

Bacterias marinas antagonistas de *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, agentes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Galaviz Silva, L., Molina Garza, Z.J., Iracheta Villarreal, J.M., Mercado Hernández, R.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza Nuevo León. CP. 66455, México.

RESUMEN:

Este estudio tuvo como objetivo la identificación de microorganismos marinos de las costas mexicanas que presenten actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, conocidos en el ámbito mundial por ser agentes de intoxicación alimentaria. Se colectaron muestras representativas de algas, sedimentos salinos, crustáceos y moluscos. De las 42 cepas probadas, 15 inhibieron estos patógenos. La secuenciación del gen 16S rRNA identificó solo cepas de *Bacillus*. Las cepas con la actividad inhibitoria más alta contra *S. aureus* fueron *B. aerius* y *B. pumilus*. Las cepas *B. pumilus*, *B. altitudinis* y *B. oryzicola* mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra *V. parahaemolyticus*. Este es el primer estudio del aislamiento de *B. aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis*, *B. boroniphilus* y *B. altitudinis* de ecosistemas marinos en México, así como el primer estudio que reporta sus efectos inhibidores contra *S. aureus* y *V. parahaemolyticus*. Los compuestos activos de los antagonistas se están identificando y evaluando actualmente. Los ecosistemas marinos tienen la mayor diversidad bacteriana asociada con invertebrados y algas; sin embargo, esta diversidad bacteriana no ha sido bien estudiada en las costas mexicanas..

ABSTRACT:

This study identified marine microorganisms from Mexican coasts that had antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*, which are known worldwide to be food-poisoning agents. Representative specimens of algae, saline sediment, crustaceans and mollusks were collected. Of the 42 tested strains, 15 inhibited these pathogens. 16S rRNA gene sequencing identified only *Bacillus* strains. The strains with the highest inhibitory activity against *S. aureus* were *B. aerius*, and *B. pumilus*. Strains *B. pumilus*, *B. altitudinis*, and *B. oryzicola* showed higher antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus*. This is the first study to isolate *B. aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis*, *B. boroniphilus*, and *B. altitudinis* from marine ecosystems in Mexico as well as the first study to report their inhibitory effects against both *S. aureus* and *V. parahaemolyticus*. The active compounds of the antagonists are currently being studied and tested. Marine ecosystems have the highest bacterial diversity associated with invertebrates and seaweed; however, this bacterial diversity has not been well studied on Mexican coasts..

Palabras clave:

Bacillus, antagonistas, ecosistemas marinos, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Bacillus, antagonistic, marine ecosystems, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Numerosas enfermedades son causadas por la acción directa de microorganismos patógenos, ya sea por medio de una infección, dada por la colonización y crecimiento microbiano; o por una intoxicación, debida a la ingesta de sustancias conocidas como toxinas, las que causan al hombre un desequilibrio en su salud, ocasionando serias complicaciones. El uso de antibióticos contra estas enfermedades es la alternativa convencional que se recomienda para mejorar la salud humana, pero con el transcurso del tiempo se ha hecho mal uso de estos fármacos, permitiendo el desarrollo de microorganismos resistentes al antibiótico tradicional referido para su tratamiento. Esto ha llevado a un aumento considerable de enfermedades por microorganismos patógenos, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas en contra de estos microorganismos patógenos resistentes (Ahmad & Beg, 2000; Mesa *et al.*, 2004).

Una de las alternativas para combatir la emergencia de patógenos resistentes, es el uso de microorganismos provenientes de ecosistemas marinos. Estos microorganismos poseen una gran cantidad y variedad de sustancias producidas como metabolitos secundarios, los cuales son capaces de frenar el crecimiento de otros microorganismos. Esto podría proveer una forma de combatir a los microorganismos patógenos resistentes de antibióticos, por lo que es importante el estudio de la microbiota marina y su capacidad antagonista frente a estos microorganismos (Bernan *et al.*, 1997; Reichenbach, 2001). El aislamiento de microbiota con propiedades antimicrobianas e incluso anticancerígenas nos proporciona un panorama favorable para la búsqueda de nuevas vías para combatir los brotes actuales, y posibles, de enfermedades por microorganismos patógenos resistentes a antibióticos. (Cetina *et al.*, 2010).

Hipótesis:

La microbiota de ecosistemas marinos posee propiedades antagonistas frente a microorganismos de importancia clínica.

Objetivo:

Identificar microorganismos que presenten una respuesta antagonista frente a microorganismos causantes de enfermedades en humanos provenientes de muestras colectadas en ecosistemas marinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la búsqueda de bacterias antagonistas en algas, sedimento salino, crustáceos y moluscos; se realizaron muestreos en los siguientes puntos: Bahía de Lobos (27°15'42.0"N 110°25'34.6"W) y Bahía de Guasimas (27°15'42.0"N 110°25'34.6"W) en el estado de Sonora, y Playa del Carmen, Quintana Roo, México (Figura 1). Las muestras fueron procesadas y sembradas en medios de cultivo agar soya tripticasa (TSA) NaCl 2% y Agar Marino (AM). Las muestras de jaiba, almeja, caracol chino rosa y cangrejo ermitaño recibieron un procesamiento posterior, realizándose una disección de estos ejemplares para retirarles el caparazón o concha que los protegía, en condiciones estériles. Estas muestras, junto con las de algas y sedimento, fueron procesadas triturándolas con un mortero estéril, posteriormente pasando un gramo de esta a un tubo con solución salina, al que después se haría una serie de diluciones seriadas, donde las diluciones 10^2 y 10^3 se sembraron en medios de TSA NaCl 2% y AM e incubaron a 33°C por 48 h. Posteriormente, se seleccionaron las colonias microbianas con base en la morfología colonial de cada cepa para obtener cultivos axénicos.

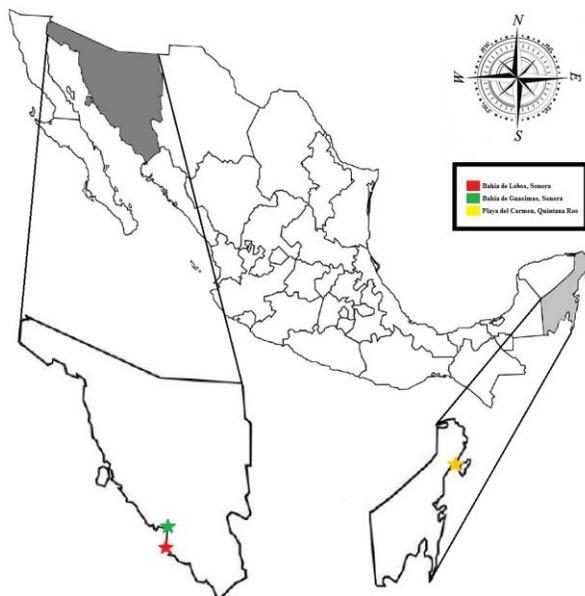


Figura 1. Área de las muestras colectadas (recuadro negro).

Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados microbianos

A los microorganismos aislados se les realizó una tinción de Gram y observación al microscopio en 1000x para diferenciar su morfología; así mismo se sembraron en diferentes medios y caldos para ver sus características de propagación en agar marino (AM), agar soya tripticasa (TSA) + 2% NaCl, agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y TSB 2% NaCl). Se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa.

Evaluación de la actividad antagónica de los aislados microbianos

Se evaluó la respuesta antagónica frente a bacterias patógenas para el hombre: *Staphylococcus aureus* (aislada de paciente) y *Vibrio parahaemolyticus* ATCC; proporcionadas por el laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se utilizó el método de estría cruzada (Saha y Santra, 2014) como se muestra en la Figura 2. A partir de cultivos de 18-24 horas en placas de TSA (2% NaCl) de las cepas reactivadas, se tomaron de 3-5 colonias microbianas y se preparó una suspensión de 1 mL con solución salina estéril a una escala 1.0-1.5 de McFarland. Se realizó en el centro de las placas de TSA (2% NaCl), una estría longitudinal con un hisopo estéril impregnado con la bacteria a evaluar, y se incubará por 48 horas a 28-32 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron canales por donde pasaron las bacterias a desafiar utilizando un hisopo estéril. Se preparó del mismo modo una suspensión con estas bacterias y se sembró una estría simple en un ángulo de 90° atravesando la zona del microorganismo aislado. Se incubará por 24 h a 28-32 °C y se observaron los resultados, con la medición de zonas de inhibición que se hayan obtenido empleando un vernier (Dunlap *et al.* 2016).

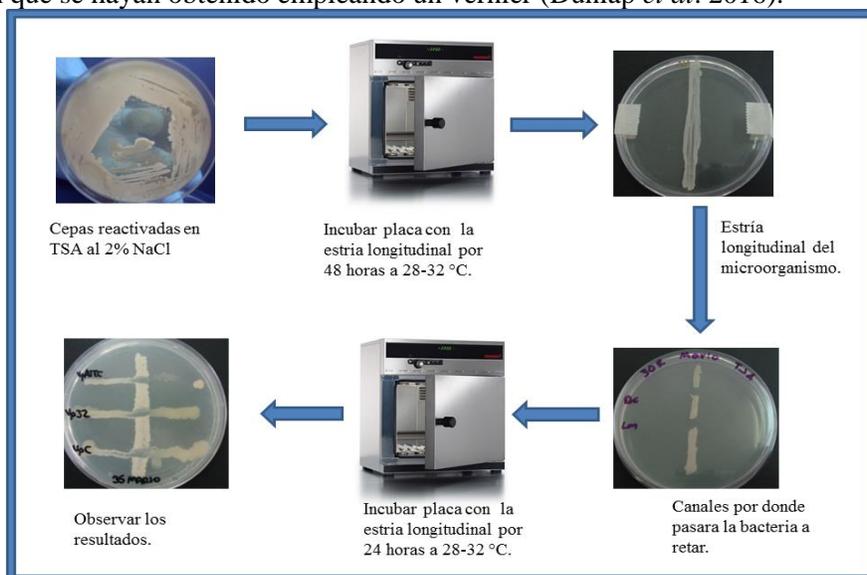


Figura 2. Diagrama de la evaluación de la actividad antagónica.

Identificación de las cepas aisladas por medio de biología molecular

Los microorganismos que resultaron positivos para actividad antagonista fueron enviados a la empresa Macrogen, Inc. (Korea) para ser sometidos a una secuenciación de la región 16S rRNA para identificar su especie, utilizando los primers 785F y 907R para este proceso (Lane, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras colectadas se pueden observar en la Tabla 1, Figuras 3, 4 y 5. Los moluscos y crustáceos procesados, los medios de cultivo y el crecimiento colonial de las diluciones, se puede observar en las Figuras 6 y 7, respectivamente.



Figura 3. Algas verdes de Bahía de Lobos.



Figura 4. Algas Rojas de Playa del Carmen



Figura 5. Jaibas colectadas de la Bahía de Lobos, en la cooperativa Comunidades Yaquis.

Tabla 1. Tipos de muestras colectadas en Bahía de Lobos, Bahía de Guasimas y Playa del Carmen.

| Localidad | Temperatura y densidad de oxígeno | Fecha de muestreo | Tipo de muestra | Nombre científico | Clave para cepa |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|---|---------------------------------|----------------------|
| Bahía de Lobos | 33°C 8.5 mg/L O ₂ | 28/08/2015 | Alga verde | <i>Enteromorpha</i> sp. | BLAV |
| | | | Alga marrón | <i>Gracilariopsis</i> sp. | BLAN |
| | | | Sedimento café | - | BLSC |
| | | | Sedimento oscuro | - | BLSN |
| | | | Jaiba (intestino, branquias y hepatopáncreas) | <i>Callinectes arcuatus</i> | BLJI BLJB BLHP |
| | | | Caracol grande | <i>Natica chemnitzii</i> | BLIC |
| | | | Baba de medusa | <i>Stomolophus meleagris</i> | GBM |
| Guasimas | 31°C 7.8 mg/L O ₂ | 29/08/2015 | Almeja china | <i>Veneridae iliochione</i> | GACH |
| | | | Almeja blanca | <i>Veneridae dosinia</i> | GAB |
| | | | Caracol chino rosa | <i>Phyllonotus erythrostoma</i> | GCCH |
| | | | Ostión | <i>Crassostrea</i> sp. | GO |
| | | | Cangrejo ermitaño | <i>Clibanarius panamensis</i> | GCE |
| Playa del Carmen | 31°C 8.1 mg/L O ₂ | 17/06/2016 | Alga roja globosa | Rhodophyta | G |
| | | | Alga roja delgada | Rhodophyta | D |



Figura 6. Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de las bacterias.

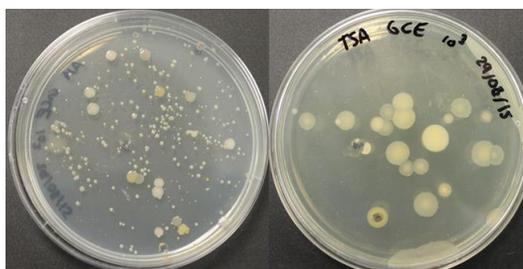


Figura 7. Crecimiento colonial después de 24 horas de incubación en agar marino y TSA.

Se aislaron 42 cepas de las 16 muestras procesadas. Todos los aislados fueron sometidos a una evaluación de actividad antagonista en contra de una cepa ATCC de *Vibrio parahaemolyticus* y un *Staphylococcus aureus* aislado de paciente por aspirado traqueal, por el método de la estría cruzada (Tabla 2). El antagonismo negativo o positivo por estría cruzada se representa en las Figuras 8 y 9.

Tabla 2. Resultados en mm de la actividad antagonista por estría cruzada de los aislados microbianos frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

| Cepa | Clave | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | | |
|------|----------|------------------------------|----|----|--------------------------------|----|----|
| | | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| 1 | BLSC-01 | A | A | A | A | A | A |
| 3 | BLSC-03 | 12 | 12 | 12 | 14 | 13 | 13 |
| 5 | BLSC-05 | 12 | 12 | 13 | 13 | 15 | 14 |
| 6 | BLJI-01 | A | A | A | A | A | A |
| 8 | BLJHP-01 | A | A | A | A | A | A |
| 9 | BLAN-01 | 18 | 17 | 17 | 13 | 13 | 14 |
| 12 | BLSN-01 | A | A | A | A | A | A |
| 13 | BLSN-02 | A | A | A | A | A | A |
| 20 | BLJHP-02 | A | A | A | A | A | A |
| 21 | BLJB-01 | A | A | A | A | A | A |
| 22 | BLJB-02 | A | A | A | A | A | A |
| 25 | BLSN-03 | 5 | 7 | 7 | A | A | A |
| 26 | BLSN-04 | 15 | 14 | 16 | 10 | 11 | 11 |
| 32 | BLAN-07 | 12 | 15 | 15 | 9 | 16 | 14 |
| 38 | BLIC-06 | 17 | 17 | 17 | 2 | 4 | 2 |
| 40 | BLSC-09 | A | A | A | A | A | A |
| 41 | GBM-02 | A | A | A | A | A | A |
| 42 | GACH-01 | A | A | A | A | A | A |
| 43 | GO-01 | 18 | 17 | 20 | 9 | 9 | 9 |
| 44 | GO-02 | 16 | 17 | 17 | 10 | 14 | 14 |
| 45 | GCE-03 | 12 | 12 | 12 | 15 | 15 | 14 |
| 46 | GCE-04 | 16 | 16 | 18 | 16 | 17 | 15 |
| 48 | GCE-06 | A | A | A | A | A | A |
| CM48 | GCE-07 | 16 | 16 | 16 | 14 | 14 | 13 |
| 50 | BLAV- | A | A | A | A | A | A |

| | | | | | | | |
|--------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 03 | | | | | | |
| 51 | BLAN-08 | A | A | A | A | A | A |
| 51T | BLAN-09 | A | A | A | A | A | A |
| 52-14 | BLJB-05 | 17 | 19 | 19 | 15 | 15 | 17 |
| 53 | GAB-01 | A | A | A | A | A | A |
| 54 | GACH-02 | A | A | A | A | A | A |
| 55 | GACH-03 | A | A | A | A | A | A |
| 56 | GCCH-01 | A | A | A | A | A | A |
| D2 | D-02 | A | A | A | A | A | A |
| D3 | D-03 | A | A | A | A | A | A |
| D5 | D-05 | A | A | A | A | A | A |
| G1 | G-01 | A | A | A | A | A | A |
| G2 | G-02 | A | A | A | A | A | A |
| G3 | G-03 | A | A | A | A | A | A |
| G4 | G-04 | A | A | A | A | A | A |
| G5 | G-05 | A | A | A | A | A | A |
| G6 | G-06 | 14 | 15 | 15 | 11 | 11 | 10 |
| G6.2 | G-07 | 21 | 20 | 19 | A | A | A |

A= Ausencia de actividad antagonista. R: Numero de repetición. Cepas con actividad resaltadas en negritas.

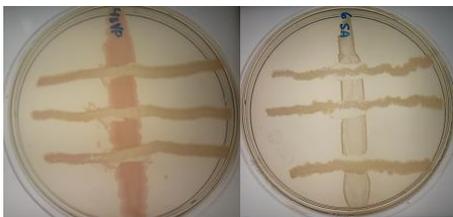


Figura 8. Resultado negativo para antagonismo.

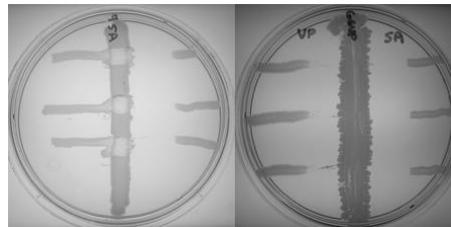
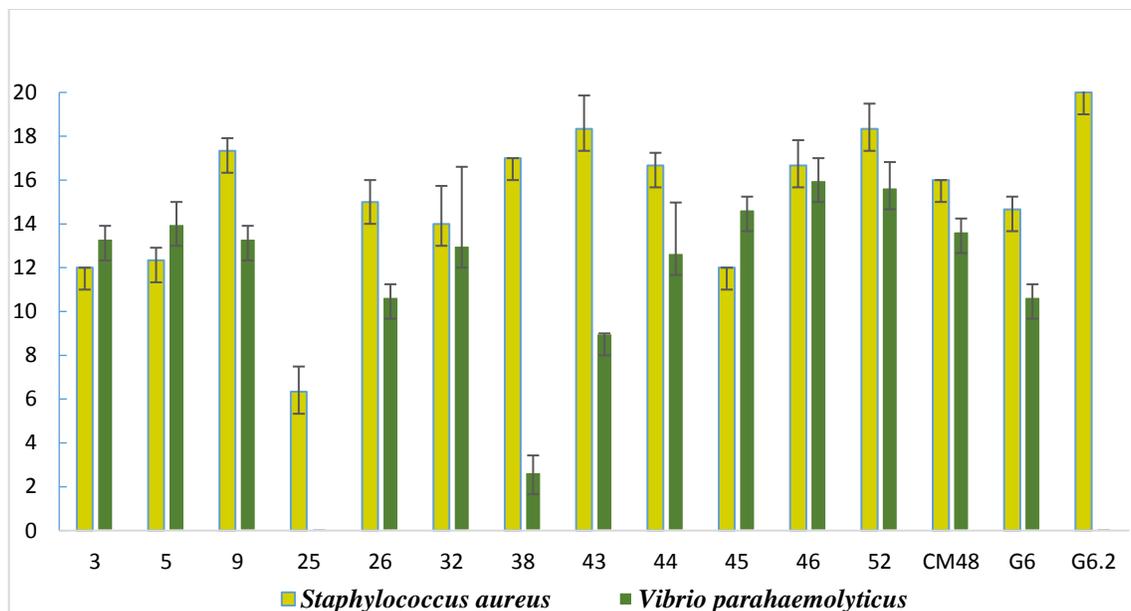


Figura 9. Resultado positivo para antagonismo.

De las 15 cepas con actividad, la que presento mayor inhibición frente a *Staphylococcus aureus* fue la cepa G6.2, la cual mostro un promedio de 20 milímetros de inhibición al momento de realizar los ensayos. Las cepas 52-14 y 46 obtuvieron los promedios más altos en contra de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC (Figura 10).



Eje vertical: milímetros

Eje horizontal: cepas aisladas con actividad antagonista

Figura 10. Resultados en mm de la actividad antagonista de los aislados microbianos contra a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* por el método de la estría cruzada.

Identificación por biología molecular a los aislados microbianos con actividad antagonista

Las especies con actividad antagonista fueron identificadas en el género *Bacillus*. Seis de las cepas fueron *B. pumilus*, tres *B. altitudinis* y las restantes *B. oryzicola*, *B. safensis*, *B. boroniphilus*, *B. paralicheniformis* y *B. aerius*. La cepa 32 fue identificada como *Bacillus lentus* por medio del kit de identificación API 50 CH (Biomerieux).

Los microorganismos aislados en esta investigación provinieron de diferentes sustratos y organismos, entre los cuales se encontraron algas verdes, rojas y marrones, sedimentos marinos, cangrejos, caracoles y jaiba. Existen reportes de cepas productoras de sustancias antibióticas aisladas de algas verdes, rojas y marrones, las cuales fueron evaluadas contra bacterias como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Vibrio*, por mencionar algunas (Lemos *et al.*, 1985; Jayanth *et al.*, 2001, 2002; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). El alga *Enteromorpha* sp. se reportó en el aislamiento de microorganismos antagonistas contra bacterias de importancia clínica y acuícola (Lemos *et al.*, 1985; Chellaram *et al.*, 2011; Wietz *et al.*, 2013). En el caso del alga *Gracilariopsis* sp., no se encontraron reportes de microbiota antagonista. Para las algas de la división Rhodophyta, solo realizaron evaluaciones de extractos crudos contra diversos microorganismos (Ambika & Sujatha, 2015). Los sedimentos marinos se reportan con presencia de microorganismos antagonistas (Lemos *et al.*, 1985; Long & Azam, 2001). Existen pocos trabajos relacionados con medusas y efectos antimicrobianos, como el de Yue *et al.* (2015), quienes evaluaron la actividad de hongos frente a bacterias y hongos. Este es el primer reporte del aislamiento de microorganismos antagonistas de *Callinectes arcuatus* (Jaiba), *Clibanarius panamensis* (Cangrejo ermitaño) y *Crassostrea* sp (ostión). La cepa G6.2, identificada por MacroGen como *Bacillus aerius*, fue identificada por la base de datos del APIweb como *Bacillus licheniformis*. Al analizar las secuencias de la cepa G6.2 en la base de datos del GenBank (NCBI), se puede observar que la especie *B. aerius* presenta mayor relación de bases que *B. licheniformis*. Bosshard *et al.* (2006), comparó el uso de API 20 NE, VITEK 2 y secuenciación del 16S rRNA para la identificación de bacilos Gram negativos, donde la secuenciación resultó ser la mejor forma de identificación de las tres. Elbanna *et al.* (2014) mencionan que, al momento de discriminar la identidad de una especie, es preferible el uso de técnicas genómicas. Esto apoya el resultado de la secuenciación del 16S rRNA de la cepa G6.2 y su identificación como *B. aerius*.

El género *Bacillus* cuenta con reportes de actividad antagonista, la cual se debe a la producción de una gran variedad de sustancias antimicrobianas, las cuales pueden ser de carácter peptídico y lipopéptido, con la capacidad de ser utilizados contra microorganismos resistentes a antibióticos. Estas sustancias son producidas cuando la bacteria termina su fase logarítmica y entra en la fase estacional, en donde los genes de esporulación comienzan a ser activados, así como los genes que codifican estas sustancias antimicrobianas (Katz & Demain, 1977; Marahaier *et al.*, 1993). Esto ayuda a corroborar el uso del método de estría cruzada al momento de evaluar la actividad antagonista. *B. lentus* y *B. pumilus* se pueden aislar habitualmente de ecosistemas marinos (Ivanova *et al.*, 2010). Jin (*et al.*, 2011) evaluó por primera vez la actividad antagonista de *B. altitudinis*, resultando positiva contra el oomiceto *Phytophthora nicotianae*. Sharma *et al.* (2006) caracterizaron una bacteriocina aislada de cepa una *B. lentus* la cual mostro actividad contra cepas de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Collins *et al.* (2016) encontraron lipopeptidos, lantipeptidos y péptidos ciclados con actividad antimicrobiana, en *B. pumilus* y *B. paralicheniformis*. La especie *B. oryzicola* presenta actividad promotora de crecimiento en plantas, así como capacidades antimicrobianas que protegen a la planta (Klopper *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2015). Este es el primer reporte de actividad antagonista frente a bacterias de importancia clínica de *Bacillus aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus*.

CONCLUSIÓN

Se aisló microbiota con capacidades antagonistas frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, aislada de sustratos y especies marinas. La cepa G6.2, identificada como *Bacillus aerius*, posee altas capacidades inhibitorias contra *Staphylococcus aureus*. La cepa 52-14, identificada como *Bacillus pumilus*, demostró una buena inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*. Además de esto, estas cepas poseen una capacidad moderada en la formación de biopelículas para su uso potencial. Este es el primer reporte del aislamiento de *B. aerius*, *B. altitudinis*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus* de ecosistemas marinos en México. Se reportó por primera vez la actividad antagonista de *B. aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus* contra bacterias de importancia clínica, por medio del método de estría cruzada.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., & Beg, A. Z. (2000). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74, 113-123.
- Ambika, S., & Sujatha, K. (2015). Antifungal activity of brown, red and green alga seaweed extracts against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., in pigeonpea var. CO (Rg) 7. *International Journal of Agricultural Sciences.* 11(2), 210-216.
- Avendaño-Herrera, R., Lody M., & Riquelme, C. E. (2005). Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en sustratos marinos. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 40(2), 117-125.
- Bernan V.S., M. Greenstein & W.M Maiese. (1997). Marine Microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.* 43, 57-90.
- Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., & Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(4), 1359-1366.
- Cetina, A., Matos, A., Garma, G., Barba, H., Vázquez, R., Zepeda-Rodríguez, A., & Lopez-A, R. (2010). Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Rev. Peru. Biol.* 17(2), 231-236.
- Chellaram, C., An, T. P., Kesavan, D., Priya, G., & Gladis, C. (2011). Enhanced cultivability of antagonistic bacterial strains from soft coral *Sinularia* sp., Gulf of Mannar, Southeastern India. *African Journal of Microbiology Research.* 5(12), 1521-1526.

- Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of Collins, F. W., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. 2016. Formicin—a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology*. 162(9), 1662-1671.
- Dunlap, C.A., Saunders L.P., & Schisler, D.A. (2016). *Bacillus nakamurai* sp. nov., a black-pigment-producing strain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66, 2987–91.
- Elbanna, K., Elnaggar, S., & Bakeer, A. (2014). Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. *Journal of Phytopathology*. 162(11-12), 712-722.
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., & Yoshikawa, S. (2010). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International microbiology*. 2(4), 267-271.
- Jayanth, K., Jeyasekaran, G., & Shakila, R. J. (2001). Biocontrol of fish bacterial pathogens by the antagonistic bacteria isolated from the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*. 21, 12-18.
- Jayanth, K., Jeyasekaran, G., & Shakila, R. J. (2002). Isolation of marine bacteria, antagonistic to human pathogens. *Indian Journal of Marine Sciences*. 31(1), 39-44.
- Jin, F., Ding, Y., Ding, W., Reddy, M. S., Fernando, W. G., & Du, B. (2011). Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(5), 3055-3071.
- Katz, E., & Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*. 41(2), 449.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94(11), 1259-1266.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. (1991). In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, 1991, 115–75.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E., & Barja, J. L. (1985). Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*. 11(2), 149-163.
- Long, R. A., & Azam, F. (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 67(11), 4975-4983.
- Marahier, M. A., Nakano, M. M., & Zuber, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*. 7(5), 631-636.
- Mesa A., A. C., Bueno S. J. G. y Betancur G. L. A. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap*. 17 (4), 325-331.
- Reichenbach H. (2001). *Myxobacteria* producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 27, 149-156.
- Sharma, N., Kapoor, G., & Neopaney, B. (2006). Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 337-343.
- Wietz, M., Duncan, K., Patin, N. V., & Jensen, P. R. (2013). Antagonistic interactions mediated by marine bacteria: the role of small molecules. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 879-891.
- Yue, Y., Yu, H., Li, R., Xing, R., Liu, S., & Li, P. (2015). Exploring the Antibacterial and Antifungal Potential of Jellyfish-Associated Marine Fungi by Cultivation-Dependent Approaches. *PloS one*, 10(12).