x
- ERNI-CASSOLA, G., R. J. WRIGHT, M. I. GIBSON & J. A. CHRISTIE-OLEZA. 2020. Early colonization of weathered polyethylene by distinct bacteria in marine coastal seawater. *Microbial Ecology* 79 (3): 517-526.
- EYÞÓRSÓTTIR, A. 2007. Bioprospecting for antimicrobial activity at the hydrothermal vent site in Eyjafjörður. Tesis Doctoral, University of Akureyri, Islandia. 84p.
- FERRER, M., O. GOLYSHINA, A. BELOQUI & P. N. GOLYSHINA. 2007. Mining enzymes from extreme environments feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microbiology Ecology* 59 (3): 476-486.
- FORREST, M. J., J. LEDESMA-VÁZQUEZ, W. USSLER III, J. T. KULONGOSKI, D. R. HILTON & H. G. GREENE. 2005. Gas geochemistry of a shallow submarine hydrothermal vent associated with the El Requesón fault zone, Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology* 224 (1-3): 82-95.
- GIOVANNELLI, D., G. D'ERRICO, E. MANINI, M. YAKIMOV & C. VETRIANI. 2013. Diversity and phylogenetic analyses of bacteria from a shallow-water hydrothermal vent in Milos Island (Greece). *Frontiers in Microbiology* (4): 184.
- GUGLIANDOLO, C., V. LENTINI, A. SPANÒ & T. L. MAUGERI. 2012. New bacilli from shallow hydrothermal vents of Panarea Island (Italy) and their biotechnological potential. *Journal of Applied Microbiology* 112 (6): 1102-1112.
- GUTIÉRREZ-ALMADA, K., B. GONZÁLEZ-ACOSTA, J. M. BORGES-SOUZA & R. N. AGUILA-RAMÍREZ. 2020. Marine bacteria associated with shallow hydrothermal systems in the Gulf of California with the capacity to produce biofilm inhibiting compounds. *Archives of Microbiology* 202 (6): 1477-1488.
- HICKEY, M. E. & J. L. LEE. 2018. A comprehensive review of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture* 10 (3): 585-610.
- HUA, N. P., A. HAMZA-CHAFFAI, R. H. VREELAND, H. ISODA & T. NAGANUMA. 2008. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2409-2414.
- JIA, B., G. W. CHEONG & S. ZHANG. 2013. Multifunctional enzymes in archaea; promiscuity and moonlight. *Extremophiles* 17 (2): 193-203.
- KHIYAMI, M. A., E. A. SEROUR, M. M. SHEHATA & A. H. BAHKLIA. 2012. Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* 11 (17): 4053-4062.
- LEAL-ACOSTA, M. L. & R. M. PROL-LEDESMA. 2016. Caracterización geoquímica de las manifestaciones termales intermareales de Bahía Concepción en la Península de Baja California. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 68: 395-407.
- LENTINI, V., C. GUGLIANDOLO, B. BUNK, J. OVERMANN & T. L. MAUGERI. 2014. Diversity of prokaryotic community at a shallow marine hydrothermal site elucidated by Illumina sequencing technology. *Current Microbiology* 69: 457-466.
- MARS-BRISBIN, M., A. E. CONOVER & S. MITARAI. 2020. Influence of regional oceanography and hydrothermal activity on protist diversity and community structure in the Okinawa Trough. *Microbial Ecology* 80 (4): 746-761.
- MAUGERI, T. L., C. GUGLIANDOLO, D. CACCAMO, A. PANICO, L. LAMA, A. GAMBACORTA, & B. NICOLAUS. 2002a. A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnology Letters* 24 (7): 515-519.
- MAUGERI, T. L., C., GUGLIANDOLO, D. CACCAMO & E. STACKEBRANDT. 2002b. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Systematic and Applied Microbiology* 25 (3): 450-455.
- MAUGERI, T. L., V. LENTINI, C. GUGLIANDOLO, F. ITALIANO, S. COUSIN & E. STACKEBRANDT. 2009. Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy). *Extremophiles* 13 (1): 199-212.
- MAUGERI, T. L., V. LENTINI, C. GUGLIANDOLO, S. COUSIN & E. STACKEBRANDT. 2010a. Microbial diversity at a hot, shallow-sea hydrothermal vent in the southern Tyrrhenian Sea (Italy). *Geomicrobiology Journal* 27 (5): 380-390.

- MAUGERI, T. L., G. BIANCONI, F. CANGANELLA, R. DANOVARO, C. GUGLIANDOLO, F. ITALIANO, V. LENTINI & E. MANINI. 2010b. Shallow hydrothermal vents in the southern Tyrrhenian Sea. *Chemistry and Ecology* 26 (S1): 285-298.
- McFALL, JR., W. T. SHOULARS & R. A. CARNEVALE. 1968. Effect of vancomycin on inhibition of bacterial plaque. *Journal of Dental Research* 47 (6): 1195-1195.
- MEIER, D. V., P. PJEVAC, W. BACH, S. MARKERT, T. SCHWEDER, J. JAMIESON, S. PETERSEN, R. AMANN & A. MEYERDIERKS. 2019. Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environmental Microbiology* 21 (2): 682-701.
- MOHANDASS, C., R. RAJASABAPATHY, C. RAVINDRAN, A. COLACO, R. S. SANTOS & R. M. MEENA. 2012. Bacterial diversity and their adaptations in the shallow water hydrothermal vent at D. Joao de Castro Seamount (DJCS), Azores, Portugal. *Cahiers de Biologie Marine* 53: 65-76.
- MOURA, V., I. RIBEIRO, P. MORIGGI, A. CAPÃO, C. SALLES, S. BITATI & L. PROCÓPIO. 2018. The influence of surface microbial diversity and succession on microbiologically influenced corrosion of steel in a simulated marine environment. *Archives of Microbiology* 200 (10): 1447-1456.
- NAVA-SÁNCHEZ, E., R. CRUZ-OROZCO & D. S. GORSLINE. 1995. Morphology and sedimentology of two contemporary fan deltas on the southeastern Baja California Peninsula, Mexico. *Sedimentary Geology* 98 (1-4): 45-61.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). 1993. *Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard M2-A5*. Villanova, PA: NCCLS.
- OJHA, P., N. P. KAR, S. NAYAK, A. K. PATRA & K. K. SAHOO. 2021. Isolation of a broad spectrum antimicrobial producing thermophilic *Bacillus* and characterization of its antimicrobial protein. *Archives of Microbiology* 203 (5): 2059-2073.
- PAKPITCHAROEN, A., K. POTIVEJKUL, P. KANJANAVAS, S. AREEKIT & K. CHANSIRI. 2008. Biodiversity of thermotolerant *Bacillus* sp. producing biosurfactants, biocatalysts, and antimicrobial agents. *Science Asia* 3: 424-431.
- PROL-LEDESMA, R. M., M. A. CANET, M. J. TORRES-VERA & M. A. FORREST. 2004. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, México. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 137: 311-328.
- PROL-LEDESMA, R. M. & C. CANET. 2014. Evaluación y Explotación de los Recursos Geotérmicos del Océano. In: Low-Pfeng, A. & E.M. Peters-Recagno (eds.). *La Frontera Final: El Océano Profundo*, SEMARNAT, INECC. México, pp. 11-30.
- RADCHENKOVA, N., A. TOMOVA & M. KAMBOUROVA. 2011. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25 (1): 77-79
- RAVINDRAN, C., G. R. VARATHARAJAN, R. RAJASABAPATHY & R. A. SREEPADA. 2016. Antibacterial activity of marine *Bacillus* substances against *V. cholerae* and *S. aureus* and *in vivo* evaluation using embryonic zebrafish test system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 78 (3): 417-422
- REED, C. J., H. LEWIS, E. TREJO, V. WINSTON & C. EVILIA. 2013. Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* 113:373275. DOI: 10.1155/2013/373275.
- RHEIMS, H., F. A. RAINEY & E. STACKEBRANDT. 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of Industrial Microbiology* 17 (3): 159-169.
- RIVAS, A. J., M. L. LEMOS & C. R. OSORIO. 2013. *Photobactrium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology* 4: 283.
- RODRÍGUEZ-VALDEZ, G. 2017. Actividad antimicrobiana e inmunostimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, BCS, México. 118 p.
- RODRÍGUEZ-URIBE, M. C., F. J. NÚÑEZ-CORNÚ & R. M. C. DAGOSTINO. 2018. Contribuciones al estudio de los sistemas hidrotermales submarinos someros en México. *Biblio3W Revista Bibliográfica de Geografía y Ciencias Sociales* 23 (1241): 1-23.
- SAMBROOK, J. & D. W. RUSSELL. 2006. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using formamide. *Cold Spring Harbor Protocols* (1): pdb-prot3225.
- SCALA, A., A. PIPERNO, A. HADA, S. ASTILEAN, A. VULPOI, G. GINESTRA, A. MARINO, A. NOSTRO, V. ZAMMUTO & C. GUGLIANDOLO. 2019. Marine bacterial exopolymers-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles with antimicrobial properties. *Polymers* 11 (7): 1157.
- SUN, Q. L., M. Q. WANG & L. SUN. 2015. Characteristics of the cultivable bacteria from sediments associated with two deep-sea hydrothermal vents in Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31 (12): 2025-2037.
- TARASOV, V. G., A. V. GEBRUK, A. N. MIRONOV & L. I. MOSKALEV. 2005. Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chemical Geology* 224 (1-3): 5-39.
- ULYANOVA, V., R. S. MAHMUD, E. DUDKINA, V. VERSHININA, E. DOMANN & O. ILINSKAYA. 2016. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two *Bacillus* strains. *The Journal of General and Applied Microbiology* 62 (4): 181-188.
- VAN DOVER, C. 2000. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press. 425 p.
- VILLANUEVA-ESTRADA, R. E., R. M. PROL-LEDESMA, I. S. TORRES-ALVARADO & C. CANET. 2005. Geochemical modeling of a shallow submarine hydrothermal system at Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Proceedings World Geothermal Congress: Antalya, Turkey* 24-29:1-5.
- YOHANDINI, H., JULINAR & MUHARNI. 2015. Isolation and Phylogenetic Analysis of Thermophile Community Within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences* 22: 143-148.
- WILSON, Z. E. & M. A. BRIMBLE. 2009. Molecules derived from the extremes of life: A decade later. *Natural Product Reports* 38 (1): 24-82.