



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ACTIVIDAD ANTIINCRUSTANTE DE
EXTRACTOS OBTENIDOS DE
Staphylococcus aureus AISLADA DE
Rhizophora mangle

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

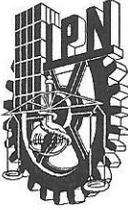
EN

MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

DIANA ELIZABETH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

LA PAZ, B.C.S., ENERO DEL 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:

para examinar la tesis titulada:

por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	SÁNCHEZ	Apellido Materno:	RODRÍGUEZ	Nombre (s):	DIANA ELIZABETH
-------------------	---------	-------------------	-----------	-------------	-----------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes: "SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

Comité tutorial


DRA. RUTH NOEMÍ AGUILA RAMÍREZ
(Directora de Tesis)
14027-EF-19 - PROFESOR DE ASIGNATURA


DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
14596-ED-19 - PROFESOR COLEGIADO


DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
14169-EF-19 - PROFESOR COLEGIADO

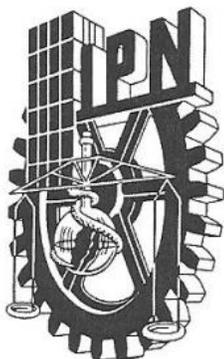

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA
(2°. Director de Tesis)
14170-ED-19 - PROFESOR COLEGIADO


DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ
12528-EE-17 - PROFESOR COLEGIADO

Presidente del Colegio de Profesores


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes de Diciembre del año 2019

El (la) que suscribe BM. DIANA ELIZABETH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180534 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. RUTH NOEMÍ AGUILA RAMÍREZ Y DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ACTIVIDAD ANTIINCRUSTANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE

Staphylococcus aureus AISLADA DE *Rhizophora mangle*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: sanchez.rodriguez08@gmail.com - noemiag72@gmail.com - mmo6709@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. DIANA ELIZABETH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Nombre y firma del alumno

“No hay fórmula secreta para el éxito, solo es el resultado de la preparación, trabajo duro y aprender de los errores”.

-Colin Powell-

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido.

Agradezco a Dios por su amor y bondad infinita, por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida; si no en todo momento ofreciéndome y buscando lo mejor para mi persona; tú, que me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda y cuando caigo poniéndome a prueba, me doy cuenta que tengo que aprender de mis errores para que mejore como ser humano y crezca de diversas maneras.

A mis papás, que fueron mis mayores promotores durante este proceso, a los que les debo más que un simple agradecimiento; ellos que siempre han estado ahí apoyándome en cada momento de mi vida, a los que siendo su única hija (mujer) decidieron soltarme para irme a estudiar lejos de casa en algo que siempre he querido y disfrutado hacer, hemos tenidos momentos buenos y malos, pero siempre han estado ahí preocupados o presionándome para que pueda ser una profesionista, una mejor y excelente persona.

A mis hermanos por el apoyo incondicional que me han brindado hasta este momento de mi vida.

Al Instituto Politécnico Nacional, por el financiamiento para este trabajo bajo la beca BEIFI y en especial al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por el apoyo de movilidad estudiantil y por permitirme ser un profesional en lo que tanto me apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación y por brindarme el conocimiento necesario para la redacción de este trabajo. También quiero agradecerle a CONACYT por el apoyo económico durante la maestría y el apoyo con la “Beca de Movilidad al Extranjero 2019”.

Agradezco de forma especial a mis directores de tesis la Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez y al Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por confiar en mí, por sus conocimientos, su orientación, su persistencia, su paciencia, su manera de trabajar y sobre todo por su

motivación a este campo de la investigación que han sido fundamentales para mi formación como investigadora, por la cual llegue a culminar y desarrolla mi tesis.

Al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular por darme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales y así darme cuenta que el campo de la microbiología es el que quiero seguir ejerciendo.

A mi comité, la Dra. Bárbara González Acosta, la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, y al Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez por las sugerencias y comentarios que me aportaron para que este trabajo se enriqueciera con su conocimiento.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, por hacerme reír y brindarme su conocimiento, sobre todo gracias a todos por esas fiestas wii que espero sigamos disfrutando y celebrando.

A mi amiga, Erika, que ha estado ahí, apoyándome en todo momento, gracias por brindarme tu amistad, por la comida hecha, por los regaños que me han enseñado que aún me faltan cosas por aprender de mi vida y hacia mi persona.

Pero sobre todo, mi mayor agradecimiento a Dios por haberme otorgado una maravillosa familia, quienes han creído en mí, siempre dándome un ejemplo de superación, humildad y sacrificio, enseñándome a valorar todo lo que tenga; porque han fomentado en mí, el deseo de superación y triunfo en la vida, lo que ha contribuido a la consecución de este logro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS -----	X
ÍNDICE DE FIGURAS -----	XI
RESUMEN -----	XII
ABSTRACT -----	XIII
1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. ANTECEDENTES -----	4
2.1. Problemática del <i>biofouling</i> -----	4
2.2. Control del <i>biofouling</i> -----	5
2.3. Propiedades <i>antifouling</i> de organismos marinos -----	7
2.4. Propiedades <i>antifouling</i> de microorganismos marinos -----	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN -----	12
4. HIPÓTESIS -----	14
5. OBJETIVOS -----	14
6. METODOLOGÍA -----	15
6.1. Obtención de <i>Staphylococcus aureus</i> -----	15
6.1.1. Identificación molecular de la especie -----	15
6.2. Preparación de extractos orgánicos -----	16
6.3. Obtención de bacterias formadoras de biopelículas -----	18
6.3.1. Trabajo de laboratorio -----	18
6.3.2. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas formadoras de biopelículas -----	19
6.3.3. Prueba de adherencia -----	20
6.3.4. Identificación molecular de bacterias formadoras de biopelículas -----	20
6.4. Ensayo de inhibición de biopelículas -----	20
6.5. Cromatografía en capa fina (CCF) -----	22
6.6. Bioensayo de Toxicidad -----	22
6.7. Bioensayo con geles inertes -----	22
6.8. Ensayo de actividad antibacteriana -----	24
6.8.1. Inhibición del crecimiento -----	24
6.8.2. Inhibición de la adhesión -----	25

6.9.	Ensayo de inhibición microalgal -----	25
6.9.1.	Inhibición de la adhesión -----	25
6.9.2.	Inhibición del crecimiento-----	26
6.10.	Ensayo de inhibición de la enzima fenoloxidasa -----	27
6.11.	Toxicidad frente a la línea celular 16HBE -----	27
6.12.	Toxicidad e inhibición de asentamiento de <i>Amphibalanus amphitrite</i> -----	28
6.12.1.	Bioensayo de toxicidad -----	28
6.12.2.	Inhibición del asentamiento de cipris de <i>A. amphitrite</i> -----	29
6.13.	Incorporación de los extractos en una matriz de pintura -----	29
6.13.1.	Ensayo en campo -----	29
6.13.2.	Evaluación del asentamiento de organismos -----	30
7.	RESULTADOS -----	31
7.1.	Identificación molecular de la cepa de estudio -----	31
7.2.	Preparación de extractos orgánicos -----	31
7.3.	Obtención de bacterias formadoras de biopelículas y prueba de adherencia -----	32
7.3.1.	Identificación molecular de las cepas estudiadas-----	33
7.4.	Ensayo de inhibición de biopelículas -----	34
7.5.	Análisis comparativo de los extractos -----	35
7.6.	Bioensayo de toxicidad aguda contra nauplios de <i>Artemia franciscana</i> -----	36
7.7.	Bioensayo con geles -----	37
7.8.	Ensayo de actividad frente a cepas de <i>Vibrio</i> -----	40
7.8.1.	Inhibición del crecimiento y adherencia -----	40
7.9.	Ensayo de actividad frente a microalgas -----	42
7.9.1.	Inhibición de la adhesión y crecimiento-----	42
7.10.	Ensayo de inhibición de la enzima fenoloxidasa -----	43
7.11.	Toxicidad frente a la línea celular 16HBE -----	44
7.12.	Toxicidad e inhibición de asentamiento de <i>Amphibalanus amphitrite</i> -----	45
7.13.	Incorporación de los extractos en una matriz de pintura -----	46
7.13.1.	Evaluación del asentamiento de organismos -----	46

8. DISCUSIÓN -----	49
Inhibición de la adherencia de bacterias formadoras de biopelículas	49
Toxicidad de los extractos orgánicos seleccionados -----	54
Actividad antiincrustante de extractos a diferentes concentraciones	54
Efecto de los extractos con mayor bioactividad frente a organismos implicados en el <i>biofouling</i> y los organismos “no-objetivo”. -----	57
Efectividad de extractos incorporados en una matriz de pintura. -----	61
9. CONCLUSIONES-----	64
10. LITERATURA CITADA -----	65
ANEXO I-----	88
ANEXO II-----	89
ANEXO III -----	90
ANEXO IV-----	91
ANEXO V-----	92
ANEXO VI-----	93
ANEXO VII-----	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desarrollo histórico de estrategias AF (Dafforn <i>et al.</i> , 2011).....	6
Tabla 2. Compuestos químicos bioactivos identificados en el extracto metanólico de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Tabla 3. Clasificación morfológica de colonias bacterianas (Tomado y modificado de https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/)19	
Tabla 4. Identificación molecular	31
Tabla 5. Rendimiento de los extractos orgánicos.....	32
Tabla 6. Clasificación morfológica y tinción Gram de bacterias aisladas que dieron positivo en la prueba de adherencia.....	33
Tabla 7. Identificación molecular de bacterias formadoras de biopelículas.....	33
Tabla 8. CL ₅₀ esperada para cada extracto y el intervalo de confianza fiducial al 95%.	36
Tabla 9. Concentración letal al 50, 70 y 90% de cada tratamiento y el intervalo de confianza fiducial al 95%.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los extractos obtenidos por cada medio de cultivo.	16
Figura 2. Estructuras de PVC que se utilizaron para fijar las placas de Phytigel.	23
Figura 3. Estructuras después del periodo de experimentación.....	24
Figura 4. Diferencias estadísticas entre los medios de cultivo.	34
Figura 5. Comparación del porcentaje de inhibición de biopelículas entre solventes y medios de cultivo.....	35
Figura 6. CCF de los extractos obtenidos de diferentes medios de cultivo.	36
Figura 7. Porcentaje de mortalidad de los nauplios de artemia con los extractos probados a diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$).	37
Figura 8. Placas de Phytigel conteniendo los diferentes extractos A) Resina, B) CHCl_3 , C) CH_2Cl_2 , D) Fase acuosa, E) CuSO_4 y F) C-.....	38
Figura 9. Promedio del área de cobertura de los tratamientos evaluados.	39
Figura 10. Porcentaje de grupo de organismos identificados en cada tratamiento ($\mu\text{g/mL}$).....	40
Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento y adherencia de las bacterias probadas.	41
Figura 12. Porcentaje de inhibición a) del crecimiento, b) adhesión de bacterias probadas.	42
Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento y adherencia de microalgas.....	43
Figura 14. Efecto de los extractos sobre la actividad cinética de la enzima tirosinasa (análoga de la fenoloxidasas).	44
Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular de 16HBE frente a los extractos.	44
Figura 16. Efecto de la inhibición de asentamiento de la cipris de <i>A. amphitrite</i>	46
Figura 17. Fotografías a los 30 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH_2Cl_2 , C) CuSO_4 y D) C-.....	46
Figura 18. Fotografías a los 60 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH_2Cl_2 , C) CuSO_4 y D) C-.....	47
Figura 19. Fotografías a los 90 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH_2Cl_2 , C) CuSO_4 y D) C-.....	47
Figura 20. Porcentaje de cobertura por grupo de organismos adheridos para cada tratamiento	48

RESUMEN

Para controlar el *biofouling* se han utilizado pinturas a base de compuestos que son tóxicos para los organismos marinos, debido a esto y al hecho de que los compuestos se vuelven persistentes en el ambiente, existe un esfuerzo intensivo hacia la búsqueda de soluciones más amigables con los organismos “no-objetivo” y que sean biodegradables. En este sentido, las bacterias han demostrado ser una fuente de compuestos con potencial antiincrustante, entre ellas una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de *Rhizophora mangle*. Se obtuvieron 15 extractos variando el medio de cultivo y los solventes utilizados para la extracción. Se seleccionaron los extractos más activos frente a bacterias formadoras de biopelícula (BFB), y con base en su comparación cromatográfica y toxicidad frente *Artemia franciscana*. Los cuatro extractos seleccionados fueron incluidos en un gel para realizar los ensayos de actividad antiincrustante a diferentes concentraciones durante 30 días. Entre los tratamientos y las concentraciones no se encontraron diferencias significativas, teniendo un promedio de 4% de cobertura con respecto al blanco (25%). Los grupos de organismos incrustantes más abundantes entre los tratamientos fueron las algas y briozoarios. Los tres extractos con los mejores resultados se evaluaron por su capacidad de inhibir BFB, microalgas, así como a la enzima fenoloxidasa y actividad tóxica frente a la línea celular 16HBE. Los extractos mostraron una tendencia a inhibir la adhesión de los microorganismos probados y son inocuos frente a la línea celular probada. Solo el extracto de CH₂Cl₂ inhibió a la enzima fenoloxidasa y se seleccionó junto con el extracto acuoso que mostró también los mejores resultados en todos los bioensayos, para ser incorporados en una matriz de pintura a la concentración más efectiva y aplicarla sobre placas acrílicas, utilizando como control pintura con cobre. La pintura con el extracto acuoso mostró una cobertura del 46%, mientras que la que contenía el extracto de CH₂Cl₂ fue de 32%, por lo que se concluye que el extracto de CH₂Cl₂ es el más efectivo para inhibir el asentamiento de organismos.

Palabras Clave: Extractos crudos, pinturas, biopelículas, inhibición de asentamiento.

ABSTRACT

To control biofouling, paints based on compounds that are toxic to marine organisms have been used, due to this and the fact that the compounds become persistent in the environment, there is an intensive effort towards finding more friendly solutions with “non-target” organisms that are biodegradable. In this sense, bacteria have proven to be a source of compounds with antifouling potential, including a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from *Rhizophora mangle*. 15 extracts were obtained by varying the culture medium and the solvents used for the extraction. The most active extracts against biofilm-forming bacteria (BFB) were selected, and based on their chromatographic comparison and toxicity against *Artemia franciscana*. The four selected extracts were included in a gel to perform antifouling activity tests at different concentrations for 30 days. Between treatments and concentrations there were no significant differences, having an average of 4% coverage with respect to the target (25%). The most abundant groups of encrusting organisms among the treatments were algae and bryozoa. The three extracts with the best results were evaluated for their ability to inhibit BFB, microalgae, as well as the enzyme phenoloxidase and toxic activity against the 16HBE cell line. The extracts showed a tendency to inhibit the adhesion of the microorganisms tested and are harmless against the cell line tested. Only the CH₂Cl₂ extract inhibited the enzyme phenoloxidase and was selected together with the extract aqueous that showed the best results in all bioassays too, to be incorporated at the most effective concentration into a paint matrix and applied on acrylic plates, using as control painting with copper. The paint with the aqueous extract showed a coverage of 46%, while the one containing the CH₂Cl₂ extract was 32%, so it is concluded that the CH₂Cl₂ extract is the most effective in inhibiting the settlement of organisms.

Keywords: Crude extracts, paints, biofilms, settlement inhibition.

1. INTRODUCCIÓN

El *fouling* es el término generalmente usado para describir el asentamiento de una alta diversidad de organismos sobre la superficie de estructuras sumergidas (Abarzua y Jakubowski, 1995; Calixto *et al.*, 2007). Algunos autores coinciden con que el *biofouling* es un fenómeno indeseable de adherencia y acumulación de depósitos bióticos sobre superficies artificiales sumergidas o en contacto con el agua de mar (Eguía, 2000; Eguía *et al.*, 2006; UICN, 2007).

Estas incrustaciones biológicas o *biofouling*, responden a un proceso natural y obedecen a un modelo de sucesión (Sauer y Baptista, 2007), que inicia en el momento en que el sustrato entra en contacto con el agua de mar y ocurre un acondicionamiento bioquímico a través de la adsorción del material orgánico disuelto, como polisacáridos, proteínas, lípidos y aminoácidos. Esto da lugar a la formación de una película que posibilita la siguiente etapa, inicialmente las bacterias pioneras se adhieren formando una biopelícula estratificada que a su vez genera señales químicas que pueden actuar como atrayentes o disuasores para el establecimiento de microalgas, esporas de algas, hongos, protozoarios y finalmente larvas de invertebrados que conforman lo que se conoce como macro-incrustación (Pawlik, 1992; Fusetani y Clare, 2006).

La fijación de estos organismos incrustantes puede perjudicar la eficiencia operacional de un barco, afectando su normal desplazamiento y produciendo un importante aumento en el consumo del combustible, este aumento podría llevar a la producción y liberación al medio ambiente de 210 millones de toneladas de CO₂ y 5.6 millones de toneladas de SO₂ (IMO-International Maritime Organization, 2002; Nobel, 2015).

En el sector acuícola, los organismos del *fouling* se adhieren a las estructuras de los cultivos deteriorando estos materiales, consecuentemente reducen el tiempo de duración (Loayza, 2011), e incrementan los costos por mantenimiento (Avendaño *et al.*, 2001; LeBlanc *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2004), que pueden llegar a representar entre 30 a 50% del costo de producción (Méndez, 2007; Loayza, 2011). Los

organismos incrustantes cubren la superficie de las linternas cilíndricas de cultivo alterando el flujo de agua (Sharp *et al.*, 2006; Hincapié-Cárdenas, 2007), disminuyen también el suministro de alimento (Uribe y Blanco, 2001; Uribe *et al.*, 2001; LeBlanc *et al.*, 2002; Villarroel *et al.*, 2003), la tasa de ingestión (Uribe y Blanco, 2001), disponibilidad de oxígeno y la depuración de residuos metabólicos (Wahl, 1989), también afectan negativamente el crecimiento y supervivencia de los organismos en cultivo (Navarro, 2001).

Además de los daños materiales que puede causar, la formación de *biofouling* puede acantonar patógenos y especies exóticas que pueden ser transportadas de forma involuntaria poniendo en riesgo la salud de ecosistemas completos (Urrutia *et al.*, 2016).

Alrededor del mundo se han empleado diversos materiales y mecanismos para controlar este fenómeno, principalmente pinturas o recubrimientos a base de metales como el estaño, el cobre, plomo, zinc y arsénico que al incorporarse a moléculas orgánicas se vuelven tóxicos (Callow y Callow, 2002), y producen efectos adversos en el crecimiento y desarrollo genital en gasterópodos (Urrutia *et al.*, 2016), generan malformaciones en las conchas de las ostras, producen acumulaciones de sustancias tóxicas dentro del organismo y debilitan el sistema inmunológico en larvas de moluscos (Yebra *et al.*, 2006).

Es por esto por lo que entró en vigor, después de 10 años de restricción, el tratado de la Organización Internacional Marítima (IMO) en el año 2008 para prohibir el uso de los productos basados en Tributilo de Estaño (TBT) (Ralston y Swain, 2009), este hecho ha obligado a muchos países a regular y restringir el uso de compuestos químicos (Champ, 2001).

Debido a esto, se ha forzado a las industrias a encontrar sustancias útiles, efectivas y selectivas para el control del *fouling*, y que no sean tóxicas para la fauna y flora marina. Se han realizado muchas investigaciones hacia la búsqueda y potencial uso de sustancias naturales con actividad *antifouling* y que muestren poca o nula toxicidad frente a organismos no objetivo con el fin de emplearlas como nuevos componentes en pinturas y recubrimientos para embarcaciones (Wahl, 1989; Clare,

1998; Arias *et al.*, 2006; Tsoukatou *et al.*, 2007). De esta forma, se han obtenido e identificado compuestos con propiedades *antifouling* a partir de bacterias, algas, esponjas, octocorales, briozoos y ascidias (De Nys *et al.*, 1995; Henrikson y Pawlik, 1995; Clare y Matsumura, 2000; Rittschof, 2000; Nylund y Pavia, 2003; Arias *et al.*, 2006).

Debido a la preocupación sobre una explotación de organismos marinos para el aprovechamiento de productos naturales y su abastecimiento (Hunt y Vicent, 2006), se ha considerado que los microorganismos marinos como las bacterias, son una fuente viable para la búsqueda de moléculas bioactivas, ya que se pueden obtener cultivos a grandes escalas para la obtención de los compuestos (Ortega-Morales *et al.*, 2008; Soliev *et al.*, 2011). Es por eso, que el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antiincrustante de los extractos orgánicos de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Problemática del *biofouling*

El *biofouling* es un problema complejo y recurrente en los sectores industriales, ya que consta de cuatro diferentes fases en las que los micro o macroorganismos se adhieren.

Primero las moléculas orgánicas, como polisacáridos, proteínas, proteoglicanos, y posiblemente compuestos inorgánicos, son rápidamente acumuladas en cada superficie, dando lugar a lo que se llama condicionamiento de la película. Este proceso es esencialmente presidido por fuerzas físicas, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals (Yebra *et al.*, 2004).

Las biopelículas o tapetes microbianos son la segunda fase del *biofouling*. Las biopelículas fueron descritas por Marshall, entre 1984 y 1992, como la colección de microorganismos y sus productos extracelulares rodeados de una superficie sólida (Sánchez y Torres, 2005), crecen principalmente sobre sustratos sólidos, como metales, vidrio, plástico, rocas, madera, micrófitos, sedimentos gruesos o suaves (Wetzel, 1975). Estas biopelículas son ensamblajes de bacterias, cianobacterias y en menor proporción, de hongos. Las formaciones de estas biopelículas se llevan a cabo en cuatro etapas: 1) agregación y adhesión reversible, 2) desarrollo, 3) maduración de la biopelícula y 4) desprendimiento (O'Toole *et al.*, 2000).

La existencia de exudados adhesivos y la aspereza de las colonias microbianas irregulares ayudan a atrapar más partículas y organismos, como esporas de algas, cipris de balanos, hongos marinos y protozoarios, algunos de los cuales pueden ser atraídos por estimulaciones sensoriales. La transición de biopelículas microbianas a una comunidad más compleja típicamente incluye productores primarios multicelulares, herbívoros y descomponedores considerados como la tercera fase del *biofouling* (Yebra *et al.*, 2004).

La cuarta y última fase envuelve el asentamiento y el crecimiento de invertebrados marinos junto con el crecimiento de macroalgas (Davies, 1995). Las características típicas de los macroorganismos incrustantes son metamorfosis

rápidas, tasas de crecimiento más rápidas y alta adaptabilidad a los diferentes ambientes (Yebra, 2004).

En este contexto, el desarrollo del *biofouling* en la industria acuícola como, por ejemplo, en las estructuras del cultivo de *Argopecten purpuratus* en Perú ocasiona impactos negativos en los bivalvos (Loayza, 2011). En el cultivo de ostras, Arakawa (1980) señala que generalmente ocurre una intensa competitividad entre los organismos del *biofouling* y las ostras, que podría significar que estas dejen de crecer, y si el grado de colonización es severo, las ostras podrían asfixiarse y morir.

Este proceso también aumenta los costos de mantenimiento y reparación de superficies sumergidas (naves, redes, balsas y jaulas) hasta a 4 billones de dólares anuales a nivel mundial, incluyendo principalmente a la industria naviera, debido a que la formación de este fenómeno ocasiona gastos sustancialmente elevados por el consumo de gasolina, corrosión y limpieza de barcos (Urrutia *et al.*, 2016).

Pero no solo afecta la rentabilidad económica de las empresas, sino también al ambiente marino; de tal modo que si el problema persistiera podría, en un mediano plazo, comprometer la viabilidad para sostener la actividad económica (Loayza, 2011).

2.2. Control del *biofouling*

A nivel mundial, dados los problemas que genera el *biofouling*, se están desarrollando estudios aplicando métodos físicos, químicos y biológicos (da Gama *et al.*, 2003). Estos van desde combatir el asentamiento inicial, prevenir el desarrollo del *fouling* y removerlo.

Dentro de los principales desarrollos se encuentran una gran variedad de esquemas de recubrimientos *antifouling* que incluyen dentro de sus matrices agentes biocidas. Sin embargo, debido al uso indiscriminado de sustancias de gran toxicidad y las consecuencias negativas que ello acarrea para el ecosistema marino progresivamente se ha ido legislando para limitar y prohibir pinturas con determinados biocidas; por ejemplo, los derivados orgánicos del estaño como el TBT (Tabla 1), por los efectos adversos que producen al ambiente (IMO, 2002). Abarzua y

Jakubowski (1995) reportan deformaciones en las valvas de *Crassostrea gigas* por efecto del TBT, y Barreiro *et al.* (2004) hacen una revisión y además demuestran que bajas concentraciones de TBT inducen la anomalía denominada imposex (superposición de rasgos masculinos en las hembras), en los gasterópodos *Nucella lapillos* y *Nassarius reticulatus*, que se refleja en la aparición de un pene y el espermaducto en las hembras (Abarzua y Jakubowski, 1995).

En la actualidad, el principal tipo de recubrimiento empleado por la industria marítima es el formulado a base de cobre, el cual es efectivo contra algas y organismos incrustantes calcáreos (Callow y Callow, 2002), pero su uso en pinturas *antifouling* (AF) está bajo escrutinio en varios países y tiene un futuro incierto (Dafforn *et al.*, 2011) (Tabla 1), ya que el comportamiento de estas pinturas depende de diversos factores, tales como, el tipo de organismos sobre los que ha de actuar, las condiciones físico-químicas de la columna de agua, entre otras (Barcia-Leal *et al.*, 1995).

Tabla 1. Desarrollo histórico de estrategias AF (Dafforn *et al.*, 2011).

Línea del Tiempo	Grandes eventos
1500 – 300 A.C.	Uso de láminas de plomo y cobre en recipientes de madera.
1800 – 1900s	Metales pesados (cobre, arsénico, mercurio) incorporados en recubrimientos.
1800s – presente	Uso continuo de cobre en recubrimientos AF.
1960s	Desarrollo del TBT en recubrimientos convencionales.
1974	Granjas de ostras reportan crecimiento anormal de la concha.
1977	Primer lanzamiento de patente AF.
1980s	El desarrollo de recubrimientos de TBT SPC permitió el control de las tasas de liberación de biocidas.
1980s	El TBT vinculado a anomalías en conchas de <i>Crassostrea gigas</i> y el imposex en <i>Nucella lapillus</i> .
1987s – 90	Revestimientos de TBT prohibidos en embarcaciones <25 m en Francia, UK, USA, Canadá, Australia, EU, NZ y Japón.
1990s – presente	Restricciones de tasa de liberación de cobre introducidas en Dinamarca y consideradas en otros países, ejem. California, USA.
2000s	Aumenta la investigación sobre alternativas AF ecológicas.
2001	IMO adopta la “Convención AFs” para eliminar al TBT de los recubrimientos AF de embarcaciones mediante:
	2003 – Prohibición de una mayor aplicación de TBT.
	2008 – Prohibición de presencia activa de TBT.
2008	IMO “Convención AFs” entró en vigor.

Debido a esto, la búsqueda de alternativas para el control del *biofouling* se ha basado en compuestos que muestren poca o nula toxicidad, por lo cual son probados frente a organismos modelo como es el caso del crustáceo *Artemia* (Castritsi-Catharios *et al.*, 2007; Koutsaftis y Aoyama, 2007; Karlsson *et al.*, 2010; Alyürük y Çavaş, 2013; Jung *et al.*, 2017), moluscos (Iyapparaj *et al.*, 2013) y cirrípedos (Rittschof *et al.*, 1992; Hellio *et al.*, 2005; Stupak *et al.*, 2003).

2.3. Propiedades *antifouling* de organismos marinos

La búsqueda de compuestos activos naturales se centra en organismos marinos como lo son algas, bacterias, esponjas y corales por nombrar algunos (Armstrong *et al.*, 2000; Rittschof, 2001). Los extractos químicos de estos organismos contienen un vasto despliegue de compuestos con actividad antibacteriana, antialgal, antilarval y otras actividades nocivas, menos definidas, que podrían ser empleadas para impedir, controlar o inducir la epibiosis (Henrikson y Pawlik, 1995).

En algunas macroalgas, por ejemplo, no existe presencia de organismos adheridos en su superficie por lo que se han considerado como una fuente para la búsqueda de compuestos que logran inhibir el *fouling*, como es el caso del alga roja *Delisea pulchra* (Greville) Montagne que produce furanonas, las cuales protegen a la planta de la colonización bacteriana y posterior formación de biopelículas microbianas y del *fouling* (de Nys *et al.*, 1995, Maximilien *et al.*, 1998). El alga parda *Sargassum wightii* (Greville) también ha presentado evidencia de que genera diotilftalato, el cual posee actividad antibacteriana (Sastry y Rao, 1995) y posiblemente sea el mismo compuesto el que le otorga las propiedades *antifouling* (Iyapparaj *et al.*, 2012).

Sánchez-Lozano *et al.*, (2019) evalúan la actividad antiincrustante de los extractos de cinco especies de macroalgas y dos especies de esponjas tanto en ensayos *in vitro* como ensayos en campo. Ellos mencionan que los extractos obtenidos de *Haliclona caerulea* y *Sargassum horridum* muestran una reducción del 32 % del *biofouling* en comparación con el control (pintura *antifouling* comercial).

Los poríferos son uno de los grupos marinos con mayor cantidad y variedad de metabolitos secundarios (Fenical, 1982; Lanza *et al.*, 2006), cuyos posibles usos van desde compuestos antibacterianos (Hu *et al.*, 2002), antitumorales, antiparasitarios, insecticidas hasta *antifouling* (Acosta y Rodríguez, 1992; García *et al.*, 1994). Lanza *et al.* (2006) aislaron un terpeno de la esponja marina *Aplysina fistularis* que mostró actividad antibacteriana. Yang *et al.* (2006) aislaron compuestos con propiedades *antifouling* de la esponja marina *Acanthella cavernosa*, los dos compuestos aislados mostraron actividad antibacteriana y la inhibición del asentamiento de poliquetos durante su etapa larval en ensayos de campo.

Las sustancias contenidas en el extracto crudo del pez globo son prometedoras ya que han mostrado actividad antiincrustante, estos organismos son parte de un grupo llamado peces con tetradoxinas. Soliman *et al.* (2014) evaluaron los extractos crudos aislados de los ovarios y mucus de dos especies de pez globo *Amblyrhynchotes hypselogenion* y *Lagocephalus sceleratus* disueltos en una matriz de pintura, y estimaron los porcentajes de cobertura de organismos adheridos, encontrando que el extracto obtenido de *A. hypselogenion* mostró los mejores porcentajes de inhibición de asentamiento.

2.4. Propiedades *antifouling* de microorganismos marinos

Los microorganismos han mostrado poseer una capacidad metabólica superior a la de los macroorganismos; además, muchos de los compuestos aislados a partir de macroorganismos son en realidad producidos por los microorganismos asociados a ellos (Bhatnagar y Kim, 2010). Las bacterias marinas, han sido consideradas con frecuencia como productoras de sustancias antibacterianas, permitiendo la estabilidad ecológica de múltiples ecosistemas marinos, así como también las interrelaciones entre microorganismos de ambientes epifíticos (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981; Lemos *et al.*, 1985; Fabregas *et al.*, 1991 en Avendaño-Herrera *et al.*, 2005).

Recientemente se han incrementado los estudios de bacterias simbiotes, ya que además se ha encontrado que producen una mayor proporción de compuestos

con actividades antibacterianas y antiincrustantes que aquellas que ocurren como formas planctónicas (de vida libre) (Hellio *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2009; Aguila-Ramírez, 2012; Ramasubburayan *et al.*, 2015). Un ejemplo de esto es la bacteria marina, *Bacillus licheniformis* aislada de la esponja *Halichondria* sp., donde el filtrado del cultivo libre de células mostró actividad antimicrobiana significativa (Devi *et al.*, 2010).

Aguila-Ramírez *et al.*, (2014) aislaron y caracterizaron 63 bacterias asociadas a la esponja marina *Aplysina gerardogreeni*, de las cuales se obtuvieron los extractos orgánicos para evaluar la actividad antimicrobiana frente a 16 bacterias y cinco microalgas conocidas como colonizadoras en el proceso de *biofouling*. Los resultados mostraron que el 87% de los extractos bacterianos fueron activos frente a los microorganismos probados.

Ramasubburayan *et al.* (2015) aislaron 157 cepas bacterianas asociadas a la raíz y rizosfera de cinco diferentes especies de mangle. De ellas, solo 14 cepas mostraron actividad en la prueba de antagonismo. Posteriormente, realizaron la extracción de metabolitos secundarios de estas cepas y evaluaron la actividad antibacteriana, antimicroalgal y antimacroincrustante, encontrando que la cepa que presentó mayor actividad fue identificada como *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (MAB6). Existen además otros reportes de metabolitos producidos por bacterias del género *Bacillus* con actividad antiincrustante aisladas de diferentes sustratos (Burguess *et al.*, 2003).

Esta misma actividad se les ha atribuido a algunas especies del género *Pseudoalteromonas* (Baumann *et al.*, 1984; Egan *et al.*, 2000 en Mateus, 2011) que previenen el asentamiento de esporas de algas y larvas de invertebrados (Dobretsov *et al.*, 2009; Holmstrom *et al.*, 2002 en Ma *et al.*, 2009).

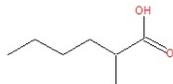
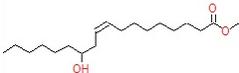
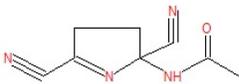
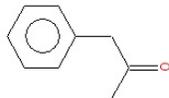
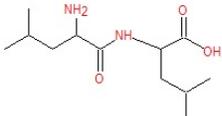
Zapata *et al.* (2007) evaluaron el efecto de 73 cepas bacterianas sobre el asentamiento larval de *Ciona intestinalis* y *Pyura praeputialis*, demostrando que el 20% de estas tienen efecto positivo sobre la inhibición del asentamiento larval.

Para el género *Staphylococcus*, se han realizado estudios en donde demuestran su capacidad para producir compuestos con actividad antimicrobiana,

como los realizados por Pakseresht y Waleed (2014) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de metabolitos producidos por *S. aureus* por el método de difusión en agar y encontraron que tiene la misma capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias que la ampicilina y Zhang *et al.* (2016) quienes aislaron una bacteria de los órganos internos de un tiburón que fue identificada como *S. epidermidis*, la cual mostró actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos.

Por otro lado Jaddoa *et al.*, (2016) identificaron compuestos orgánicos volátiles obtenidos de la cepa *S. aureus* aislada de pacientes con bronquitis con el fin de analizar los productos químicos bioactivos que produce la cepa y así poder evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana (Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos químicos bioactivos identificados en el extracto metanólico de *Staphylococcus aureus*.

ACTIVIDAD	COMPUESTOS QUÍMICOS BIOACTIVOS	ESTRUCTURA
Antimicrobiana	Ácido hexanoico, 2-methyl-	
	1-Hexadecanol -2-methyl-	
	Ácido 12-Octadecenoic, éster metílico	
	12-hidroxi-9-octadecenoato de metilo	
Antibacteriana y antifúngica	N-(2,5-Diciano-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-il)-acetamida	
	Benzil metil cetona	
Antibacteriana	I-Leucil-d-leucina	

En estudios recientes se realizó una prospección con bacterias aisladas de diferentes sustratos marinos con la finalidad de encontrar cepas productoras de compuestos con actividad *antifouling*, una de las que mostró mayor potencial fue aislada de una hoja de *Rhizophora mangle* que inhibió el crecimiento de bacterias formadoras de biopelículas en condiciones de laboratorio, con resultados muy similares a los de una pintura antiincrustante comercial utilizada como control positivo. Posteriormente, se identificó molecularmente, encontrando que se relacionaba con una especie del género *Staphylococcus*, y se determinó que el extracto de esta cepa obtenido con Resina Diaion HP-20 (metanol:acetato de etilo 1:1) incorporado a un agente gelificante tenía potencial antiincrustante, con un porcentaje de cobertura muy similar al del control positivo (óxido cuproso) (5%) (Rico-Virgen 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018).

De estos resultados surgieron nuevas preguntas de investigación que fueron retomadas en este trabajo de tesis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La biotecnología ha sido una prioridad en la búsqueda de nuevos métodos para controlar el *biofouling*, ya que, alrededor del mundo se han empleado diversos materiales y mecanismos para controlar este fenómeno, principalmente pinturas o recubrimientos que disuaden el asentamiento larval sobre la superficie tratada. Entre las sustancias químicas utilizadas para el control de este fenómeno, se destacan los metales como el estaño, el cobre, plomo, zinc y arsénico que al incorporarse en moléculas orgánicas son tóxicos, se bioacumulan y biomagnifican afectando una amplia gama de organismos y al hombre (Callow y Callow, 2002). Los diversos componentes de las pinturas *antifouling* son liberados a tasas variables, sufriendo procesos de transformación, degradación y acumulación, en diferentes cantidades a través de la red trófica, el agua y el sedimento (Rittschof, 2000; Thomas, 2001). Algunos compuestos como el Sea-Nine 211, las piritonas de zinc y el Irgarol 1051 son utilizados actualmente como alternativas al TBT. Sin embargo, estos productos presentan toxicidad y su uso masivo ha provocado que sus concentraciones en el ambiente superen los límites establecidos, por lo que han sido prohibidos en algunos países (Ranke y Jastorff, 2000; Callow y Callow, 2002).

Dada la necesidad de encontrar sustancias útiles, efectivas y selectivas para el control del *fouling* y que no sean tóxicas para la fauna y flora marina, se están realizando investigaciones hacia la búsqueda de sustancias naturales con actividad *antifouling*, con potencial uso como componentes en pinturas y recubrimientos para embarcaciones. Los productos naturales constituyen una alternativa prometedora para el control del *biofouling*. En este sentido, los compuestos de origen marino son de especial interés ya que se producen en el propio entorno oceánico y son fácilmente biodegradables, haciendo más probable encontrar sustancias con actividad *antifouling* y niveles de toxicidad aceptables (Dobretsov y Qian, 2004; Hellio *et al.*, 2004; Maréchal *et al.*, 2004; Dworjany *et al.*, 2006; Nylund *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007). Como es el caso de las bacterias, que producen compuestos con actividad antimicrobiana, antibiofilm, antimicroalgal y antilarval, entre otras, además

de tener la ventaja sobre otros organismos marinos de poder ser cultivadas a mayor escala para la obtención de los extractos o compuestos activos.

Con base en los antecedentes mencionados anteriormente sobre una cepa de *Staphylococcus* aislada del manglar con potencial actividad *antifouling*, en este trabajo se plantea un estudio más detallado para la obtención de extractos y su incorporación en un recubrimiento, ya que son necesarios los estudios en los que se ensayen las sustancias ante un espectro más amplio de organismos, así como su evaluación y efectividad bajo condiciones ambientales naturales, con un aporte de larvas y microorganismos propio del ambiente marino natural, que son las condiciones reales a las que se expondría un recubrimiento o compuesto *antifouling* si es aplicado sobre una estructura artificial en el mar (Henrikson y Pawlik, 1995; Fusetani, 1997; Vetere *et al.*, 1999; Rittschof, 2000).

4. HIPÓTESIS

Staphylococcus aureus produce metabolitos con actividad *antifouling* con baja toxicidad para organismos no objetivo, dicha actividad dependerá del medio de cultivo utilizado para su crecimiento y los extractos serán efectivos al incorporarlos en recubrimientos para el control del *biofouling* en el medio natural.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la actividad antiincrustante de los extractos orgánicos obtenidos de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos particulares:

- Evaluar la capacidad de los extractos orgánicos obtenidos utilizando diferentes medios de cultivos y disolventes para inhibir la adhesión de bacterias formadoras de biopelículas.
- Determinar las concentraciones letales medias (CL₅₀) de los extractos orgánicos seleccionados en pruebas de toxicidad.
- Evaluar la actividad antiincrustante de los extractos a diferentes concentraciones.
- Establecer el efecto de los extractos con mayor bioactividad frente a organismos implicados en el *biofouling* y la toxicidad en organismos “no-objetivo”.
- Determinar la efectividad de los extractos incorporados en una matriz de pintura.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus fue aislada de una hoja de *Rhizophora mangle* del manglar “El Conchalito” (24° 8’ 34” N y 110° 21’ 4”) en un estudio previo de prospección de bacterias con actividad *antifouling* y fue criopreservada a -70°C como parte de la colección del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Instituto Politécnico Nacional – CICIMAR.

Para corroborar la pureza, la bacteria fue sembrada por el método de siembra en estría en cajas de Petri con agar marino, observando su morfología colonial y microscópica (Gram).

6.1.1. Identificación molecular de la especie

Debido a que anteriormente la bacteria fue identificada hasta género, se procedió a realizar su identificación molecular para determinar la especie.

Se utilizó un cultivo puro para llevar a cabo la extracción de ADN con un kit comercial (Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Zymo Research), la amplificación se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos universales para bacterias (27F 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3', 1385R 5'-GAGTTTGATCCTGGCCTCA-3') para la sub-unidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S (Lane, 1991). El programa utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 70 s, seguidos de una fase de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por la empresa coreana MACROGEN. Se analizaron y editaron las secuencias utilizando el programa Finch TV y CodonCode Aligner, posteriormente se efectuaron los análisis de alineamiento Blast entre las secuencias obtenidas y las reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

6.2. Preparación de extractos orgánicos

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para la posterior comparación de actividad:

- a) Caldo Marino (CM) (Peptona de carne, extracto de levadura, sulfato ferroso, agua de mar).
- b) Tripticaseína de soya (TSB) (Peptona de caseína, peptona de soya, dextrosa, fosfato dibásico de potasio, NaCl).
- c) Infusión Cerebro-Corazón (CC) (Extracto de cerebro, dextrosa, fosfato disódico, extracto de corazón, peptona, NaCl).

Se inoculó la cepa en 4 matraces de 500 mL con 250 mL de cada uno de los medios antes mencionados y se incubaron durante 4 a 5 días a temperatura ambiente con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo de cada matraz inoculado a 4,000 rpm durante 30 min para obtener el sobrenadante libre de células.

Para cada sobrenadante libre de células se realizaron las siguientes metodologías de extracción, obteniendo al final 15 extractos (Figura 1):

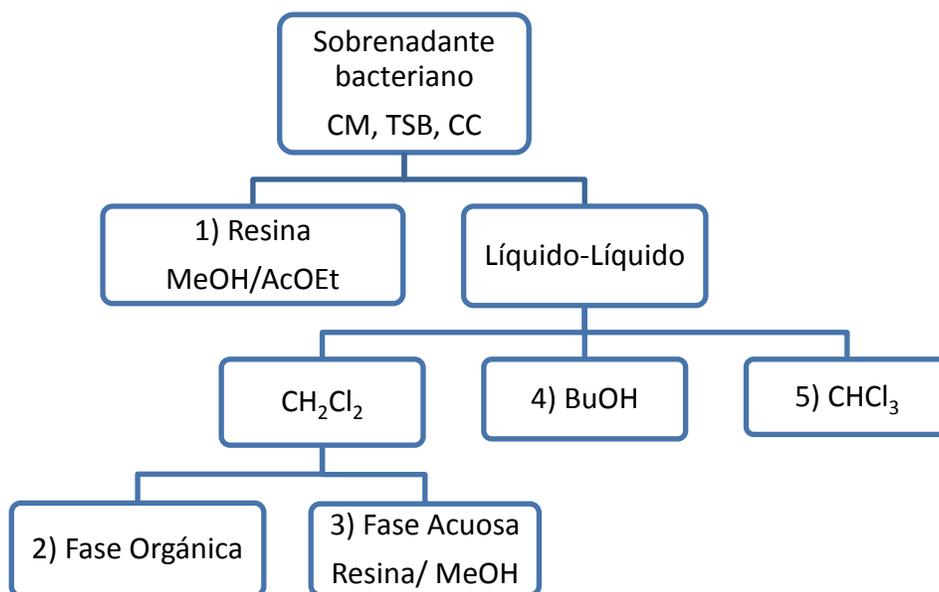


Figura 1. Diagrama de los extractos obtenidos por cada medio de cultivo.

1) Extracción con resina Diaion® HP-20, empleando MeOH y AcOEt (1:1) como eluyentes.

Los metabolitos fueron extraídos del sobrenadante mediante la adición de 50 g/L de resina Diaion HP-20, la mezcla resina/sobrenadante se dejó en agitación constante en una incubadora (Infors HT Multitron) a 35 °C por 12 h; posteriormente, la mezcla se filtró y el filtrado fue desechado. La resina con los metabolitos adsorbidos fue extraída sucesivamente utilizando diferentes disolventes, en primer lugar, con 250 mL de metanol, manteniendo la mezcla en agitación constante durante 30 min, al término se recuperó la solución por medio de filtración en papel Whatman no.1 y concentrada a presión reducida en un rotaevaporador (Yamato). La resina residual fue reextraída con 250 mL de acetato de etilo repitiendo el proceso anterior. Los extractos obtenidos con ambos disolventes se juntaron, se pesaron para obtener el rendimiento de los extractos y se mantuvieron en congelación a una temperatura de -20 °C hasta su posterior uso.

2) Extracción líquido-líquido discontinua con Diclorometano (CH_2Cl_2) (1:1).

Al sobrenadante resultante se le agregó 250 mL de diclorometano en un montaje de extracción líquido-líquido (embudo de decantación), la fase orgánica resultante fue concentrada a presión reducida en un rotaevaporador y se repitió el proceso anterior en dos ocasiones más y la fase acuosa residual se procesó como se detalla a continuación.

3) Fase acuosa residual del CH_2Cl_2 .

Se le agregó resina Diaion HP20 (50 g/L) se incubó durante 12 h a 35 °C, posteriormente el cultivo fue filtrado y a la resina que contenía los metabolitos liberados por la bacteria se le agregó 250 mL de metanol manteniéndola en agitación constante durante 30 min, se filtró y el disolvente se concentró a presión reducida en un rotaevaporador.

4) Extracción líquido-líquido discontinua con butanol (1:1).

A los medios de cultivo agotados (sobrenadante), se les agregó butanol, la mezcla obtenida se colocó en un embudo de decantación para que las fases se

separaran por completo hasta observar claramente la línea de separación, la fase orgánica obtenida fue concentrada a presión reducida en un rotaevaporador y a la fase acuosa se agregó butanol repitiendo el proceso anterior en dos ocasiones más.

5) Extracción líquido-líquido de los medios agotados con cloroformo (1:1).

Al sobrenadante se le agregó cloroformo, la mezcla se colocó en un embudo de decantación, se esperó a que las fases se separaran por completo hasta observar claramente la línea de separación, la fase orgánica obtenida se concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 45 °C y a la fase acuosa se agregó cloroformo repitiendo el proceso anterior en dos ocasiones más.

6.3. Obtención de bacterias formadoras de biopelículas

Con el fin de incrementar el cepario de bacterias formadoras de biopelícula para poder llevar a cabo ensayos de laboratorio frente a un mayor número de especies involucradas en el proceso de *biofouling*, se utilizó una probeta metálica de 20 cm de alto por 10 cm de ancho con recubrimiento sin biocida proporcionada por una empresa de pinturas. La probeta se sumergió en el mar a una profundidad aproximada de 50 cm durante 12 h en el muelle de la marina “La Costa” en La Paz, Baja California Sur, México (24° 08' 32" N y 110° 18' 39" O). Se procedió a hacer un raspado con hisopo estéril de la probeta y también del pilote del muelle donde se colocó la probeta, estos hisopos se colocaron en tubos de ensayo con 10 mL de solución salina estéril, las muestras fueron transportadas en condiciones asépticas al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Instituto Politécnico Nacional - CICIMAR.

6.3.1. Trabajo de laboratorio

Una vez en el Laboratorio (todo el material utilizado se esterilizó antes de su uso), se realizaron seis diluciones (1:10) de cada muestra obtenida en campo, se hicieron alícuotas de 100 µL de cada dilución que fueron colocadas en cajas de Petri con agar marino e incubadas a 35 °C durante 24 a 48 h o hasta que se observó la presencia de colonias.

6.3.2. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas formadoras de biopelículas

Con base en la morfología (borde, color, elevación, forma) de las colonias (Tabla 3) presentes en cada placa se seleccionaron las distintas cepas, las cuales fueron resembradas en cajas de Petri con agar marino por el método de siembra en estría y se incubaron a 35 °C durante 24 a 48 h. Se utilizó un microscopio estereoscópico (Zeiss), para confirmar la presencia de una sola cepa. Cuando se encontró más de una, se repitió el procedimiento hasta que se obtuvieron cepas puras.

Una vez que las cepas fueron purificadas se realizó una tinción Gram, la cual consiste en agregar diferentes colorantes con el fin de diferenciar el tipo de bacterias (cocos, bacilos, estafilococos, etc.) y la coloración que adquieren después de la tinción; ya sea roja para Gram negativas o azul para Gram positivas, los frotis se observaron con un microscopio óptico (objetivo 100x y aceite de inmersión) (Zeiss, Primotech).

Tabla 3. Clasificación morfológica de colonias bacterianas (Tomado y modificado de <https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>)

FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoide	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular		Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa	Filamentoso	Acuminada	

6.3.3. Prueba de adherencia

Para confirmar si las bacterias aisladas formaban parte del proceso de colonización y formación de biopelícula, se siguió la metodología propuesta por Martínez-Díaz (2010) y Hellio *et al.*, (2015), para ello, se inocularon microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Thermo, FS-167008) con 100 μ L de caldo marino por cada bacteria purificada, usando como testigo caldo marino sin inocular y se dejaron incubar durante 24 a 48 h. Después del tiempo de incubación, el caldo se vació y cada uno de los pozos se enjuagó con agua destilada estéril, para retirar cualquier bacteria que no estuviera adherida a la superficie, se dejó secar la placa y posteriormente se agregaron 100 μ L de cristal violeta al 1% y se dejó reposar por 5 min; transcurrido el tiempo se procedió a enjuagar con agua destilada estéril repetidas veces hasta eliminar el exceso de cristal violeta, se dejó secar la microplaca para comparar la coloración de los pozos según Martínez-Díaz (2010), quien menciona que aquel pozo que presente coloración violeta más intensa, será considerada como bacteria formadora de biopelícula. Las cepas bacterianas que resultaron formadoras de biopelículas, se sembraron en tubos de ensayo con agar inclinado para conformar un cepario y mantenerlas para posteriores bioensayos de inhibición de biopelículas.

6.3.4. Identificación molecular de bacterias formadoras de biopelículas

Para la identificación de las cepas se utilizaron cultivos puros para llevar a cabo la extracción de ADN utilizando el método de Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell, 2001), y se procedió a realizar la misma metodología descrita en el apartado 6.1.1.

6.4. Ensayo de inhibición de biopelículas

Este ensayo se llevó a cabo frente a las cepas identificadas como formadoras de biopelículas y otras bacterias del cepario del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del IPN-CICIMAR que presentaron mayor capacidad de formar biopelículas de acuerdo con la metodología con cristal violeta (ANEXO I) (Total 10).

Se siguió la metodología sugerida por Álvarez *et al.*, (2006), se agregó 100 μ L de cada uno de los extractos disueltos en Dimetil sulfóxido al 1% (DMSO) estéril en

cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano. Las bacterias formadoras de biopelículas fueron sembradas en agar marino durante 24 h a 35 °C. De este cultivo, se preparó una suspensión celular con cada una de las cepas en caldo marino y se ajustó a una densidad celular de 1×10^8 cel/mL; posteriormente se agregó 100 μ L de esta solución homogénea a cada uno de los pozos, se colocó un control negativo (caldo con bacteria), control positivo (extracto inhibidor de biopelículas) (Gutiérrez, 2018) y blanco, se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento. Se dejó incubar por 48 h.

Los pozos con las bacterias formadoras de biopelículas se lavaron con agua destilada, las células fueron fijadas con 250 μ L de MeOH, se dejó reposar por 15 min, se retiró el solvente y se dejó secar durante 45 min. Posteriormente, se agregó 200 μ L de cristal violeta al 1% y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, se retiró el cristal violeta, los pozos se enjuagaron con agua destilada hasta retirar el excedente del colorante, la placa se dejó secar. Se agregó 250 μ L de EtOH (70%) para solubilizar el cristal violeta adherido a la placa. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas (Álvarez *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente formula:

$$PF = \frac{(BFC)100}{C -}$$

$$PI = 100 - PF$$

Dónde:

C- = Control negativo

BFC= El promedio de los resultados obtenidos de cada tratamiento

PF= Porcentaje de formación

PI= Porcentaje de inhibición

Con los porcentajes de inhibición obtenidos se realizó un ANOVA y una prueba Tukey para observar las diferencias significativas entre medios de cultivo y para evaluar las variaciones dependiendo de la extracción, se realizó una prueba no paramétrica de Friedman ya que los datos no siguieron la normalidad.

6.5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Con el fin de realizar un análisis comparativo entre los extractos obtenidos, se realizó una CCF; para la cual se utilizó una placa de aluminio impregnada de sílica-gel fase normal y como fase móvil se utilizó diclorometano (CH_2Cl_2), el revelado de las fracciones se hizo con una lámpara de luz UV con dos longitudes de ondas (Bravo y Acuña, 2015), y posteriormente una solución de ácido sulfúrico (10%) y vainillina (0.025%), con posterior calentamiento.

6.6. Bioensayo de Toxicidad

Una vez seleccionados los extractos que dieron positivo en el ensayo de actividad inhibitoria de biopelícula, se llevó a cabo el bioensayo de toxicidad determinando la CL_{50} (concentración media letal) de cada uno de los extractos utilizando *Artemia franciscana*, ya que se considera como un modelo para evaluar los efectos tóxicos (Meyer, 1982).

Los extractos crudos fueron evaluados a diferentes concentraciones (1500, 1250, 1000 y 750 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado en microplacas de poliestireno de 96 pozos. Se colocaron 10-15 nauplios de *Artemia* en cada pozo, además de un control negativo (caldo marino) y dos positivos (sulfato de cobre y pintura AF). Las placas se colocaron en un lugar con fotoperiodo de 24:0 (luz:oscuridad) a una temperatura constante de 28° C. Después de 24 h, se realizó un conteo final del número de nauplios utilizando un microscopio estereoscópico y se determinó el porcentaje de mortalidad. Mediante un análisis Probit se estableció la CL_{50} para cada uno de los extractos probados (Finney, 1952).

6.7. Bioensayo con geles inertes

Se utilizó la técnica de incorporación de los extractos en agentes gelificantes para evaluar su efectividad, se tomó como base la metodología propuesta por Henrickson y Pawlick (1995) y modificada por Newmark *et al.*, (2005) y Rico Virgen (2017), la cual consiste en preparar cajas de Petri con los extractos seleccionados,

los cuales fueron disueltos en un gel inerte Phytigel®. Los extractos se probaron en las mismas concentraciones que en el ensayo de toxicidad. Se utilizó como control negativo una placa únicamente con gel y como control positivo una placa con gel al cual se le añadió sulfato de cobre. Las placas se realizaron por triplicado.

Una vez que las placas estuvieron listas se colocaron al azar en un armazón de tubos PVC paralelos entre ellos (Figura 2). Estas estructuras fueron colocadas en el área de la marina la Costa (24° 08' 32" N y 110° 18' 39" O), Baja California Sur, México; las estructuras estuvieron suspendidas a una altura de 90 cm del fondo durante 30 días.

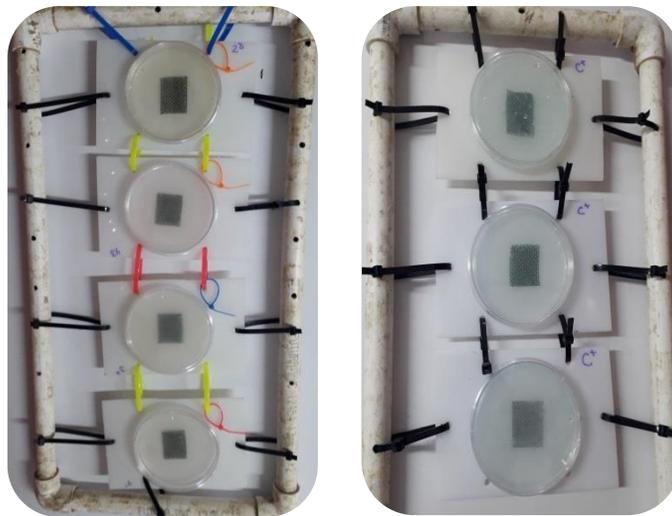


Figura 2. Estructuras de PVC que se utilizaron para fijar las placas de Phytigel.

Después de este tiempo (Figura 3), las placas fueron trasladadas en un recipiente con agua de mar al Laboratorio de Microbiología y Biología molecular, IPN-CICIMAR.



Figura 3. Estructuras después del periodo de experimentación.

En el laboratorio, se tomaron fotografías de cada una de las placas, para posteriormente realizar los análisis de cobertura con el programa CPCe, y se procedió a realizar análisis ANOVA y prueba Tukey para determinar las diferencias u homogeneidad entre la cobertura en los tratamientos, con una $\alpha=0.05$. Se recuperaron, además, todos los organismos epibiontes sobre los geles y se guardaron en viales de 20 mL debidamente etiquetados y conservados en alcohol por tratamiento y replica para recurrir a ellos en caso de que la identificación fotográfica no fuera suficiente.

Para evaluar el efecto de los extractos con mayor bioactividad sobre organismos implicados en el *biofouling* y los organismos “no-objetivo” se realizaron los siguientes bioensayos:

6.8. Ensayo de actividad antibacteriana

6.8.1. Inhibición del crecimiento

Se llevó a cabo una selección de los extractos que mostraron resultados de actividad para evaluar la forma en que el extracto está actuando. Para ello se utilizaron bacterias del género *Vibrio* (*V. aestuarianus*, *V. natriege*, *V. carchariae*, *V. harveyi* y *V. proteolyticus*), proporcionadas por personal del laboratorio de fisiología vegetal de la Université de Bretagne Occidentale (UBO) (ANEXO II), siguiendo la metodología sugerida por Hellio *et al.*, (2015).

Se agregó 100 μL de cada uno de los extractos disueltos en Dimetil sulfóxido (DMSO) al 1% a diferentes concentraciones (1500, 1250, 1000 y 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en cada

pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con 4 réplicas. Se dejó volatilizar el DMSO en un evaporador de placas (Genevac). Las placas se esterilizaron con luz ultravioleta durante 30 min.

Las bacterias del género *Vibrio* fueron cultivadas en tubos de ensayo con medio MBM (Marine Bacteria Medium) estéril hasta que se obtuvo la densidad óptima, estos cultivos se diluyeron según el método de Ámsterdam (1996) para obtener una densidad celular de 2×10^8 cél/mL. Para determinar la densidad, se midió la absorbancia a 620 nm usando un espectrofotómetro. Las placas previamente preparadas con los extractos y esterilizadas, se inocularon con 100 μ L de la dilución de células bacterianas. Se consideraron control positivo (medio de cultivo inoculado con sulfato de cobre), control negativo (medio de cultivo inoculado con DMSO) y blanco (medio de cultivo sin inocular). Las placas se dejaron incubar durante 72 h a temperatura ambiente, después se midió la densidad óptica (OD) en un espectrofotómetro a 620 nm.

6.8.2. Inhibición de la adhesión

Las placas que fueron preparadas en el ensayo anterior se vaciaron y se siguió la metodología realizada en la sección 6.4 para evaluar el efecto de los extractos en la inhibición de biopelículas.

6.9. Ensayo de inhibición microalgal

6.9.1. Inhibición de la adhesión

El ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Hellio *et al.* (2015) frente a dos cepas de clorofitas (*Chlorella vulgaris*, *Stichococcus bacillaris*), dos cepas de diatomeas (*Halamphora coffeaeformis*, *Cylindrotheca closterium*) y una cepa de crisofita (*Exanthemachrysis gayraliae*), estas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de fisiología vegetal de la Université de Bretagne Occidentale (UBO) (ANEXO III).

Se agregó 100 μ L de cada uno de los extractos disueltos en DMSO (1%) a diferentes concentraciones (1500, 1250, 1000 y 750 μ g/mL) en cada pozo de una

placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con 4 réplicas. Se dejó volatilizar el DMSO en un evaporador de placas (Genevac). Las placas se esterilizaron con luz UV durante 30 min.

Las microalgas fueron cultivadas en tubos de ensayo con medio F/2 (marino) y DAUTA (agua dulce) estéril a temperatura ambiente. Para estimar la biomasa microalgal del cultivo se realizó la determinación de la concentración de la clorofila (Chl *a*): se recolectaron 5 mL del cultivo microalgal en un filtro GF/F (Whatman), el filtro se transfirió inmediatamente a un vial con 5 mL de metanol (MeOH) grado analítico. El vial se mantuvo en oscuridad a 4 °C durante 30 min. Se midió la fluorescencia del pigmento en un espectrofotómetro (excitación: 485 nm, emisión: 645 nm). Para determinar la concentración de la “Chl *a*” se utilizó una curva de calibración con “Chl *a*” de espinaca (SIGMA).

Después de determinar la concentración de “Chl *a*” de cada especie de microalga, se realizó una dilución de cada cultivo microalgal para obtener una concentración inicial de 0.1 mg Chl *a*/L. De esta suspensión, se agregó 100 µL a cada pozo de la microplaca (placa A) previamente esterilizada. La placa se incubó durante 5 días a 20 °C con luz constante.

Posteriormente, se removieron los inóculos a una segunda microplaca (placa B). Se agregó 100 µL de MeOH a la placa A y se dejó reposar durante 30 min a 4 °C en oscuridad. Para medir la fluorescencia, se utilizó un espectrofotómetro de placas (excitación: 485 nm, emisión: 645 nm).

6.9.2. Inhibición del crecimiento

Para evaluar la inhibición del crecimiento de los cultivos microalgales, se utilizó la placa B del ensayo anterior. Ésta placa B, se centrifugó a 2380 g durante 10 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante con una micropipeta.

Se agregó 100 µL de MeOH (100%) grado analítico a cada pozo para liberar la Chl *a*. Para cuantificar la concentración del pigmento se empleó un método fluorométrico: se utilizó un espectrofotómetro de placas (excitación: 485 nm, emisión: 645 nm).

6.10. Ensayo de inhibición de la enzima fenoloxidasasa

Se evaluó el efecto de los extractos como inhibidores de la enzima tirosina (análoga a la enzima fenoloxidasasa), involucrada en el asentamiento del mejillón, esta metodología se basó en el trabajo publicado por Hellio *et al.* (2000).

Los extractos se disolvieron en DMSO (1%) a una concentración final de 1 mg/mL. En una placa de 96 pozos, se agregó 12 μ L de la solución de los extractos, posteriormente se agregó 7 μ L de la solución con la enzima (diluida en PBS a una concentración de 125 U/mL) y finalmente se agregó 180 μ L del sustrato (L-tirosina 1 mM, agua destilada y PBS). Se incluyeron controles positivos (sulfato de cobre, ácido kójico a 0.5 mg/mL) y blanco (DMSO). Se midió la OD en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm, se realizaron 180 lecturas continuas cada 25 s.

6.11. Toxicidad frente a la línea celular 16HBE

El ensayo de toxicidad se realizó frente a Células Epiteliales Bronquiales Humanas (16HBE), la línea celular y la metodología fue proporcionada por el Laboratoire transfert de gènes et thérapie génique en la Faculté de Médecine et de Sciences de la Santé. Se colocaron 40,000 células en cada pozo de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Se preparó una solución stock de cada uno de los extractos (5 mg/mL), de estas soluciones stock se hicieron diluciones en un agente tamponador de ácido sulfónico zwitteriónico (HEPES buffer) para obtener diferentes concentraciones (10, 1, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 y 0%).

Después del tiempo de incubación de las microplacas, se agregó 25 μ L de los extractos a diferentes concentraciones por triplicado. Se realizó un control positivo (DMSO 1 y 10%) y un control negativo (línea celular sin ningún tratamiento). Se dejó incubar durante 24 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante de cada pozo, se agregó 75 μ L de PLB (Phosphate Lysis Buffer) y se dejó en el congelador toda la noche.

Para medir la viabilidad de las células, se descongelaron las placas (placa A), se tomaron 25 μ L de la placa A y se colocaron en una microplaca blanca (placa B) de 96 pozos. Se agregó 25 μ L de “ViaLight” (detector bioluminiscente de ATP celular como una medición de viabilidad) y se midió la placa B en un espectrofotómetro de placas.

Para cuantificar las proteínas totales de las líneas celulares se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de análisis de proteínas BCA que se describen a continuación, se tomaron 25 μ L de la placa A y se colocaron en una microplaca transparente (placa C) de 96 pozos. Se agregó 200 μ L de solución A:B. Se realizó una curva de calibración de la solución BCA (1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.02, 0 mg/mL en PLB). Las placas C se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se midió la densidad óptica (560 nm) en un espectrofotómetro de placas.

6.12. Toxicidad e inhibición de asentamiento de *Amphibalanus amphitrite*

6.12.1. Bioensayo de toxicidad

Se seleccionaron los extractos que mostraron mejores resultados en los ensayos anteriores para llevar a cabo la metodología CL₅₀ (concentración letal media) utilizando nauplios en estadio II de *A. amphitrite*.

Los extractos crudos fueron evaluados a diferentes concentraciones con seis réplicas en microplacas de poliestireno de 96 pozos. Se colocaron 10-15 nauplios de balanos en cada pozo, además de un control negativo (agua de mar) y uno positivo (sulfato de cobre). Las placas se colocaron en un lugar con fotoperiodo de 24:0 (luz:oscuridad) a una temperatura constante de 28° C. Después de 24 h, se hizo un conteo final del número de nauplios muertos en un microscopio estereoscópico. Se estableció el porcentaje de mortalidad y se determinó la CL₅₀ usando un análisis Probit (Finney, 1952).

6.12.2. Inhibición del asentamiento de cipris de *A. amphitrite*

Se obtuvieron los nauplios liberados por los balanos adultos, y se colocaron en botellas con aireación para lograr la metamorfosis a la etapa de cipris.

Para los ensayos de asentamiento se utilizaron microplacas de 24 pozos, en donde se agregaron los extractos a concentraciones de 400, 200, 100 y 50 µg/mL disueltos en agua de mar y de cinco a siete cipris para dar un volumen de 2 mL por pozo. Se utilizó un control positivo (sulfato de cobre) y uno negativo (agua de mar). En cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas.

Los resultados se obtuvieron después de 24 h. Cada larva se examinó bajo un estereoscopio. Se registró su estado físico: 1) muertos, 2) adheridos y 3) nadadores.

6.13. Incorporación de los extractos en una matriz de pintura

Se seleccionaron dos extractos que mostraron inhibición de asentamiento de organismos, para ser incorporados en una matriz de pintura con la cual se recubrieron placas metálicas que fueron proporcionadas por una empresa de pinturas, se incluyó además una placa pintada con el recubrimiento sin ningún biocida como control negativo y una recubierta con pintura adicionada con sulfato de cobre como control positivo.

6.13.1. Ensayo en campo

Se elaboraron armazones experimentales con tubos de PVC que sostuvieron juegos de placas de acero con los diferentes recubrimientos experimentales. Las placas fueron perforadas y fijadas al armazón de PVC mediante amarres de plástico a través de los orificios. La distribución de las placas en los paneles se realizó de manera aleatoria. Cada marco fue dispuesto también de manera aleatoria verticalmente en los pilotes del muelle de la marina la Costa (24° 08' 32" N y 110° 18' 39" O), Baja California Sur, México. Estas permanecieron sumergidas en el mar por 90 días, se evaluó la efectividad de las pinturas para inhibir el asentamiento de organismos.

6.13.2. Evaluación del asentamiento de organismos

Se tomaron fotografías de cada una de las placas, para posteriormente realizar los análisis de cobertura con el programa CPCe (Kohler y Gill, 2006), y se procedió a realizar análisis ANOVA y prueba Tukey para determinar las diferencias u homogeneidad entre la cobertura en los tratamientos, con una $\alpha=0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación molecular de la cepa de estudio

Debido a que la bacteria a probar solo se había identificado hasta género, fue necesario determinar la especie, dando como resultado según la base de datos del *Genbank* que se relaciona con *Staphylococcus aureus* con un 99% de identidad (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular

ESPECIE	NUMERO DE ACCESO <i>NCBI</i>	E VALUE	% IDENTIDAD
<i>Staphylococcus aureus</i> NF4	KM613153.1	0.0	99

7.2. Preparación de extractos orgánicos

Se obtuvieron 5 extractos de cada medio de cultivo (total 15). En la Tabla 5, se muestra el rendimiento del extracto.

El rendimiento promedio de los extractos fue de 2.80 g/L, siendo el extracto butanólico del medio CC el que obtuvo el mayor rendimiento (9.21 g/L) y el extracto de CHCl₃ el de menor rendimiento (0.18 g/L) del mismo medio (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento de los extractos orgánicos.

Medio	Solvente	Rendimiento (g/L)
CM	BuOH/H ₂ O Destilada	4.28
	Resina/MeOH/AcOEt	2.30
	CHCl ₃	0.30
	CH ₂ CL ₂ (Fase orgánica)	0.45
	Fase acuosa/Resina/MeOH	3.48
CC	BuOH/H ₂ O Destilada	9.21
	Resina/MeOH/ AcOEt	6.20
	CHCl ₃	0.18
	CH ₂ CL ₂ (Fase orgánica)	0.23
	Fase acuosa/Resina/MeOH	5.96
TSB	BuOH/H ₂ O Destilada	5.29
	Resina/MeOH/ AcOEt	4.26
	CHCl ₃	0.46
	CH ₂ CL ₂ (Fase orgánica)	0.79
	Fase acuosa/Resina/MeOH	0.75

7.3. Obtención de bacterias formadoras de biopelículas y prueba de adherencia

Se aislaron y purificaron 40 colonias bacterianas de una probeta metálica con recubrimiento sin biocida y del pilote del muelle de la marina.

Después de llevar a cabo la prueba de adherencia, se encontró que solo siete bacterias resultaron formadoras de biopelículas, siendo tres aisladas del pilote y cuatro de la probeta metálica, todas Gram-negativas y con variación morfológica colonial (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación morfológica y tinción Gram de bacterias aisladas que dieron positivo en la prueba de adherencia.

Clave	Sitio de recolección	Forma	Borde	Elevación	Color	Morfología celular	Gram
1D	Probeta	Circular	Entero	Elevado	Hialina	Bacilos	-
4M	Muelle	Irregular	Irregular	Plano	Hialino	Bacilos	-
11M	Muelle	Circular	Entero	Elevado	Crema	Bacilos	-
12M	Muelle	Circular	Entero	Plano	Beige	Bacilos	-
10D	Probeta	Circular	Entero	Plano	Hialina	Bacilos	-
7A	Probeta	Circular	Entero	Plano	Crema	Bacilos	-
9A	Probeta	Circular	Entero	Elevado	Blanco	Bacilos	-

7.3.1. Identificación molecular de las cepas estudiadas

La mayoría de las bacterias obtuvieron un alto índice de identidad (%) con especies reportadas en la base de datos *NCBI*. En la Tabla 7, se muestra la especie más cercana con la que se relacionó la secuencia de cada una de las bacterias formadoras de biopelículas de acuerdo con el alineamiento Blast, así como el porcentaje de identidad y el número de acceso en la base de datos del *NCBI*.

Tabla 7. Identificación molecular de bacterias formadoras de biopelículas.

Clave	Especie	Numero de acceso <i>NCBI</i>	% Identidad
1D	<i>Alteromonas</i> sp. JLT15232	KX989280.1	89
4M	<i>Alteromonas simiduii</i> BCRC17572	NR043978.1	98
11M	<i>Alteromonas mediterranea</i> UM7	CP004853.1	97
12M	<i>Alteromonas macleodii</i> CAIM 880	JF411547.1	99
10D	<i>Aestuariibacter</i> sp. 12C24	KU963301.1	99
7A	<i>Alteromonas macleodii</i> NIOSSD026A	MH660284.1	99
9A	<i>Alteromonas macleodii</i> PEL67C	KC871604.1	98

7.4. Ensayo de inhibición de biopelículas

Los resultados del efecto de los extractos sobre la formación de biopelículas de cada cepa se expresan en porcentaje de inhibición (ANEXO IV).

Con estos porcentajes se obtuvo un promedio de cada medio de cultivo para realizar un ANOVA y una prueba Tukey, los estadísticos mostraron que la actividad obtenida con los medios CC y TSB son significativamente diferentes a los obtenidos con el medio CM (Figura 4). A pesar de no existir diferencias estadísticas entre los medios CC y TSB, con el medio de cultivo TSB se presentó un ligero incremento en el porcentaje de inhibición.

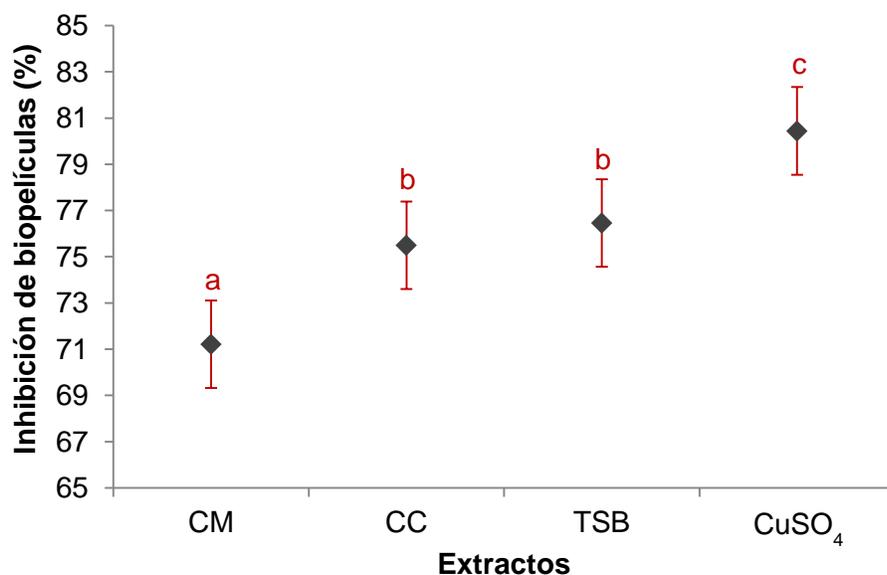
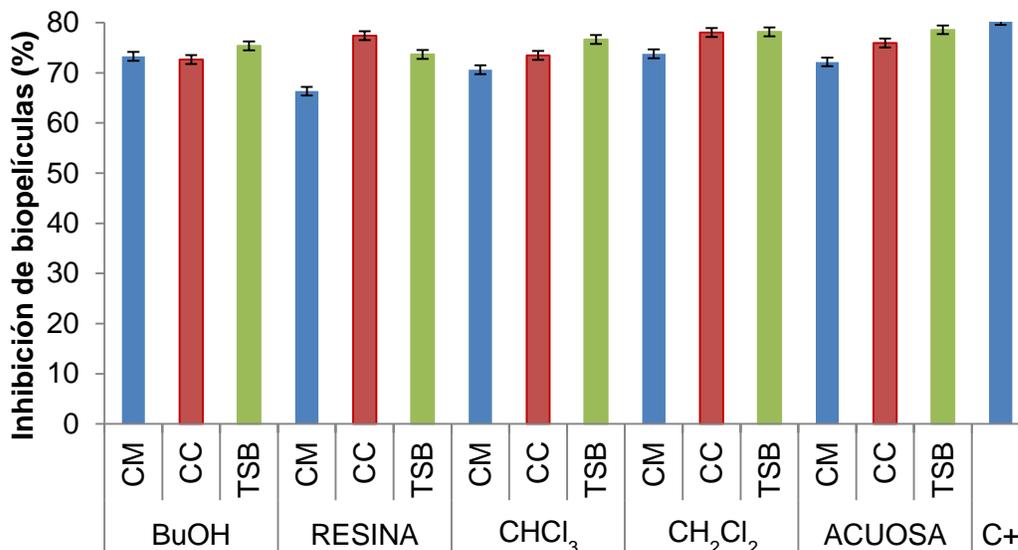


Figura 4. Diferencias estadísticas entre los medios de cultivo.

La prueba no paramétrica de Friedman mostró que no existen diferencias significativas entre los extractos, sin embargo, se puede observar que los extractos que mostraron el mayor porcentaje de inhibición fueron los de CH₂Cl₂ y la fase acuosa del CH₂Cl₂ (Figura 5).



7.5. Análisis comparativo de los extractos

Se obtuvo el factor de retención de los compuestos (R_f), el cual se calcula dividiendo la distancia recorrida por el compuesto entre la distancia recorrida por la fase móvil.

Los R_f 's de los compuestos muestran que existen ciertas similitudes entre los metabolitos extraídos con el mismo medio de cultivo, como se observa con el medio de cultivo TSB que a 0.6 se encuentra una serie de compuestos similares en todos los extractos (Figura 6). Sin embargo, algunos compuestos solo se observan dependiendo del medio y solvente utilizado, como es el caso del compuesto con un R_f de 0.4 extraído con butanol a partir del medio de cultivo de CC.

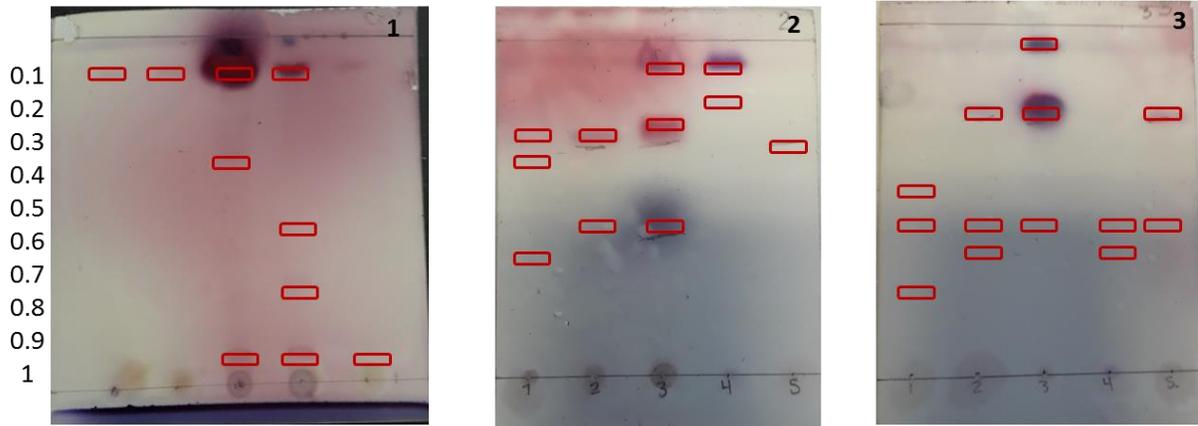


Figura 6. CCF de los extractos obtenidos de diferentes medios de cultivo. 1) CM, 2) CC y 3) TSB.

7.6. Bioensayo de toxicidad aguda contra nauplios de *Artemia franciscana*

El medio TSB, presentó los mejores resultados para la inhibición de biopelículas, así como los extractos de Resina/MeOH/AcOEt, CHCl₃, CH₂Cl₂ (fase orgánica) y la Fase acuosa del CH₂Cl₂ por lo que fueron seleccionados para realizar el bioensayo de toxicidad aguda frente nauplios de *Artemia franciscana*.

Los resultados obtenidos en el bioensayo muestran que los extractos probados presentaron niveles bajos de toxicidad con una CL₅₀ mayor a los 1,000 µg/mL a diferencia del CuSO₄ (control positivo) donde la CL₅₀ es de 0.77 µg/mL (Tabla 8).

Tabla 8. CL₅₀ esperada para cada extracto y el intervalo de confianza fiducial al 95%.

Extracto	CL ₅₀ µg/mL	ICF 95%	
		Inferior	Superior
Resina/MeOH/AcOEt	> 1,000	2.35	7.94
CHCl ₃	> 1,000	5.35	200.1
CH ₂ Cl ₂ (Fase orgánica)	> 1,000	7.12	53.16
Fase Acuosa/Resina/MeOH	> 1,000	9.69	152.11
CuSO ₄	0.77	0.27	0.88
BCO	-	-	-

Se determinó que con ninguno de los extractos probados se mostró una alta mortalidad de nauplios (>50%), a diferencia del control positivo (CuSO_4) y de la pintura comercial. Con el extracto acuoso se presentó una mortalidad menor al 10% a la concentración más alta y fue inocuo a la menor concentración (Figura 7).

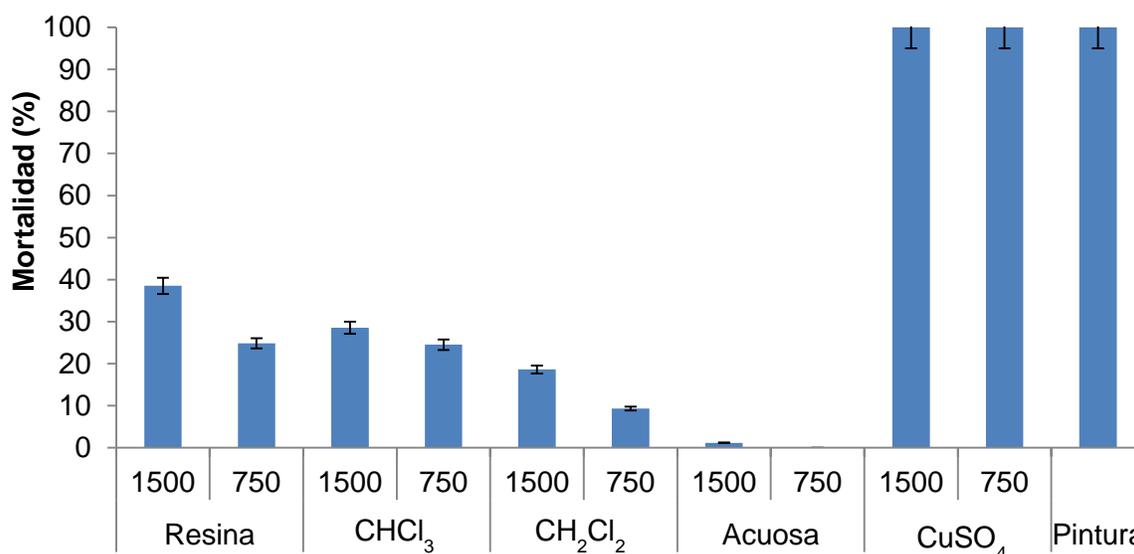


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de los nauplios de artemia con los extractos probados a diferentes concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

7.7. Bioensayo con geles

Al no mostrar toxicidad, se seleccionaron todos los extractos mencionados en el bioensayo anterior para ser incorporados a un gel inerte y así realizar el ensayo de actividad antiincrustante.

Al finalizar el periodo en el mar, las placas control (positivo y negativo) visualmente presentaban mayor colonización de organismos a excepción del tratamiento con el extracto de cloroformo en el cual se observó mayor presencia de briozoarios (Figura 8).

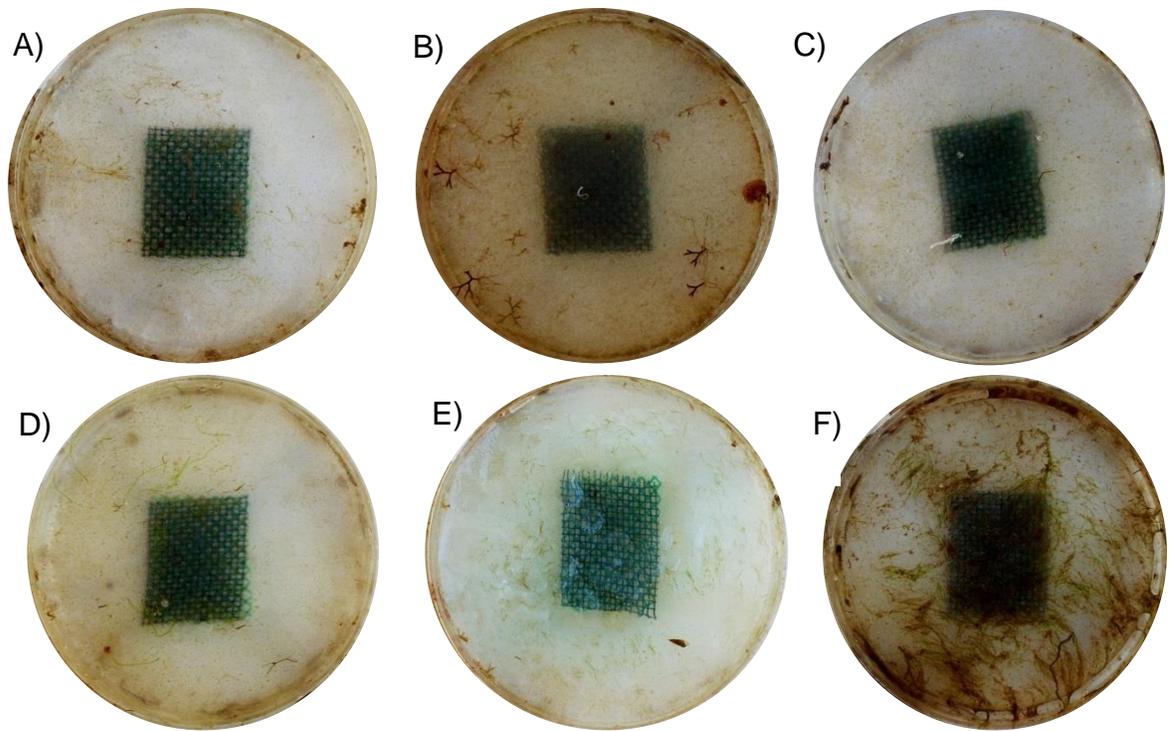


Figura 8. Placas de Phytigel conteniendo los diferentes extractos A) Resina, B) CHCl_3 , C) CH_2Cl_2 , D) Fase acuosa, E) CuSO_4 y F) C-.

Se lograron identificar 4 grupos: algas, balanos, briozoarios y tunicados.

Se realizó un ANOVA y una prueba Tukey, para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, con los resultados obtenidos se observó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si existen diferencias significativas frente al C- (Figura 9).

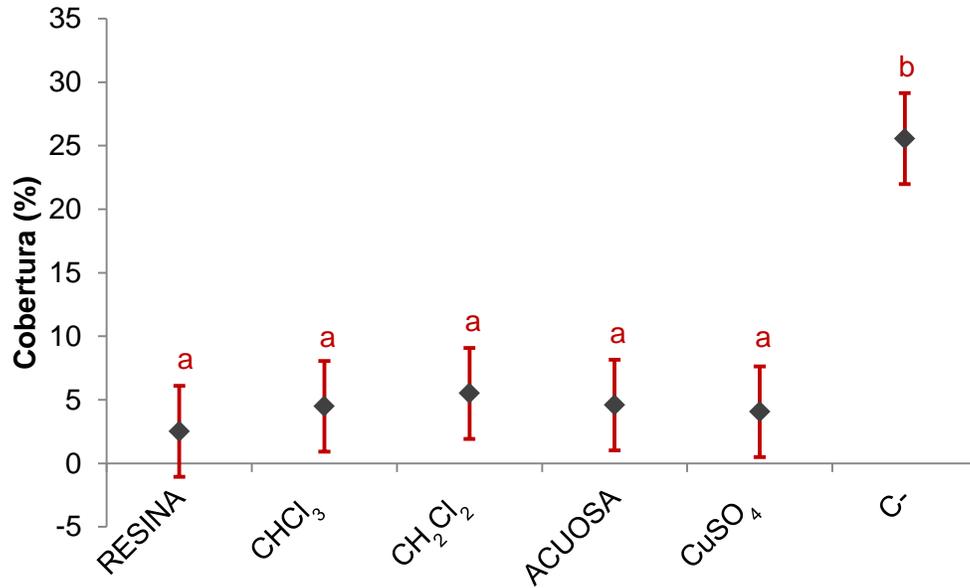


Figura 9. Promedio del área de cobertura de los tratamientos evaluados.

No se encontró relación entre la concentración probada y el porcentaje de inhibición de asentamiento de organismos en las placas, sin embargo, se pudo observar que, en la mayoría de los extractos a concentraciones más bajas, la inhibición de organismos fue mayor que el control positivo (CuSO₄) teniendo un porcentaje de cobertura menor a 5% (Figura 10).

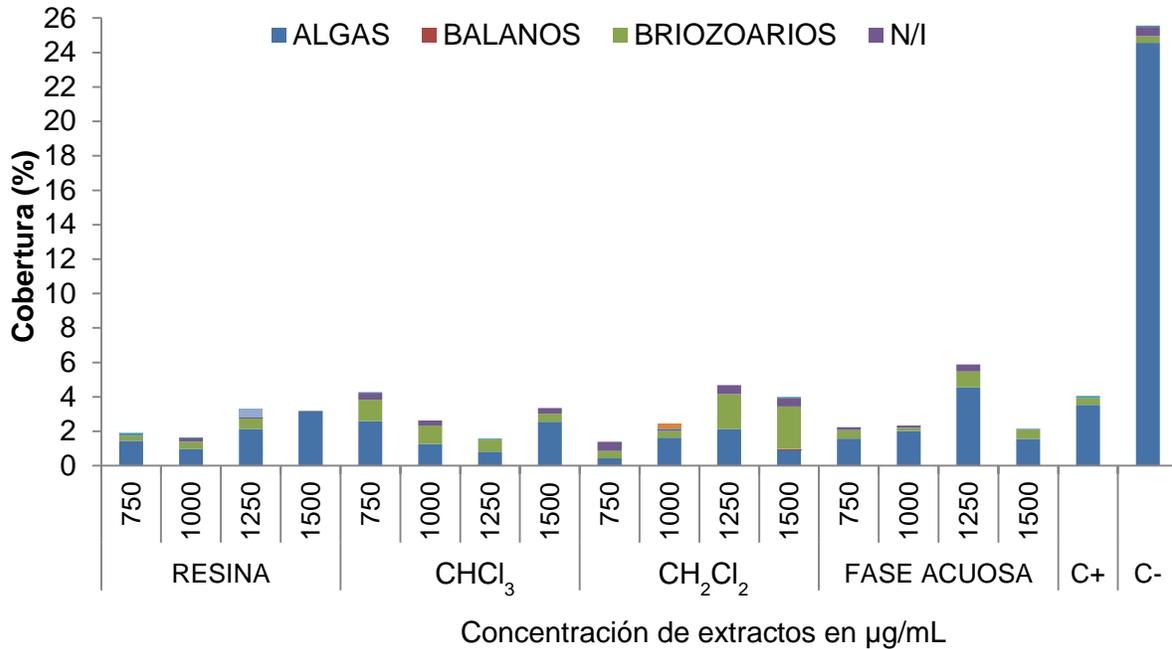


Figura 10. Porcentaje de grupo de organismos identificados en cada tratamiento (µg/mL).

7.8. Ensayo de actividad frente a cepas de *Vibrio*

7.8.1. Inhibición del crecimiento y adherencia

Para continuar con los ensayos, se seleccionaron los extractos de Resina, CH₂Cl₂ y la fase acuosa, descartando al obtenido con cloroformo ya que fue el que menor rendimiento presento, lo cual limitaba las siguientes etapas de los ensayos.

Los resultados obtenidos en estos bioensayos se expresan en porcentaje de inhibición.

En general, los extractos mostraron un bajo porcentaje de inhibición de crecimiento de las cepas formadoras de biopelícula, destacando el extracto orgánico de CH₂Cl₂ ya que no inhibió el crecimiento de ninguna de las bacterias probadas (Figura 11), sin embargo, sí logró inhibir la adhesión de estas cepas. Los otros dos extractos mostraron un porcentaje de inhibición de crecimiento muy bajo, pero sí lograron inhibir la formación de la biopelícula, en especial con *Vibrio natriegens* que la afectación en su crecimiento fue nula pero la formación de biopelícula fue inhibida entre un 80 y 100% por parte de los tres extractos.

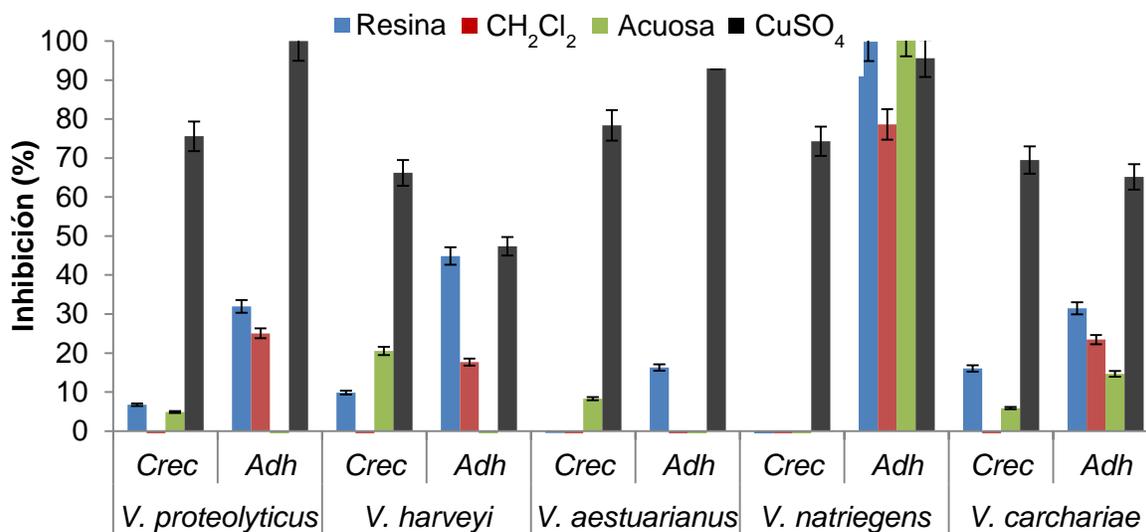


Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento y adherencia de las bacterias probadas.

En cambio, el control con sulfato de cobre inhibió en mayor porcentaje el crecimiento de las bacterias por lo que no se puede asegurar que el resultado de la inhibición de la adhesión se deba a este efecto y no a la muerte de las bacterias.

Se realizó un ANOVA y una prueba Tukey con los resultados obtenidos del ensayo de inhibición del crecimiento los cuales mostraron que hay diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 12A), pero no entre las concentraciones (ANEXO V), sin embargo, al evaluar los resultados obtenidos de la inhibición en la adhesión de los microorganismos se encontró que no hay diferencias significativas tanto entre los tratamientos como entre las concentraciones de los tratamientos, no obstante, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con el C+ (CuSO₄) (Figura 12A y 12B).

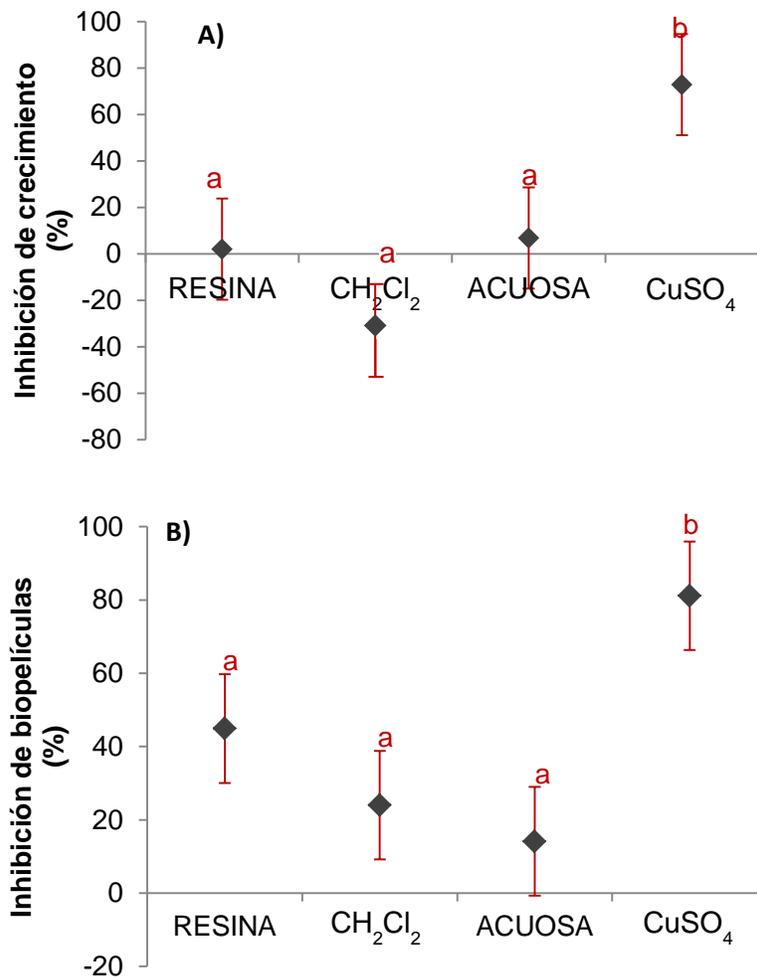


Figura 12. Porcentaje de inhibición a) del crecimiento, b) adhesión de bacterias probadas.

7.9. Ensayo de actividad frente a microalgas

7.9.1. Inhibición de la adhesión y crecimiento

Al igual que en el ensayo anterior los extractos presentaron mejores resultados en la inhibición de la adhesión que en la inhibición del crecimiento, a excepción de *C. vulgaris* y *S. bacillaris*, las cuales no fueron inhibidas ni en crecimiento ni en adhesión, en particular *S. bacillaris* que aún con el sulfato de cobre mostró un porcentaje de inhibición menor al 10% (Figura 13), con estos resultados se puede decir que los extractos no son tóxicos frente a tres de los microorganismos probados, pero son bioactivos a la inhibición de la adherencia.

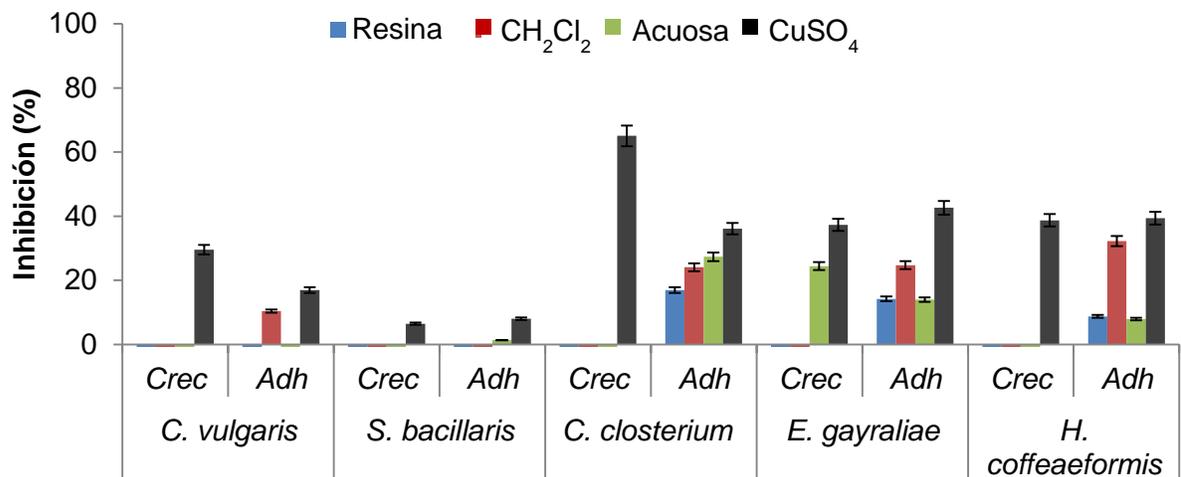


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento y adherencia de microalgas.

7.10. Ensayo de inhibición de la enzima fenoloxidasa

El molusco azul, *Mytilus edulis*, se fija al sustrato por medio de unas placas adhesivas conectadas al pie del bisus. Este adhesivo es producido por la acción de la enzima fenoloxidasa en una proteína precursora (Hellio *et al.*, 2000). Por ello, es importante realizar este tipo de ensayos, ya que nos dan un panorama de cómo actúan los extractos a probar.

Este ensayo se realiza con la enzima análoga de la fenoloxidasa que es la tirosinasa, en donde se evalúa el efecto de los extractos sobre la actividad cinética de la enzima. La prueba se realizó por triplicado frente a los extractos, de los cuales, el extracto de la fase acuosa se comportó de manera similar que el control positivo (CuSO₄), sin embargo, ninguno de los extractos logró inhibir a la enzima como en el caso del ácido kójico (Figura 14).

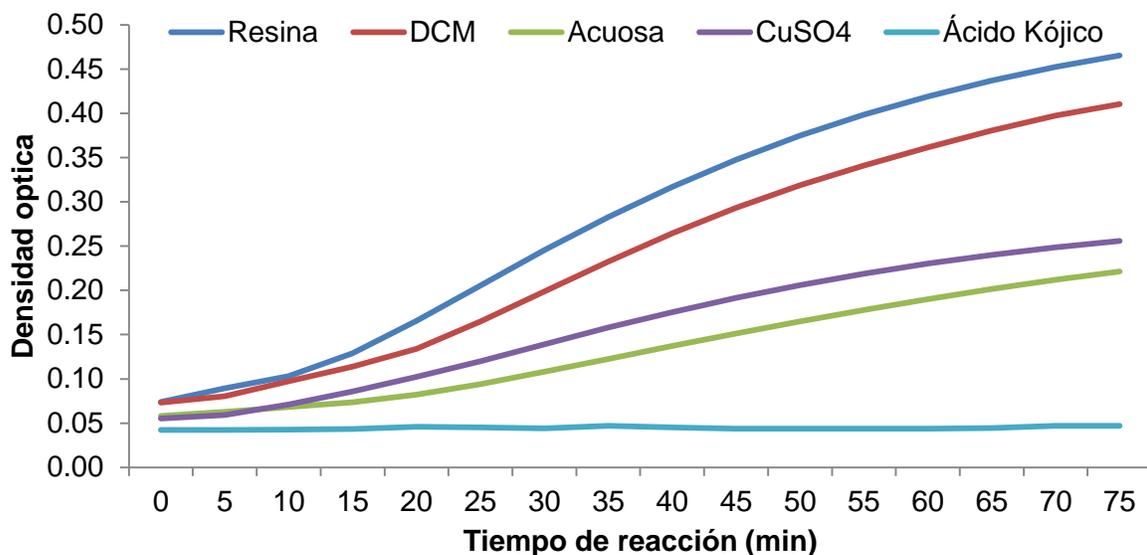


Figura 14. Efecto de los extractos sobre la actividad cinética de la enzima tirosinasa (análogo de la fenoloxidasas).

7.11. Toxicidad frente a la línea celular 16HBE

Se evaluó la viabilidad celular de la línea 16HBE (Células Epiteliales Bronquiales Humanas) frente a los extractos, y se determinó que ninguno de ellos mostró toxicidad, ya que la viabilidad de las células fue del 100% en la mayoría de las concentraciones probadas (Figura 15).

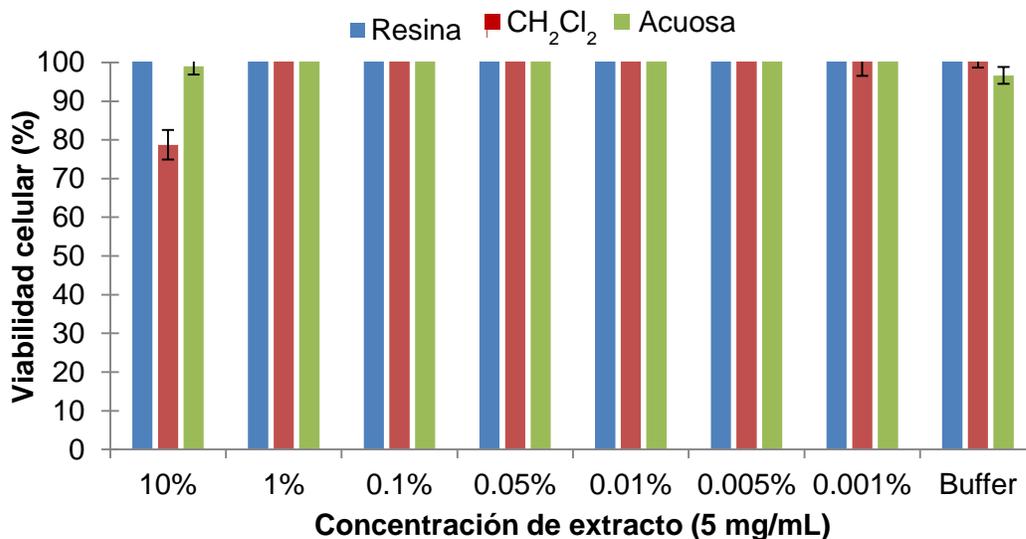


Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular de 16HBE frente a los extractos.

7.12. Toxicidad e inhibición de asentamiento de *Amphibalanus amphitrite*

Debido a que los extractos de CH₂Cl₂ y el extracto de la Fase Acuosa presentaron los mejores resultados tanto en los ensayos en campo (Phytigel) como en los de laboratorio (antibacteriana y antimicroalgal) se seleccionaron para continuar con los ensayos.

Tabla 9. Concentración letal al 50, 70 y 90% de cada tratamiento y el intervalo de confianza fiducial al 95%.

Extracto	CL (%)	CL µg/mL	ICF 95%	
			Inferior	Superior
CH ₂ Cl ₂ (Fase orgánica)	50	>1,000	0.43	4.82
	70	>1,000	1.89	20.96
	90	>1,000	15.82	174.92
Fase Acuosa	50	202	0.09	0.43
	70	549	0.25	1.19
	90	>1,000	1.15	5.43
CuSO ₄	50	27	0.14	0.05
BCO		-	-	-

El extracto de CH₂Cl₂ presentó baja mortalidad frente a los nauplios de *A. amphitrite*, mientras que el extracto de la fase acuosa presentó resultados moderadamente tóxicos según los cálculos de la CL₅₀ (Tabla 9).

Se calculó el porcentaje de inhibición de asentamiento, en donde se evaluó el comportamiento de la cipris en relación con la concentración de cada extracto, se observó que en la mayor concentración (400 µg/mL) del extracto de la fase Acuosa del CH₂Cl₂ se presentó mortalidad a las 24 h (Figura 16). Con el resto de los extractos a las diferentes concentraciones se inhibió en más del 80% el asentamiento de las cipris.

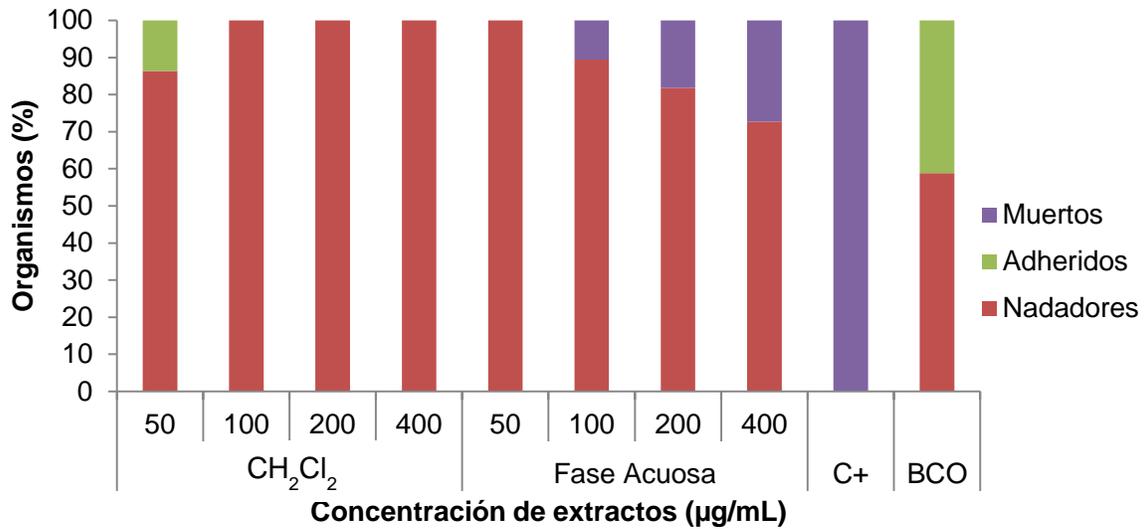


Figura 16. Efecto de la inhibición de asentamiento de la cipris de *A. amphitrite*.

7.13. Incorporación de los extractos en una matriz de pintura

7.13.1. Evaluación del asentamiento de organismos

Se llevó a cabo el seguimiento del proceso de adhesión de los organismos a las placas después de 30 (Figura 17), 60 (Figura 18) y 90 días (Figura 19) sumergidas en el mar. A los 30 días se observó sedimento y materia orgánica en todos los tratamientos, en la placa del control negativo (D) ya se aprecian algunas macroalgas adheridas (Figura 16).

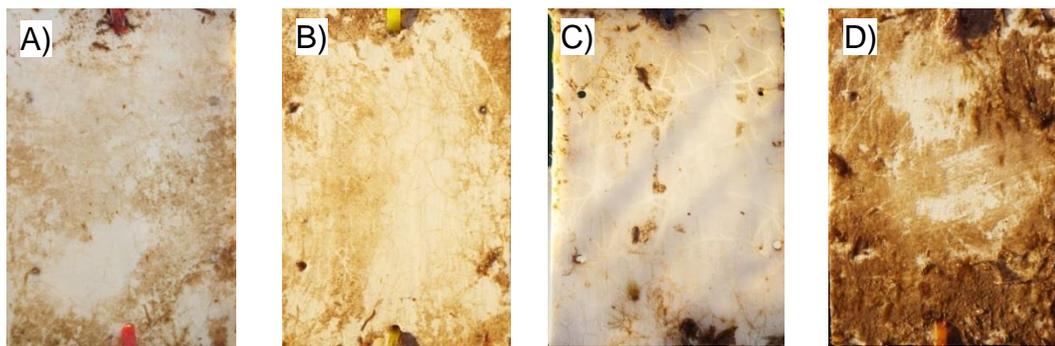


Figura 17. Fotografías a los 30 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH₂Cl₂, C) CuSO₄ y D) C-.

A los 60 días las placas ya no mostraban sedimento, se comienzan a observar algunas algas adheridas en los tratamientos y controles; además en el control negativo se encontró presencia de briozoarios y lapas (Figura 18).

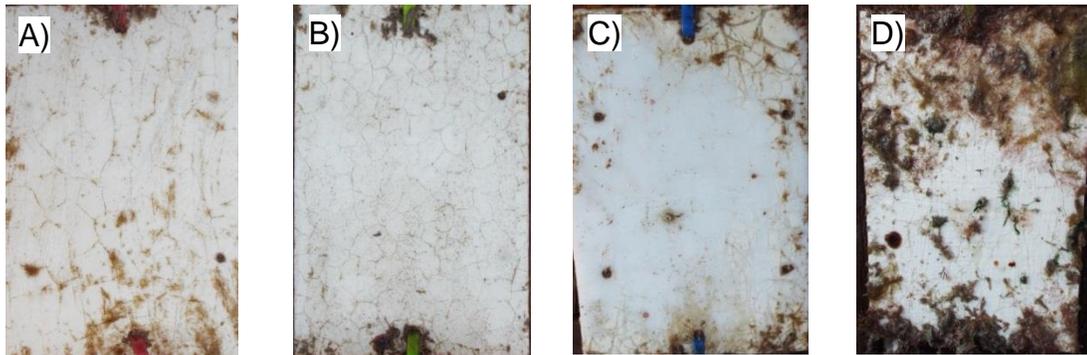


Figura 18. Fotografías a los 60 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH_2Cl_2 , C) CuSO_4 y D) C-.

A los 90 días, se observa adherencia de otros organismos, como poliquetos, ascidias y balanos (Figura 19) siendo visiblemente mayor la cobertura en la placa del control negativo (D).

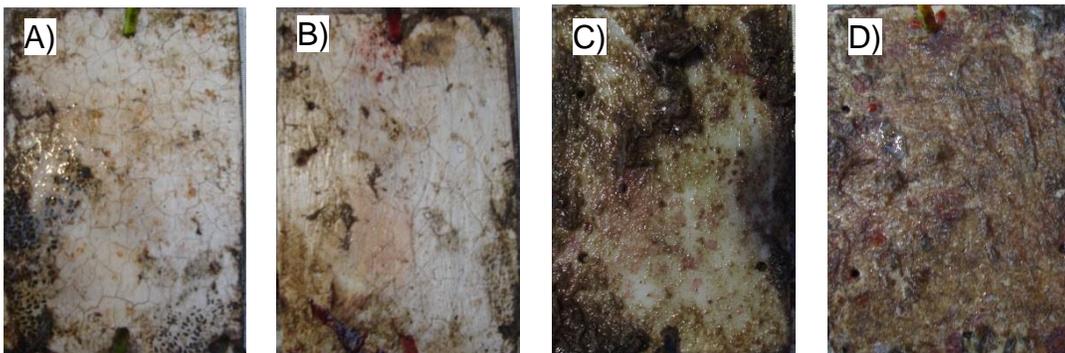


Figura 19. Fotografías a los 90 días de que las placas fueron sumergidas. A) Fase Acuosa, B) CH_2Cl_2 , C) CuSO_4 y D) C-.

Las réplicas de cada tratamiento fueron procesadas individualmente en el programa CPCe, el área colonizada por los organismos incrustantes se expresó en porcentaje del área total del promedio de las réplicas, donde se identificó hasta grupo

de cada organismo (ANEXO VII). Se lograron identificar 6 grupos: algas, ascidias, balanos, briozoarios, moluscos y poliquetos, además de otros organismos que no pudieron ser identificados (N/I), en su mayoría huevos y larvas (Figura 20). Las más predominantes fueron las algas filamentosas, las cuales estuvieron presentes en todos los tratamientos. El extracto CH_2Cl_2 fue el más efectivo para inhibir la adhesión de organismos, incluso de balanos que son el grupo de organismos más difíciles de erradicar. En el control positivo al parecer el sulfato de cobre fue lixiviado con mayor rapidez en los primeros meses de exposición ya que perdió la actividad mostrando una cobertura casi igual al control negativo.

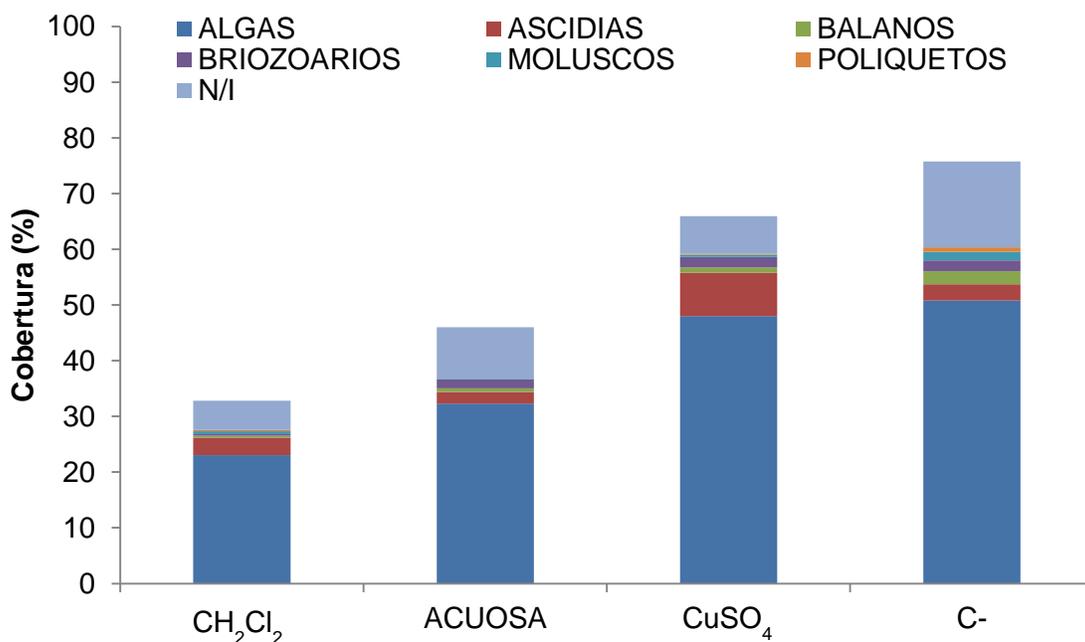


Figura 20. Porcentaje de cobertura por grupo de organismos adheridos para cada tratamiento

8. DISCUSIÓN

Inhibición de la adherencia de bacterias formadoras de biopelículas

La producción de metabolitos depende del tipo de organismo y la maquinaria biosintética que posea, por ello, las condiciones de cultivo (medio, pH, temperatura, competencia, etc.) se convierten en un elemento clave para la producción y descubrimiento de metabolitos, ya que está descrito que dichas condiciones pueden activar o desactivar rutas metabólicas involucradas en los procesos de defensa y adaptación de los organismos (Knight *et al.*, 2003; Martínez-Matamoros, 2012). Estudios de metabolómica han demostrado la necesidad de ensayar diversas metodologías de extracción para recuperar la mayoría de los compuestos que está en capacidad de producir una cepa (Sumner *et al.*, 2003; Martínez-Matamoros, 2012). Por ello, se requiere encontrar una metodología adecuada para lograr extraer los metabolitos responsables de la actividad, así como variar las condiciones de cultivo para promover su potencial metabólico e incrementar el rendimiento de los extractos (Bhattarai, 2007; Martínez-Matamoros, 2012).

Debido a lo anteriormente planteado, se decidió hacer el cultivo de *S. aureus* en tres medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno, carbono y fósforo: caldo marino (CM), infusión cerebro-corazón (CC) y tripticaseína de soya (TSB). El medio CM, al no contener fuente de carbono, se esperaba que impida el crecimiento celular masivo y en cambio favorezca la producción de metabolitos secundarios como una respuesta defensiva (Barry y Norman, 1997). En cambio, los medios CC y TSB contienen como fuente de carbono dextrosa, la cual ha sido reportada como una fuente para la producción de compuestos antimicrobianos (Narayana y Vijayalakshmi, 2008). Además de la fuente de carbono, TSB contiene como fuente de nitrógeno harina de soya, en algunos estudios han observado que en los medios suplementados con este nutriente se obtiene una máxima producción de metabolitos antimicrobianos (Gesheva *et al.*, 2005; Narayana y Vijayalakshmi, 2008). Ji-Lu *et al.* (2012) mencionan que *S. aureus* en un medio complejo que contiene glucosa, catabolizará preferentemente la glucosa más rápido en condiciones aeróbicas para

obtener carbono y energía, muy probablemente esto suceda en los medios utilizados como el CC y TSB que contiene como ingrediente dextrosa.

Otra cuestión a tomar en consideración es el método de extracción, ya que ningún método por si solo es eficiente para obtener todo el potencial metabólico de una bacteria, por lo que el uso y la variación tanto del método como del disolvente de extracción debería ser capaz de recuperar la gran mayoría de compuestos producidos por la bacteria (Martínez-Matamoros, 2012). En este sentido, se usaron dos metodologías (sólido-líquido y líquido-líquido) variando el tipo de disolvente para la extracción de los compuestos producidos por *S. aureus*.

Del proceso de producción y extracción de compuestos metabólicos de *S. aureus*, se obtuvieron 15 extractos variando los medios de cultivo y disolventes, estos extractos fueron evaluados para la inhibición de la adherencia de bacterias involucradas en el proceso del *biofouling*.

El establecimiento de comunidades de microorganismos y macroorganismos sobre un sustrato (bioincrustación) generalmente implica una secuencia de sucesión iniciada por la colonización de superficies por la formación de biopelículas bacterianas (Wahl, 1989) por lo cual el asentamiento de las fases posteriores podría controlarse mediante la prevención de formación de biopelículas (Salta *et al.*, 2013). Por lo tanto, la adhesión bacteriana es probablemente uno de los pasos más críticos para considerar en la búsqueda de un antiincrustante eficiente (Heidarian *et al.*, 2019).

Para realizar este ensayo se utilizaron dos ceparios distintos de BFB, el primer cepario tomado de la colección del laboratorio de microbiología y biología molecular, el cual se obtuvo previamente de placas con Phytigel después de permanecer sumergidas en el mar durante un mes, para ello, se tomaron las bacterias que presentaron mayor capacidad de formar biopelículas basados en los resultados de la prueba con cristal violeta y para la conformación del segundo cepario se aislaron, caracterizaron e identificaron bacterias de probetas metálicas sin ningún biocida después de 24 h de exposición en el mar y del muelle en donde ya se encontraba una comunidad de organismos incrustantes bien establecida, esto con la finalidad de

tener una mayor representación de BFB aisladas de diferentes sustratos y tiempo de exposición, ya que se ha mencionado que el sustrato parece influir en el asentamiento, especialmente en las primeras etapas del acondicionamiento del sustrato y la formación de la biopelícula primaria (Marszalek *et al.*, 1979; Guégan *et al.*, 2014).

Dentro de las bacterias utilizadas para estos ensayos se tienen a representantes de las Proteobacterias, las cuales han sido ampliamente reconocidas como bacterias colonizadoras primarias en superficies expuestas al agua de mar (Dang y Lovell, 2000; 2002; Jones *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2008) en particular las bacterias pertenecientes al grupo de *Alteromonas* de las gamma-proteobacterias (Dang y Lovell, 2000). Además de otros microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* que han sido considerados como formadoras de biopelículas y pioneras en el proceso del *biofouling* (Paul y Jeffrey, 1985; Lee *et al.*, 2003; Maréchal *et al.*, 2004), además se ha encontrado que pueden contribuir a inducir el asentamiento de las larvas de invertebrados (Huggett *et al.*, 2008).

Con los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de biopelículas se pudo comprobar que al cultivar a *S. aureus* en diferentes medios de cultivo la actividad de los extractos para inhibir la formación de biopelículas varió, siendo mayor con los extractos obtenidos con el medio TSB con un porcentaje de inhibición del 75%, por lo que fue seleccionado para continuar con los siguientes ensayos. Este medio al contener las fuentes de carbono y nitrógeno ya mencionadas resultó ser un medio de cultivo apropiado para la producción de los compuestos orgánicos de interés. Coincidiendo con lo mencionado por otros autores como Khattab *et al.* (2016), quienes reportan que la máxima producción de compuestos se obtuvo con la harina de soya como fuente de nitrógeno, ellos utilizaron también el medio de cultivo TSB para optimizar la producción de compuestos antimicrobianos de *Streptomyces*, asimismo, Vijayakumari *et al.* (2013) evaluaron el crecimiento y producción de compuestos de la bacteria *Xenorhabdus* en diferentes medios de cultivo, encontrando que creció bien en los medios TSB, LB y NB, aunque en TSB el rendimiento y la actividad fueron mayores. De acuerdo con el presente estudio, Bavya *et al.* (2011) y Prakash *et al.* (2015) observaron actividad *antimicrofouling* con

el extracto crudo de *Streptomyces filamentosus* R1 y *S. fradiae* frente a bacterias formadoras de *biofilm* como *Bacillus*, *Serratia* y *Alteromonas* sp., utilizando harina de soya como como fuente de nutriente para la obtención de los compuestos activos.

En cuanto a las variaciones en la actividad dependiendo de los disolventes utilizados para la extracción de los metabolitos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la inhibición de la formación de biopelículas, sin embargo, con el extracto de la fase acuosa del CH₂Cl₂ se obtuvo un porcentaje ligeramente mayor de actividad, mientras que con el extracto realizado con la resina Diaion® HP-20 (metanol:acetato de etilo 1:1) se encontró la menor actividad inhibitoria, este método de extracción fue utilizado por Rico-Virgen (2017) y Sánchez-Rodríguez *et al.* (2018) para la evaluación de la actividad *antifouling* y con base en los resultados obtenidos podemos observar que la utilización de diferentes disolventes permite recuperar metabolitos más activos o en mayor concentración posiblemente debido a la selectividad de los disolventes empleados permitiendo una extracción más eficiente. Las resinas han sido muy empleadas para el estudio de extractos de origen microbiano, pues permiten la eliminación de sales, una alta recuperación de los compuestos orgánicos producidos en el cultivo. Entre ellas, las resinas más empleadas son las XAD-16 y HP-20, ya que por su porosidad permiten recuperar un amplio rango de compuestos y generar extractos con un rendimiento significativo, lo cual permite su posterior evaluación de actividad biológica. En específico, Diaion® HP-20 tiene la capacidad de retener compuestos de naturaleza orgánica desde polares hasta no polares y otros compuestos altamente hidrofílicos, de esta manera se puede obtener un extracto enriquecido en una gran diversidad de compuestos orgánicos a partir de disoluciones acuosas ricas en electrolitos (Li *et al.*, 2010). Mientras que con la extracción líquido-líquido de los medios de cultivo con CH₂Cl₂, se obtuvo un extracto de menor polaridad (Extracto CH₂Cl₂) para conseguir compuestos terpenoides y la fase acuosa se extrajo empleando resina Diaion HP-20, con el fin de recuperar los compuestos de polaridad mayor (extracto de la fase acuosa) que no habían sido extraídos con el CH₂Cl₂ (extracto de la fase acuosa).

Para el género *Staphylococcus*, se conocen algunos péptidos antimicrobianos como la epidermina y gallidermina aislados de *S. epidermidis* y *S. gallinarum*, respectivamente (Ebner *et al.*, 2018). Vandecandelaere *et al.* (2014) mencionan que *S. epidermidis* produce una proteasa capaz de inhibir y degradar la formación de biopelículas de *S. aureus*. Sin embargo, a pesar de que ya se mencionó que no hay suficientes estudios que evalúen actividad *antifouling* para *S. aureus*, se ha demostrado un efecto de antibiosis de esta especie sobre *Aspergillus fumigatus* en la producción de biopelículas, los autores sugieren que esto podría ser causado por algún metabolito producido por *S. aureus*, (Ramírez-Granillo *et al.*, 2015) aunque, no dan más detalles sobre qué tipo de compuesto pudiera ser el responsable. Camarillo-Márquez *et al.*, (2018) también mencionan sobre un comportamiento antagónico del sobrenadante libre de células de *S. aureus* frente a *Candida glabrata*, disminuyendo la formación de biopelículas, sugiriendo la presencia de una sustancia inhibitoria que muestra resistencia al calor, la cual pudiera ser una bacteriocina. La producción de bacteriocinas por *S. aureus* ya había sido reportada anteriormente (Hammami *et al.*, 2013) y como péptidos termoestables (Netz *et al.*, 2001, 2002; Carlin-Fagundes *et al.*, 2016) con actividades frente a varias especies de bacterias patógenas (Nascimento *et al.*, 2006). Se tienen reportes también de la producción de metabolitos como la tirvalina y la fevalina (conocidas como aureusimina A y B, respectivamente) que son péptidos no ribosomales que regulan la expresión del gen de virulencia (Wyatt *et al.*, 2011; Secor *et al.*, 2012), al igual que la producción de otros metabolitos como son la bencil metil cetona o N-(2,5-Diciano-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-il)-acetamida, entre otros alcaloides, que presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos, lo que pudiera indicar que algunos de estos compuestos pudieran ser los responsables de la actividad obtenida en este trabajo.

Toxicidad de los extractos orgánicos seleccionados

Debido a todas las regularizaciones que se han planteado para incorporar cualquier compuesto al medio ambiente, es importante evaluar el potencial tóxico *in vivo* de los extractos, en este panorama, los bioensayos de toxicidad son empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Por ser un parámetro muy evidente, los modelos con el crustáceo *Artemia* se han considerado tradicionalmente como el mejor indicador de la capacidad tóxica de una sustancia (Bartolomé-Camacho y Sánchez-Fortún, 2007). Los extractos se consideran tóxicos cuando presentan concentraciones medias letales (CL₅₀) menores a 100 µg/mL (Martínez *et al.*, 2011), y se consideran no tóxicos cuando presentan valores de CL₅₀ superiores a 1,000 µg/mL (Férrandez-Calienes *et al.*, 2009). Por otro lado, Meyer (1982) categoriza los niveles de toxicidad en: (1) altamente tóxico de 1-10 µg/mL; (2) toxico de 10-100 µg/mL; y (3) baja toxicidad de 100-1000 µg/mL.

De acuerdo con lo anterior, se evidenció que los extractos probados no son tóxicos al mostrar una CL₅₀ mayor a 1,000 µg/mL, a diferencia del control positivo (CuSO₄) (0.77 µg/mL) que resulto ser extremadamente tóxico (CL₅₀ <10 µg/mL) de acuerdo a la clasificación de Férrandez-Calienes *et al.* (2009) al igual que el TBT (0.00001 µg/mL) que fue considerado por mucho tiempo el mejor compuesto *antifouling* (Cardwell *et al.*, 1999).

El extracto realizado con cloroformo, aunque presentó una CL₅₀ mayor a 1,000 µg/mL mostró un mayor porcentaje de mortalidad de nauplios por lo que se descartó para las pruebas en campo, en el caso del extracto obtenido con resina también se observó mayor mortalidad de *Artemia*, sin embargo, se consideró seguir con su evaluación hasta las pruebas en geles ya que era importante para compararlo con los resultados obtenidos por Rico-Virgen (2017) utilizando esta misma cepa y forma de extracción.

Actividad antiincrustante de extractos a diferentes concentraciones

Como una forma previa de evaluar si la actividad inhibitoria de biopelículas observada en laboratorio podría ser el reflejo de una actividad antiincrustante al

inhibir la primera fase del proceso o formación del *biofouling* se incluyeron los extractos en un gel inerte permitiendo la liberación gradual de los compuestos al medio, este gel es lo suficientemente consistente para facilitar la fijación de organismos, debido a que es sólido, translucido e incoloro y facilita su observación (Santos Acevedo et al., 2012; Rico-Virgen, 2017).

Con los resultados obtenidos se pudo comprobar que los extractos muestran también actividad inhibitoria del asentamiento de macroorganismos, siendo notable la diferencia con respecto al control negativo y muy similar al control positivo con sulfato de cobre. Se encontró también que la actividad fue mejor que la obtenida previamente por Rico Virgen (2017) quien obtuvo un 10% de cobertura siguiendo esta misma metodología de los geles de Phytigel con el extracto incorporado. En el caso del citado estudio el extracto se realizó con esta misma cepa de *Staphylococcus* cultivada en caldo marino, obteniendo los metabolitos con resina Diaion HP-20 empleando los disolventes metanol y acetato de etilo (1:1) como eluyentes. Por lo que se puede observar que al utilizar el medio de cultivo TSB en el presente trabajo se logró incrementar la actividad, ya que, siguiendo el mismo método de obtención de metabolitos con resina, el porcentaje de cobertura fue menor al 4%.

Los extractos fueron probados a diferentes concentraciones, sin embargo, no fue posible observar una relación entre la actividad y la concentración, ya que la mayor actividad de inhibición de asentamiento no está relacionada con la mayor concentración de extracto incorporado en el gel, como debiera esperarse, esto pudiera deberse a cuestiones metodológicas ya que no se encuentra otra explicación a esta variación en la actividad ni se cuenta con otros trabajos en condiciones similares que pudieran ayudar a entender o comparar estos resultados. Lo que si fue posible observar es que en la mayoría de los casos se obtuvo un porcentaje de cobertura muy similar o menor al control positivo con la menor concentración probada (750 µg/mL).

La mayor actividad en los geles con los diferentes extractos, en comparación con el control negativo, podría deberse en parte a una inhibición relativa de la

formación de la biopelícula, como se observó en los bioensayos de laboratorio, aunque esto no ha sido comprobado ya que no se evaluó el *microfouling* adherido a las placas. Sin embargo, se sabe que las biopelículas son importantes para el asentamiento de larvas de invertebrados marinos y esporas de macroalgas (Wieczorek y Todd, 1998; Maki, 2002; Railkin, 2004; Dobretsov *et al.*, 2006), estas pueden mejorar (Kirchman, *et al.* 1982; Patel *et al.*, 2003; Qian *et al.*, 2003) o inhibir (Maki, 2002; Holmström *et al.*, 2002; Egan *et al.*, 2001; Dobretsov y Qian, 2002; 2004) el asentamiento de los organismos epibiontes y epífitos.

Una comunidad macroincrustante consiste en “organismos incrustantes suaves” u “organismos incrustantes duros”, que pueden desarrollarse y crecer sobre los microorganismos (microincrustantes). Los organismos incrustantes suaves comprenden algas e invertebrados, como corales blandos, esponjas, anemonas, tunicados e hidrozooos; mientras que los organismos incrustantes duros comprenden invertebrados como percebes, mejillones, balanos y gusanos tubícolas. Los organismos específicos que se desarrollan en una comunidad incrustante dependen mucho del sustrato, locación geográfica, estación del año y factores como la competencia y depredación (Callow y Callow, 2002). En el presente estudio, se observaron organismos incrustantes suaves en todas las placas experimentales, en su mayoría algas, ocupando un porcentaje de cobertura mayor (3.2%). Las algas verdes del género *Enteromorpha* son las más importantes ya que se incrustan en barcos, submarinos y estructuras submarinas. La dispersión y rápida colonización de sustratos por las especies de este género incrustante son principalmente a través de la producción de un gran número de esporas móviles y su capacidad para ubicar superficies en donde asentarse lo cual puede estar relacionado con la densidad de esporas y estar mediado por una serie de señales externas que incluyen ácidos grasos y “detrito” (Callow y Callow, 2000).

Por otro lado, el porcentaje de cobertura por parte de las algas fue mayor (3.5%) que otros organismos en el control positivo, un resultado interesante ya que tanto el sulfato de cobre como el óxido cuproso se consideran como los biocidas más efectivos por su amplio espectro de prevención (Cardenas, 2010), para explicar este resultados Covarrubias-Rubio *et al.* (2016) mencionan que muchas microalgas tienen

la capacidad de desarrollarse incluso en altas concentraciones de metales pesados presentes en ambientes acuosos y terrestres gracias a la formación de EPS, que actúan uniendo los metales a los grupos carboxilo, sulfato y fosfato de las colonias microalgales, detoxificando el sustrato y proveyendo un ambiente favorable para el desarrollo de interacciones microbianas.

Efecto de los extractos con mayor bioactividad frente a organismos implicados en el *biofouling* y los organismos “no-objetivo”.

Cualquier aplicación biotecnológica de compuestos bioactivos requiere de evidencia derivada de bioensayos que muestren que los componentes no son tóxicos, ni activos contra especies no-objetivo, que son inofensivos para los humanos, y que no son contaminantes (Clare, 1998).

Con el propósito de evaluar el efecto de los extractos seleccionados (Resina, CH₂Cl₂ y la fase acuosa del CH₂Cl₂) sobre el *microfouling* (bacterias y microalgas) se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento y de adherencia y se pudo observar que los extractos no inhiben en gran medida el crecimiento de bacterias, sino que interfieren directamente en la formación de la biopelícula, lo cual podría indicar que los extractos no presentan una toxicidad que cause la mortalidad o evite el crecimiento, por lo cual se postulan como promisorios compuestos *antifouling* ya que evitan la maduración del *biofilm* sin matar a las bacterias. Al respecto, en un trabajo realizado por Heidarian *et al.* (2019) con el extracto de la cepa *Glycomyces sediminimaris* UTM 2460, encontraron una inhibición de la adherencia en un 72-95% sin ningún efecto antibacteriano frente a bacterias implicadas en el proceso de *biofouling*, indicando una toxicidad bacteriana limitada y una actividad inhibidora del extracto sobre los microorganismos y mencionan que debido al mecanismo de acción de los extractos éstos tienen una ventaja al ser administrados para inhibir la formación de biopelículas ya que no dañarán el equilibrio de la microflora en los hábitats marinos. Así mismo, Bernbom *et al.* (2011) encontraron que varias cepas de *Pseudoalteromonas* no tuvieron efecto antagónico frente a cepas del mismo género, pero si impidieron su adhesión y mencionan que estas cepas pueden producir una

molécula antiadhesiva específica, la cual pudiera ser una proteína, como la galactosamina (Gorshkova *et al.*, 2001) que se conoce que reduce la adhesión de bacterias marinas que usan la señalización autoinductora tipo 2 (Kim *et al.*, 2011).

Al igual que con las bacterias, los extractos no resultaron ser tóxicos a las microalgas probadas, pero si fueron bioactivos en la inhibición de la adherencia. A diferencia de lo encontrado previamente con esta misma cepa por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2018), ya que el extracto obtenido en CM con Resina Diaion (Metanol:Acetato de etilo 1:1) mostró actividad inhibitoria de crecimiento de las microalgas *Cylindrotheca closterium*, *Exanthemachrysis gayraliae*, *Halamphora coffeaeformis*, *Pleurochrysis roscoffensis* y *Porphyridium purpureum* a CMI de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ coincidiendo con lo reportado por Ramasubburayan *et al.* (2017), quienes obtuvieron un extracto de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* que fue efectivo para inhibir el crecimiento de varias cepas de microalgas contaminantes.

Aunque varios estudios evidenciaron la actividad antimicroalgal de bacterias marinas (Farooq *et al.*, 1998; Maskey *et al.*, 2002; Sakata *et al.*, 2011), su mecanismo de acción sigue sin estar claro. Lewin (1995) menciona que algunos compuestos pueden estar interfiriendo con algunas de las actividades enzimáticas de las microalgas e inhibiendo así el crecimiento celular sin embargo esto no ha sido evaluado. Y con ello no se puede dar una explicación clara a lo que ocurrió con los extractos obtenidos de *S. aureus* que en este estudio no lograron inhibir el crecimiento, pero si la adhesión de las microalgas. Hay muy pocos estudios en donde se evalúe la inhibición del asentamiento de las microalgas, uno de ellos es el realizado por Satheesh *et al.* (2012) quienes analizaron la actividad de bacterias asociadas a la esponja *Sigmadocia* sp. y encontraron también que fueron más efectivas para prevenir la adhesión que para inhibir el crecimiento y en particular el extracto de la cepa *Bacillus cereus* SS05 mostró una fuerte actividad inhibitoria en el asentamiento de *Chlorella* sp.

Una vez que se evaluó la actividad antimicrofouling, y se concluyó que los extractos inhibieron la adherencia de los microorganismos, se prosiguió a evaluar la actividad antimacrofouling, para ello se realizaron los ensayos sobre la enzima

fenoloxidasa, principal enzima que interviene en el asentamiento de mejillones y ensayos de toxicidad e inhibición del asentamiento de *A. amphitrite*.

La actividad antiincrustante en los mejillones se determina registrando la capacidad de fijación de adultos o larvas. A menudo se utilizan dos métodos diferentes, el primero basado en el proceso de adhesión de los mejillones a sustratos sólidos (Harada *et al.*, 1984; Ina *et al.*, 1989; Vanelle y Le Gal, 1995) y el segundo utiliza la aplicación directa del extracto en el pie del mejillón (Kitajima *et al.*, 1995; Hayashi y Miki, 1996). Sin embargo, ambos métodos no son factibles porque requieren una gran cantidad de material y mucho tiempo para las pruebas. Por ello, se implementó una forma de realizar ensayos más sencillos que se basan en la medición de la actividad fenoloxidasa en presencia de las sustancias con actividad *antifouling*. *Mytilus edulis*, produce compuestos bioadhesivos que consisten en proteínas que son secretadas por el pie (Waite y Tanzer, 1980; Waite, 1983). Estas proteínas adhesivas contienen un aminoácido que se deriva de un residuo de tirosilo a través de su oxidación postraducciona por la enzima fenoloxidasa.

En el presente estudio se utilizó este último ensayo, el cual se realizó con la enzima análoga de la fenoloxidasa que es la tirosinasa, en donde se evalúa el efecto de los extractos sobre la actividad cinética de la enzima (Hellio *et al.*, 2000).

Se evaluaron los extractos que mostraron buena actividad en todas las pruebas anteriores. Los resultados obtenidos evidenciaron que el extracto de la fase acuosa del CH₂Cl₂ se comportó de forma similar al sulfato de cobre, el cual ha presentado una inhibición de hasta un 80% (Hellio *et al.*, 2000) por lo tanto se puede decir que el extracto de la fase acuosa del CH₂Cl₂ podría aletargar el asentamiento de macroorganismos como los mejillones. Hellio *et al.* (2004) reportan la actividad mensual antiadherente con varios extractos acuosos, etanólicos y de diclorometano a lo largo de un ciclo anual, mencionan también que los extractos que mostraron mayor inhibición de la actividad enzimática fueron los extractos etanólicos y de diclorometano.

Otro de los organismos que se encuentran implicados en el *biofouling* son los balanos, estos se encuentran entre los organismos que causan mayores

problemáticas en la industria marítima, en especial para los encargados de mantener limpias las superficies de las embarcaciones ya que se adhieren firmemente mediante la producción de un cemento adhesivo, el cual es un complejo proteico insoluble en agua que dificulta mucho su desprendimiento y *A. amphitrite* en particular, es la especie más importante desde el punto de vista económico (Anil *et al.*, 2012; Fales, 2014). Por lo que las investigaciones para la búsqueda de alternativas antiincrustantes se han basado en la exploración de compuestos inhibidores de este complejo proteico (Pawlik, 1992; Clare, 1996; Fusetani, 1997; Slattery, 1997; Hadfield, 1998; Tsukamoto *et al.*, 1999; Zimmer y Butman, 2000; Hadfield y Paul, 2001; Rittschof, 2001; Steinberg *et al.*, 2001; de Nys y Steinberg, 2002; Steinberg *et al.*, 2002). Tomando en cuenta estos antecedentes en el presente trabajo se evaluó el efecto de los extractos sobre el asentamiento de los balanos en su etapa de cipris, encontrando que el extracto de la fase acuosa inhibe posiblemente las señales químicas, ya que ninguna de las cipris se adhirió ni llevo a cabo la metamorfosis logrando inhibir el asentamiento a la menor concentración probada (50 µg/mL). El extracto de CH₂Cl₂ fue el que presentó los mejores resultados al inhibir el asentamiento de *A. amphitrite*, en otros estudios los compuestos obtenidos con CH₂Cl₂ han sido de origen terpenoide (Tiwari *et al.*, 2011), Hirota *et al.* (1998), aisló también compuestos de este tipo, los cuales mostraron actividad antiadherente frente a la cipris de *A. amphitrite*, en este mismo trabajo se informó la identificación de los compuestos como sesquiterpenos encontrados en dos especies de esponjas del género *Axinyssa* y del género *Cacospongia*.

Además de evaluar la actividad frente a organismos implicados en el proceso de *biofouling*, es importante realizar evaluaciones tóxicas frente a organismos “no-objetivo”, con la finalidad de conocer si el uso de los extractos podría ser dañino para organismos ajenos al proceso de *biofouling* o al ser incorporados a recubrimientos no sea dañino para el ser humano.

Se evaluó el efecto tóxico frente a la línea celular 16HBE (Células Epiteliales Bronquiales Humanas), la cual es empleada en pruebas para determinar toxicidad *in vitro* de los compuestos. Al igual que en los resultados de toxicidad frente a *Artemia*, los extractos ejercieron un efecto citotóxico insignificante en las células 16HBE. El

número de células viables tras la exposición a los extractos estuvo en el rango de 80 a 100%, por lo cual se podría inferir que en este sentido no son tóxicos para el humano. Estudios anteriores demostraron que algunos compuestos como la plata exhiben citotoxicidad letal en concentraciones tan bajas como 2 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a células bronquiales (Hussain *et al.*, 2005; Bar-Ilan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). En este trabajo a pesar de las concentraciones más altas probadas (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ninguno de los extractos altero la viabilidad de las células. Diferentes estudios han demostrado la infiltración de células inflamatorias, la liberación de citocinas proinflamatorias y el estrés oxidativo en el pulmón después de la exposición a diversos compuestos (Napierska *et al.*, 2010, Shi *et al.*, 2013). Algunos autores también han investigado la asociación entre la exposición a sustancias químicas y su toxicidad, como por ejemplo carcinógenos ambientales, los cuales disminuyen la viabilidad en las células 16HBE, como es el caso del TBT utilizado anteriormente en recubrimientos antiincrustantes (Hanaoka *et al.*, 2018).

Adicionalmente, en el presente trabajo se evaluó el efecto tóxico de los extractos que presentaron los mejores resultados en los ensayos anteriores (CH_2Cl_2 y la fase acuosa del CH_2Cl_2) frente a nauplios en estadio II de *A. amphitrite* y los resultados obtenidos mostraron que el extracto de CH_2Cl_2 no es tóxico con una CL_{50} mayor a 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por lo que se puede decir que el extracto de CH_2Cl_2 es idóneo para obtener compuestos con actividad antiincrustante, por otro lado, el extracto de la fase acuosa de CH_2Cl_2 es moderadamente tóxico ya que presentó una CL_{50} de 202 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que podría indicar que a pesar de tener actividad frente a organismos involucrados en el proceso del *biofouling* podría ser tóxico frente a organismos “no-objetivo” como las etapas naupliares tempranas, ya que en estas etapas los organismos son más susceptibles que en cualquier otra etapa (Jian-Wen *et al.*, 2005).

Efectividad de extractos incorporados en una matriz de pintura.

En algunos estudios como el de Bressy *et al.* (2010) han encontrado que los resultados de actividad obtenidos en ensayos de laboratorio frente a bacterias,

microalgas y balanos no se reflejan en los ensayos en campo al incorporar los extractos a una pintura, por ello es importante evaluar la eficiencia después de la inmersión en el medio natural.

Para este estudio, se seleccionaron los extractos con mejor actividad para ser incorporados en una matriz de pintura la cual fue proporcionada por una empresa de pinturas comercial, esta matriz contiene brea de pino con una matriz insoluble de resina hidrocarbonada, curada por secado al aire. Los resultados revelaron que los recubrimientos de las placas redujeron considerablemente el *biofouling* en un periodo de 90 días al igual que en el trabajo realizado por Viju *et al.* (2016) donde obtuvieron resultados similares evaluando sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de bacterias aisladas de un gasterópodo (*Turbo sp.*) incorporada en una matriz de pintura, la más activa fue de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, que redujo el incrustamiento después de 50 días de inmersión, además ellos caracterizaron la EPS por espectroscopía de infrarrojos por transformación de Fourier (FT-IR) y el espectro mostró presencia de alcohol, aminas, ácidos carboxílicos y esterres. Eguía y Trueba (2007) también obtuvieron buenos resultados al evaluar la actividad antifouling de extractos obtenidos de *Bacillus* y *Pseudomonas*, ellos identificaron los compuestos activos, entre ellos el ácido Pyolípico, siendo el primer reporte de actividad antifouling para ese compuesto.

La posible inhibición de la colonización pudo estar influenciada por los efectos de los compuestos químicos exudados o asociados a la superficie de la pintura, por respuestas quimiotácticas (repulsión) o factores que pudieron afectar la motilidad de las células y la producción de polímeros extracelulares usados para que los organismos se fijen permanentemente (Puyana, 2001). Asimismo, las larvas responden a diversas señales químicas disueltas en la columna de agua que favorecen el asentamiento, por lo que los extractos liberados de las placas pudieron alterar estas señales, causando la disminución observada en la macroepibiosis (Echeverría, 2007). Los poliquetos y balanos generalmente responden positivamente a la presencia de películas bacterianas (Fusetani, 1997), esta pudiera ser la razón de la disminución de estos epibiontes sobre las placas con los extractos bacterianos. Al igual que en este estudio, Bazes *et al.* (2009) incorporaron el extracto de CH₂Cl₂ del

alga *Sargassum muticum* dentro de la pintura que contenía cobre y ese recubrimiento fue más activo frente a organismos marinos incrustantes que la pintura que solo contenía cobre en un periodo de 60 días, así mismo, Sánchez-Lozano *et al.* (2019) obtuvieron buenos resultados con una formulación de pintura que incluye extractos de la esponja *Haliclona caerulea* y *Sargassum horridum* con una reducción del 32% de la bioincrustación en comparación con el control.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el control positivo (CuSO_4) no fueron los esperados por ser un compuesto altamente tóxico, esto puede ser porque el sulfato de cobre no se disolvió correctamente en la matriz por lo que, al no quedar bien incorporado, la lixiviación del compuesto fue más rápida que en las placas donde se incorporaron los extractos bacterianos, ya que solo durante los primeros dos meses de inmersión tuvo un efecto inhibitor. En general, el objetivo de la composición de las pinturas es que las cargas tóxicas del biocida se liberen lentamente por lixiviación, a manera de crear una atmósfera letal alrededor de la superficie protegida, impidiendo el asentamiento de organismos incrustantes (Lewis, 1998, Yebra *et al.*, 2004).

Adicionalmente, diversos estudios demuestran que los organismos marinos varían en su acumulación y tolerancia al cobre y zinc, debido en parte a las vías de captación y asimilación. No obstante, la toxicidad de los metales en estos organismos también se ve influenciada por factores bióticos como la edad, el sexo y el tamaño del organismo afectado (Sneddon y Tremblay, 2011).

9. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que al variar el medio de cultivo y el solvente aumentó la actividad antiincrustante de los compuestos producidos por la bacteria *S. aureus* tanto en laboratorio como en campo. La actividad antiadherente frente a bacterias y microalgas, así como la inhibición de la enzima fenoloxidasa y la no toxicidad de los extractos probados contra nauplios de *Artemia franciscana* y *Amphibalanus amphitrite*, sugieren que los extractos obtenidos de *S. aureus* tienen un bajo impacto ecológico sobre organismos no objetivo, adicionalmente tienen la ventaja de ser inocuos para células epiteliales de bronquios humanos, por lo cual pueden ser utilizados de manera segura en matrices con diferentes aplicaciones, ya sea para la industria naviera, acuícola o en cualquiera que el *biofouling* sea un causante de inconvenientes, por lo tanto se concluye que *S. aureus* es una fuente potencial de compuestos con actividad *antifouling*, por lo cual se acepta la hipótesis propuesta en este trabajo.

10. LITERATURA CITADA

- Abarzua, S. and Jakubowski, S. (1995). Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series*. 20: 111–123.
- Acosta, A. and Rodríguez, A. (1992). 11-Oxo-aerolithionin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunose*. *Journal of Natural Products*. 55(7): 1007-1012.
- Aguila-Ramírez, R. N. (2012). Caracterización y bioactividad de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, Posgrado en Ciencias Marinas. 168 p.
- Aguila-Ramírez, R., Hernández-Guerrero, C., González-Acosta, B., Id-Daoud, G., Hewitt, S., Pope, J. and Hellio, C. (2014). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 90: 64-70.
- Ahmed, N., Uzair, B. and Ahmed, V. (2007). Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan. *The Internet Journal of Microbiology*. 4 (2): 1-8.
- Álvarez, B., Secades, P., Prieto, M., McBride, M.J. and Guijarro, J.A. (2006). A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4044-4053.
- Alyürük, H., and Çavaş, L. (2013). Toxicities of diuron and irgarol on the hatchability and early stage development of *Artemia salina*. *Turkish Journal of Biology*. 37(2): 151-157.
- Ámsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4: 52-111.
- Anil, A., Desai, D., Khandeparker, L. and Gaonkar, C. (2012). Barnacles and their significance in biofouling. *Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems*. 65-93.

- Arakawa, K. (1980). Prevention and removal of fouling on cultured oysters: A handbook for growers. *Marine Sea Grant Technical Report*. 56: 38 p.
- Arias, J., Zea, S., Newmark, F. y Santos-Acevedo, M. (2006). Determinación de la capacidad antiepibiótica de los extractos orgánicos crudos de las esponjas marinas *Cribrochalina infundibulum* y *Biemna cribarí*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. 35: 91-101.
- Armstrong, E., Boyd, K. G. and Burgess, J. G. (2000). Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review*. 6: 221-241.
- Avendaño, R., Riquelme, C., Escribano, R. y Reyes, N. (2001). Sobrevivencia y crecimiento de post-larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en Bahía Inglesa, Chile: efectos del origen, distribución en la bahía y bacterioflora larval. *Revista Chilena de Historia Natural*. 74 (3).
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Moriñigo, M. A., Romalde, J. L. and Toranzo, A. E. (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*. 25: 70–74.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R., Fako, V. And Furgeson, D. (2009). Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Small*. 5(16): 1897-1910.
- Barcia-Leal, C., Guíllermes, M., Fernández-Pulpeiro, E. y Cremades, J. (1995). Efectividad de las pinturas antifouling en el puerto de Vigo (Galicia, N.O. de la Península Ibérica). *Nova Acta científica compostelana (Biología)*. 5: 251-266.
- Barreiro, R., Quintela, M. y Ruiz, J. (2004). TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Revista Científica de ecología y Medio Ambiente*. 13(3): 13-29.
- Barry, K. and Wainwright, N. (1997). Biosynthetic induction of a secondary metabolites by a marine bacterium under nutritional stress: Potential role of the incomplete oxidation of an organic acid. *The Biological Bulletin*. 193: 274-275

- Bartolomé-Camacho, M. y Sánchez-Fortún Rodríguez, S. (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*. *Revista latinoamericana de Recursos Naturales*. 3(1): 90-97.
- Baumann, P., Gauthier, M. J. and Baumann, L. (1984). Genus *Alteromonas*. Baumann, Baumann, Mandel and Allen 1972. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 243–354. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bavya, M., Mohanapriya, P., Pazhanimurugan, R., and Balagurunathan, R. (2011). Potential bioactive compound from marine actinomycetes against biofouling bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 40: 578–582.
- Bazes, A., Silkina, A., Douzenel, P., Fay, F., Kervarec, N., Morin, D., Berge, J. and Bourgougnon, N. (2009). Investigation of the antifouling constituents from brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology*. 21: 395-403.
- Bernbom, N., Ng, Y. Y., Kjelleberg, S., Harder, T., and Gram, L. (2011). Marine bacteria from Danish coastal waters show antifouling activity against the marine fouling bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91 and zoospores of the green alga *Ulva australis* independent of bacteriocidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(24): 8557-8567.
- Bhatnagar, I. and Kim, S. (2010). Immense essence of excellent: Marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*. 8: 2673-2701.
- Bhattarai, H.D., Ganti, V.S., Paudel, B., Lee, Y.K., Lee, H.K., Hong, Y.K. and Shin, H.W. (2007). Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 243-249.
- Bravo, A. and Acuña, W. (2015). Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. *Xilema*. 28: 61-67.

- Bressy, C., Hellio, C., Marechal, J. P., Tanguy, B., and Margaillan, A. (2010). Bioassays and field immersion tests: a comparison of the antifouling activity of copper-free poly (methacrylic)-based coatings containing tertiary amines and ammonium salt groups. *Biofouling*, 26(7): 769-777.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L.M., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A. and Adams, D.R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*. 19: 197–205.
- Calixto, D., Velosa, L. M., Acosta, E. M., Puyana, M., Morales, A., Panqueva, J. H. y Meza, M. J. (2007). Valoración de la efectividad anti-incrustante de recubrimientos aplicados a embarcaciones que operan en la bahía de Cartagena. *Ciencia y Tecnología de Buques*. 1: 17-26.
- Callow, M. and Callow, J. (2000). Substratum location and zoospore behavior in the fouling alga *Enteromorpha*. *Biofouling*. 13: 49-56.
- Callow, M. and Callow, J. (2002). Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*. 49(1): 10-14.
- Camarillo-Márquez, O., Córdova-Alcántara, I., Hernández-Rodríguez, C-. García-Pérez, B. Martínez-Rivera, M. and Rodríguez-Tovar, A. (2018). Antagonistic interaction of *Staphylococcus aureus* toward *Candida glabrata* during *in vitro* biofilm formation is caused by an apoptotic mechanisms. *Frontier in Microbiology*. 9: 2031.
- Cárdenas, T.G. (2010). Composición de pintura anti-incrustante a base de complejo de quitosano-cobre (i) y método para obtenerla. *Publicada en Virtud del tratado de cooperación en Materia de Patentes*. 29pp.
- Cardwell, R., Brancato, M., Toll, J., Deforest, D. and Tear, L. (1999). Aquatic ecological risks posed by tributyltin in United States surface waters: pre-1989 to 1996 data. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18: 567-577.
- Carlin-Fagundes, P., Miceli de Farias, F., Cabral da Silva Santos, O., Souza de Paz, J. A., Ceotto-Vigoder, H., Sales Alviano, D., Villela Romanos, M. and de Freire

- Bastos, M. (2016). The four-component aureocin A70 as a promising agent for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 237: 39–46.
- Castritsi-Catharios, J., Bourdaniotis, N., and Persoone, G. (2007). A new simple method with high precision for determining the toxicity of antifouling paints on brine shrimp larvae (*Artemia*): First results. *Chemosphere*. 67 (6): 1127-1132.
- Champ, M. (2001). The status of the treaty to ban TBT in marine antifouling paints and alternatives. *Proceedings of the 24th UJNR (US/Japan) Marine Facilities Panel Meeting, Hawaii*. 7 p.
- Clare, A. S. (1996). Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling*. 9(3): 211-229.
- Clare, A. S. (1998). Towards non-toxic antifouling. *Journal Marine Biotechnology*. 6: 3-6.
- Clare, A. and Matsumura, K. (2000). Nature and perception of barnacles settlement pheromones. *Biofouling*. 15: 57-71.
- Covarrubias Rubio, Y., Cantoral Uriza, E. A., Casas Flores, J. S. and García Meza, J. V. (2016). Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. 87(2): 277-287.
- Da Gama, B., Pereira, R., Soares, A., Teixeira, V. and Yoneshigue-Valentin, Y. (2003). Is the Mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*. 19: 161-169.
- Dafforn, K., Lewis, J. and Johnston, E. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*. 62: 453-465.
- Dang, H.Y. and Lovell, C.R. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surface in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2):467-475.

- Dang, H.Y. and Lovell, C.R. (2002). Numerical dominance and phylotype diversity of marine Rhodobacter species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(2): 496-504.
- Dang HY., Li, TG., Chen, MN. and Huang, G.Q. (2008). Corss-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1):52-60.
- Dash, S., Jin, C., Lee, O. O., Xu, Y. and Qian, P. Y. (2009). Antibacterial and antilarval-settlement potential and metabolite profiles of novel sponge-associated marine bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 1047–1056.
- Davies, A. (1995). NERC News.
- De Nys, R., Steinberg, P., Willemsen, P. Dworjanyn, S., Gabelish, S. and King, R. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 8: 259-271.
- De Nys, R. and Steinberg, P. D. (2002). Antifouling: the sea approach. *Biofutur*. 228: 40–42.
- Devi, P. Wahidullah, S., Rodrigues, C. and Souza, L. (2010). The sponge-associated Bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Marine drugs*. 8: 1203-1212.
- Dobretsov, S. and Qian, P-Y. (2002). Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro- and macrofouling. *Biofouling*. 18: 217 – 228.
- Dobretsov, S. and Qian, P.Y. (2004). The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 299: 35-50.
- Dobretsov, S., Dahms, H-U. and Qian, P-Y. (2006). Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*. 22: 43–54.

- Dobretsov, S, Teplitski, M. and Paul, V. (2009). Mini-review: *quorum sensing* in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 25: 413–427.
- Dworjanyn, S.A., De Nys, R. and Steinberg, P.D. (2006). Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series*. 318: 153-163.
- Ebner, P., Reichert, S., Luqman, A., Krismer, B., Popella, P., and Götz, F. (2018). Lantibiotic production is a burden for the producing staphylococci. *Scientific reports*. 8(1): 7471.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C. and Kjelleberg, S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology*. 2: 343-347.
- Egan, S., James, S., Holmström, C. and Kjelleberg, S. (2001). Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 67–73.
- Eguía, E. (2000). Patentes antiincrustantes de base vinílica y de clorocaucho aplicadas sobre estructuras artificiales en la bahía Santander. *Estudios e Investigaciones Marinas*. 1(1): 5-12.
- Eguía, E., Trueba, A., Río, R. and Girón, M. (2006). Recent studies on antifouling systems to artificial structure in marine ecosystems. *Journal of Maritime Research*. 3 (1): 73-89.
- Estrada, A. C., Gutiérrez, L. A. y Montoya, O. I. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 58(1): 2601-2609.
- Fabregas, J., Muñoz, A., Otero, A., Barja, J. L. and Roruaris, M. (1991). A preliminary study on anti-microbial activities of some bacteria isolated from the marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57: 1377-1382.
- Fales, D. (2014). The light-receptive organs of certain barnacles. *Biological Bulletin*. 54(6): 534-547.

- Farooq Biabani, M.A., Baake, M., Lovisetto, B., Laatsch, H., Helmke, E. and Weyland, H. (1998). Marine bacteria XI: anthranilamides—new antimicroalgal active substance from a marine *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*. 51: 333–340.
- Fenical, W. (1982). Natural Products Chemistry in the Marine Environment. *Science*. 215: 923-928.
- Fernández-Calienes A, Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariago, I., Acuña, D., Scull, R. y Gutiérrez, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 61(3): 254-258.
- Finney, D. (1952). Probit Analysis (2nd Ed). *Journal of the Institute of Actuaries*. 78(3): 388-390.
- Fredrickson, A.G. and Stephanopoulus, G. (1981). Microbial competition. *Science*. 213: 272-278.
- Fusetani, N. (1997). Marine natural products influencing larval settlement and metamorphosis of benthic invertebrates. *Current Organic Chemistry*. 1: 127-152.
- Fusetani, N. and Clare, A.S. (2006). Antifouling Compounds. Ed. Werner E.G. Müller Springer. Germany.
- García, I., Martínez, J., Aneiros, A., Llanio, M., Acosta, K., Díaz, M., Concepción, A., Llorente, S., Pérez, M. y Morales, A. (1994). Organismos marinos de la plataforma cubana como fuente de nuevas sustancias bioactivas. *III Congreso de Ciencias del Mar*. Ciudad de la Habana, Cuba. pp. 200.
- Gesheva, V., Ivanova, V., and Gesheva, R. (2005). Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological research*, 160 (3), 243-248.
- Gorshkova, N., Gorshkova R., Ivanova E., Nazarenko E., and Zubkov V. (2001). Diversity in the monosaccharide composition of antigenic polysaccharides from

- proteobacteria *Pseudoalteromonas* and *Marinomonas* genera. *Mikrobiologia*. 70: 651–655.
- Guégan, C., Garderes, J., Le Pennec, G., Gaillard, F., Fay, F., Linossier, I., Herry, J., Bellon, M. and Réhel, K. V. (2014). Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 114: 193-200.
- Gutiérrez-Almada, K. (2018). Bacterias asociadas a sistemas hidrotermales someros marinos en Baja California Sur con capacidad para producen compuestos inhibidores de biopelículas. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, Posgrado en Ciencias Marinas. 99 p.
- Hadfield, M. G. (1998). The D P Wilson Lecture. Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future. *Biofouling*. 12:9–29.
- Hadfield, M. and Paul, V. (2001). Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Marine Chemical Ecology*. 13: 431-461.
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., and Fliss, I. (2013). Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70: 2947–2967.
- Hanaoka, S., Ishida, K., Tanaka, S., Sakamoto, S., Okuda, K., Sanoh, S., Ohta, S. and Kotake, Y. (2018). Tributyltin induces epigenetic changes and decreases the expression of nuclear respiratory factor-1. *Metallomics*, 10(2): 337-345.
- Harada, A., Sakata, K. and Ina, K. (1984). A new screening method for antifouling substances using the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Agricultural and Biological Chemistry*. 43: 641-644.
- Hayashi, Y. and Miki, W. (1996). A new developed bioassay for antifouling substances using the blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*. *Journal of Marine Biotechnology*. 4: 127-130.

- Heidarian, S., Mohammadipanah, F., Maghsoudlou, A., Dashti, Y., and Challis, G. (2019). Anti-microfouling activity of *Glycomyces sediminimaris* UTMC 2460 on dominant fouling bacteria of Iran marine habitats. *Frontiers in microbiology*. 9; 3148.
- Hellio, C., Bourgougnon, N., and Gal, Y. L. (2000). Phenoloxidase (EC 1.14. 18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling*, 16(2-4): 235-244.
- Hellio, C., Marechal, J., Véron, B., Bremer, G., Clare, A. and Le Gal, Y. (2004). Seasonal variation of Antifouling Activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Marine Biotechnology*. 6: 67-82.
- Hellio, C., Tsoukatou, M., Maréchal, J., Aldred, N., Beaupoil, C., Clare, A., Vagias, C. and Roussis, V. (2005). Inhibitory effects of Mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Biotechnology*. 7: 297-305.
- Hellio, C. Trepos, R., Aguila-Ramírez and Hernández-Guerrero, C. (2015). Protocol for assessing antifouling activities of macroalgal extract. *Natural Products from Marine Algae Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1308: 421-435.
- Henrikson, A. A. and Pawlik, J. R. (1995). A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 194: 157-165.
- Hincapié-Cárdenas, C. (2007). Macrobiofouling on open-ocean submerged aquaculture cages in Puerto Rico. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Marine Sciences, University of Puerto Rico Mayagüez Campus. Mayagüez, Puerto Rico.
- Hirota, H., Okino, T., Yoshimura, E. and Fusetani, N. (1998). Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus *Axinyssa* and the nudibranch *Phyllidia pustulosa*. *Tetrahedron*. 54: 13791-13980.

- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. and Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology*. 41: 47–58.
- Hu, J., Schetz, J., Kelly, M., Peng, J., Ang, K., Flotow, H., Leong, C., Bee, S., Buss, A., Wilkins, S. and Hamann, M. (2002). New Antiinfective and Human 5-HT₂ Receptor Binding Natural and Semisynthetic Compounds from the Jamaican Sponge *Smenospongia aurea*. *Journal of Natural Products*. 65: 476-480.
- Huggett M., Crocetti G., Kjelleberg S. and Steinberg P. (2008). Recruitment of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field. *Aquatic Microbial Ecology*. 53: 161–171.
- Hunt, B., and Vincent, A. C. (2006). Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 35(2): 57-65
- Hussain, S., Hess., K. Gearhart, J., Geiss, K. and Schlager, J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*. 19(7): 975-983.
- International Maritime Organization (IMO). (2002). *Antifouling systems*. London. 31p.
- Ina, K., Takasawa, R., Yagi, A., Yamashita, N., Etoh, H. and Sakata, K. (1989). An improved assay method for antifouling substances using the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 53: 3319-3321.
- Iyapparaj, P., Ramasubburayan, R., Raman, T., Das, N., Kumar, P. and Palavesam, A. (2012). Evidence for the antifouling potentials of marine macroalgae *Sargassum wightii*. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 6(2): 153 p.
- Iyapparaj, P., Revathi, P., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Anantharaman, P., Immanuel, G., and Palavesam, A. (2013). Antifouling activity of the methanolic extract of *Syringodium isoetifolium*, and its toxicity relative to tributyltin on the ovarian development of brown mussel *Perna indica*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 89: 231-238.

- Jian-Wen, Q., Vengatesen, T., Sam, C. and Qian, P. (2005). Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus Amphitrite*. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 688-693.
- Jones, B. and Bolam, T. (2007). Copper speciation survey from UK marinas, harbours and estuaries. *Marine Pollution Bulletin*. 54: 1127-1138.
- Jung, S. M., Bae, J. S., Kang, S. G., Son, J. S., Jeon, J. H., Lee, H. J., Jeon, J.Y, Sidharthan, S.H. Ryu, S.H. and Shin, H. W. (2017). Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine pollution bulletin*. 124(2): 811-818.
- Karlsson, J., Ytreberg, E., and Eklund, B. (2010). Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. *Environmental pollution*. 158 (3): 681-687.
- Khattab, A. I., Babiker, E. H., and Saeed, H. A. (2016). Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Current Pharmaceutical Journal*. 5(3): 27-32.
- Kim, H. R., Kim, M. J., Lee, S. Y., Oh, S. M., and Chung, K. H. (2011). Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 726(2): 129-135.
- Kim, M., Park, J., Um, H., Lee, K., Kim, J. and Min, J. (2011). The antifouling potentiality of galactosamine characterized from *Vibrio vulnificus* exopolysaccharide. *Biofouling*. 27: 851–857.
- Kirchman, D., Graham, D., Reish, D. and Mitchell, R. (1982). Lectins may mediate in the settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis*. Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *Marine Biology Letters*. 3: 201–222.
- Kitajima, F., Satuito, C., Hirota, H., Katsuyama, I. and Fusetani, N. (1995). A new screening method for antifouling substances against the young mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*. *Fisheries Science (Tokyo)*. 61: 578-583.

- Knight, V., Sanglier, J., DiTullio, D., Braccili, S., Bonner, P., Waters, A., Hughes, D. and Zhang, L. (2003). Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 446–458.
- Kohler, K. E. and Gill, S. M. (2006). Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. *Computers and Geosciences*. 32 (9): 1259-1269.
- Koutsaftis, A. and Aoyama, I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*. 387 (1-3): 166-174.
- Lane, D. J. (1991). 16s/23s rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 125-175.
- Lanza, V., Crescente, O. and Henríquez, W. (2006). Aislamiento y actividad antibacteriana de un terpeno del esponja marina *Aplysina fistularis*. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*. 45(2): 93-99.
- LeBlanc, A., Landry, T. and Miron, G. (2002). Fouling organisms in a mussel cultivation bay: their effect on nutrient uptake and release. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*. 2431: 1-16.
- Lee, Y. K., Kwon, K.-K., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H., and Lee, H. K. (2003). Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *Journal of Microbiology*. 41: 183–188.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E. and Barja, J.L. (1985). Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. *Microbial Ecology*. 11: 149-163.
- Lewin, J.C. (1955). Silicon metabolism in diatoms. III. Respiration and silicon uptake *Navicula pelliculosa*. *The Journal of General Physiology*. 39: 1–10.
- Lewis, J.A. (1998). Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *The Mater Forum*. 22: 41–61.

- Li, J. and Chase, H. (2010). Development of adsorptive (non-ionic) macrosporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Natural Product Reports*. 27: 1493-1510.
- Loayza, R. (2011). Problemática del biofouling en el cultivo de *Argopecten purpuratus* en el Perú. *Revista AquaTIC*. 35: 9-19.
- Maki, J. (2002). Biofouling in the marine environment. In: Bitton H, editor. Encyclopedia of environmental microbiology. New York: Wiley & Sons. pp 610–619.
- Marechal, J., Culioli, G., Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Callow, M., Clare, A. and Ortalo-Magné, A. (2004). Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcata bifurcate* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 313: 47– 62.
- Martínez-Díaz, Y. (2010). Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad *antifouling* de compuestos de origen natural. *Tesis de Maestría en Microbiología*. 103 pp.
- Martínez, M., Ocampo, D., Galvis, J. y Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16 (4): 313-323.
- Martínez-Matamoros, D. (2012). Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de bacterias del Phylum firmicutes aisladas del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* recolectado en la isla Providencia. Tesis de Maestría en Ciencias-Química. Universidad de Colombia. 145 p.
- Marszalek, D. S., Gerchakov, S. M., and Udey, L. R. (1979). Influence of substrate composition on marine microfouling. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(5): 987-995.

- Maskey, R.P., Asolkar, R.N., Kapaun, E., Dobler, I.W. and Laatsch, H. (2002). Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. *The Journal of Antibiotics*. 55: 643–649.
- Maximilien, R., de Nys, R., Holmström, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K., Kjelleberg, S. and Steinberg, P. (1998). Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*. 15; 233-246.
- Méndez, C. (2007). Asentamiento de bioincrustantes en actividades de acuicultura. *Ciencia Ahora*. 20 (10): 41-45.
- Meyer, B.N. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Nascimento, J. S., Ceotto, H., Nascimento, S. B., Giambiagi-Demarval, M., Santos, K. R., and Bastos, M. C. (2006). Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 215–221.
- Napierska, D., Thomassen, L. C., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J. and Hoet, P. H. (2009). Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*. 5(7): 846-853.
- Narayana, K. J. P. and Vijayalakshmi, M. (2008). Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Pharmacological Reserach*, 2(1): 4-7.
- Navarro, J. (2001). Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos. In A. Maeda-Martínez (ed.), Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura, Cap. 3: 61-76. Edit. Limusa, México, D.F., México.
- Newmark, F., Santos-Acevedo, M., Chaves, A., Mora, J., Arias, J. y Zea, S. (2005). Manual de métodos de bioactividad. Informe Núm. 2105-09-12456. INVEMAR. Santa Marta, Colombia.

- Netz, D. J., Sahi, H. G., Marcelino, R., dos Santos, Nascimento, J., de Oliveira, S. S., Soares, M., do Carmo de Freire Bastos, M. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology*. 311: 939–949.
- Netz, D. J., Pohl, R., Beck-Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos Mdo, C., and Sahl, H. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53 a new atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology*. 319: 745–756.
- Nobel, A. (17 de septiembre del 2015). *Coatings Technology: What is fouling?* Obtenido de International Marine Coatings: <http://www.international-marine.com/PaintGuides/WhatIsFouling.pdf>.
- Nylund, G. M. and Pavia, H. (2003). Inhibitory effects of red algal extracts on larval settlement of the barnacle *Balanus improvisus*. *Marine Biology*. 143: 875-882.
- Nylund, G. M., Gribben, P. E., de Nys, R., Steinberg, P. D. and Pavia, H. (2007). Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Marine Ecology Progress Series*. 329: 73-84.
- Ortega-Morales, B., Chan-Bacab, M., Miranda-Tello, Soliev E., Fardeau, M., Carrero, J. and Stein, T. (2008). Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35: 9-15.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development, *Annual Review of Microbiology*. 54: 49-79.
- Pakseresht, S. and Waleed, A. (2014). Production and qualitative analysis of secondary metabolites of *Staphylococcus* bacteria having antibiotic activity. *Helix*. 2: 527-530.
- Patel, P., Callow, M.E., Joint, I. and Callow, J.A. (2003). Specificity in larval settlement modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environmental Microbiology*. 5: 338–349.

- Paul, J. and Jeffrey, W. (1985). Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(2): 431-437.
- Pawlik J. R. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrate. *Oceanography Marine Biology Annual Review*. 30: 273-335.
- Prakash, S., Ramasubburayan, R., Iyapparaj, P., Arthi, A. P. R., Ahila, N. K., Ramkumar, V. S., Ramkumar, V., Immanuel, G. and Palavesam, A. (2015). Environmentally benign antifouling potentials of triterpene-glycosides from *Streptomyces fradiae*: a mangrove isolate. *RSC Advances*. 5: 29524–29534.
- Puyana, M. (2001). Chemical ecology of Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. *PhD thesis, University of California at San Diego*. 214 p.
- Qian, P-Y., Thiyagarajan, V., Lau, S. and Cheung, S. (2003). Bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquatic Microbial Ecology*. 33: 225–237.
- Qian, P. Y., Lau, S. C., Dahms, H. U., Dobretsov, S. and Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*. 9: 399-410.
- Railkin, A. (2004). Marine biofouling: colonization process and defenses. ISBN 0-8493-1419-4. CRC Press.
- Ralston, E. and Swain, G. (2009). Bioinspiration-The solution for biofouling control?. *Bioinspiration & Biomimetics*. 4:
- Ramasubburayan, R., Prakash, S., Iyapparaj, P., Sumathi, S., Titus, S., Immanuel, G. and Palavesam, A. (2015). Isolation, Screening and Evaluation of antifouling activity of mangrove associates bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* RG. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 1-10.
- Ramasubburayan, R., Prakash, S., Iyapparaj, P., Sumathi, S., Titus, S., Immanuel, G. and Palavesam, A. (2017). Isolation, screening and evaluation of antifouling

- activity of mangrove associated bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* RG. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(3): 1015-1024.
- Ramírez-Granillo, A., Canales, M. G. M., Espíndola, M. E. S., Rivera, M. A. M., De Lucio, V. M. B., and Tovar, A. V. R. (2015). Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiology*. 15(1): 33.
- Ranke, J. and Jastorff, B. (2000). Multidimensional Risk Analysis of Antifouling Biocides. 7(2): 105-114.
- Rico-Virgen, E.G. (2017). Evaluación de la actividad anti-incrustante de extractos bacterianos marinos para el control de la colonización epibiotica. UDG-Centro Universitario de la Costa Sur. Tesis de Licenciatura. Atlán de Navarro, Jalisco. 51pp.
- Rittschof, D., Clare, A. S., Gerhart, D. J., Mary, S. A., and Bonaventura, J. (1992). Barnacle *in vitro* assays for biologically active substances: toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin. *Biofouling*. 6(2): 115-122.
- Rittschof, D. (2000). Natural Product antifoulants: One perspective on the challenges related to coatings development. *Biofouling*. 15: 119-127.
- Rittschof, D. (2001). Natural product antifoulants and coatings development. In: McClintock, J. y Baker B. (Eds.) *Marine chemical ecology* pp. 543-566. New York. CRC Press.
- Ross, K., Thorpe, J. and Rand, A. (2004). Biological control of fouling in suspended scallop cultivation. *Aquaculture*. 229 (1-4): 99-116.
- Sakata, T., Yoshikawa, T. and Nishitarumizu, S. (2011). Algicidal activity and identification of an algicidal substance produced by marine *Pseudomonas* sp. C55a-2. *Fisheries Science*. 77: 397-402.
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., and Briand, J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental Microbiology Reports*. 15: 2879–2893.

- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. Cold, Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 2344 p.
- Sánchez-Lozano, I., Hernández-Guerrero, C. J., Muñoz-Ochoa, M., and Hellio, C. (2019). Biomimetic Approaches for the Development of New Antifouling Solutions: Study of Incorporation of Macroalgae and Sponge Extracts for the Development of New Environmentally-Friendly Coatings. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(19): 4863.
- Sánchez-Rodríguez, D. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de bacterias marinas. UDG-Centro Universitario de la Costa Sur. Tesis de Licenciatura en Biología Marina. Autlán de Navarro, Jalisco. 64pp.
- Sánchez, J. y Torres-Alvarado, M. (2005). Estructura y aspectos biotecnológicos de las comunidades acuáticas microbianas: biopelículas y tapetes microbianos. *ContactoS*. 58: 63-71.
- Santos-Acevedo, M., Puentes, C., Carreño, K., Gomez, J., Stupak, M., Garcia, M., Perez, M. and Blustein, G. (2013). Antifouling paints based on marine natural products from Colombian Caribbean. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 83: 97-104.
- Sastry, V. and Rao, G. (1995). Bioctyl phthalate and antibacterial compound from the marine brown alga-*Sargassum wightii*. *Journal of Applied Phycology*. 7: 185-186.
- Satheesh, S., Soniamby, A., Sunjaiy, C. and Punitha, S. (2012). Antifouling activities of marine bacteria associated with sponge (*Sigmadocia* sp.). *Journal of Ocean University of China*. 11: 354-360.
- Sauer, K. and Baptista, N. (2007). Análise de propriedade antiincrustante em cinco espécies de macroalgas marinhas da Praia do Poá-Penha, S.C: *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brazil*, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu-MG. Brazil. 2p.
- Secor, P., Jennings, L., James, G., Kirker, K., deLancey, E., McInnerney, K., Gerlach, R., Livinghouse, T., Hilmer, J., Bothner, B., Fleckman, P., Olerud, J. and

- Stewart, P. (2012). Phevalin (aureusimine B) Production by *Staphylococcus aureus* Biofilm and Impacts on Human Keratinocyte Gene Expression. *PLoS ONE*. 7(7): e40973.
- Sharp, G., MacNair, N., Campbell, E., Butters, A., Ramsay, A. and Semple, R. (2006). Fouling of mussel (*Mytilus edulis*) Collectors by Algal Mats, Dynamics, Impacts and Symptomatic Treatment in P.E.I. Canada. *Science Asia 32 Supplement*. 1: 87-97.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*. 10(1): 15.
- Slattery, M. (1997). Chemical cues in marine invertebrate larval settlement. In: Nagabushanam R, Thompson J F (eds) *Marine Woodboring and Fouling Organisms of the Indian Ocean: a Review*. Oxford and IBH Publishing Company, New Delhi. pp 135.
- Sneddon, R. and Tremblay, L. (2011). The New Zealand king salmon company limited: assessment of environmental effects-copper and zinc. *The New Zealand King Salmon Company Ltd., Cawthron Report*. 1984: 53 pp.
- Soliev, A., Hosokawa, K. and Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from Marine Bacteria: Applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 18 p.
- Soliman, Y., Mohamed, A. and NaserGomaa, M. (2014). Antifouling activity of crude extracts isolated from two red sea puffer fishes. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 40: 1-7.
- Steinberg, P.D., de Nys, R. and Kjelleberg, S. (2001). Chemical mediation of surface colonization. In: McClintock JB, Baker JB, editors. *Marine chemical ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 355 – 387.
- Steinberg, P.D., de Nys, R.D. and Kjelleberg, S. (2002). Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology*. 28: 1935–1951.

- Stupak, M. E., García, M. T., and Pérez, M. C. (2003). Non-toxic alternative compounds for marine antifouling paints. *International biodeterioration & biodegradation*. 52(1): 49-52.
- Sumner, L., Mendes, P. and Dixon, R. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 62(6): 817-836.
- Sun, J., Zhang, S., Chen, J. and Han, B. (2012). Metabolic profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under aerobic and anaerobic conditions with ¹H NMR-based nontargeted analysis. *Canadian Journal of Microbiology*. 58: 709-718.
- Thomas, K., McHugh, M. and Waldock, M. (2002). Antifouling paint booster biocides in UK coastal antifouling biocides in water and sediments from California marinas waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Science of the Total Environment*. 293: 117-127.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. And Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98-106.
- Tsoukatou, M., Maréchal, J., Hellio, C., Novakovic, I., Tufegdžic, S., Sladic, D., Gasic, M., Clare, A., Vagias, C. and Roussis, V. (2007). Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. *Molecules*. 12: 1022-1034.
- Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. and Fusetani, N. (1999). Lumichrome: a larval metamorphosis-inducing substance in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *European Journal of Biochemistry*. 264: 785 – 789.
- UICN. (2007). Guía para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Mediterránea. Interacciones entre la Acuicultura y el Medio Ambiente. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España. 114 p.
- Uribe, E. y Blanco, J. (2001). Capacidad de los sistemas acuáticos para el sostenimiento del cultivo de pectínidos: el caso de *Argopecten purpuratus* en

- la Bahía Tongoy, Chile. In A. Maeda-Martínez (ed.), Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura, Cap. 12: 233-248. Edit. Limusa, México, D.F., México.
- Urrutia, H., Sossa, K., Becerra, J., Perez, C., Ruiz, N., Vidal, J. y Nocker, A. (2016). Biopintura antifouling que comprende extractos de macroalgas atractantes de bacterias epibiontes y extractos activos de bacterias con características antifouling. *Publicada en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes*. 28 pp.
- Vanelle, L. and Le Gai, Y. (1995). Marine antifoulants from North Atlantic algae and invertebrates. *Journal of Marine Biotechnology*. 3: 161-163.
- Vijayakumari, S. J., Sasidharannair, N. K., Nambisan, B., and Mohandas, C. (2013). Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. *Iranian Journal of Microbiology*. 5(2): 136.
- Viju, N., Satheesh, S. and Punitha, S. (2016). Antibiofilm and antifouling activities of extracellular polymeric substances isolated from the bacteria associated with marine gastropod *Turbo* sp. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 45: 11-19.
- Vandecandelaere, I., Depuydt, P., Nelis, H. and Coenye, T. (2014). Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathogen and Disease*. 70: 321-331.
- Vetere, V., Pérez, M., García, M., Deyá, M., Stupak, M. and del Amo, B. (1999). A non-toxic antifouling compound for marine paints. *Surface Coatings International*. 82(12): 586-589.
- Wahl M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some Basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*. 58: 175-189.
- Waite, J. and Tanzer, M. (1980). The bioadhesive of *Mytilus edulis* byssus: a protein containing L-dopa. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 96: 1554-1561.

- Waite, J. (1983). Evidence for repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine and hydroxyproline containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Biological Chemistry*. 258: 2911-2915.
- Wetzel, R. G. (1975). *Limnology*. W. B. Saunders. New York.
- Wieczorek, S.K. and Todd, C.D. (1998). Inhibition and facilitation of the settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling*. 12: 81–93.
- Wyatt, M., Wang, W., Roux, C., Beasley, F., Heinrichs, D., Dunman, P. and Margarvey, N. (2011). *Staphylococcus aureus* Nonribosomal Peptide Secondary Metabolites Regulate Virulence. *Science*. 329(5989): 294-296.
- Yang, L., Lee, O., Jin, T., Li, X. and Qian, P. (2006). Antifouling properties of 10 β -formamidokalihinol-A and kalihinol A isolated from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Biofouling*. 22: 23-32.
- Yebra, D., Kiil, S. and Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic coatings*. 50: 75-104.
- Yebra, D., Kiil, S., Weinell, C. and Dam-Johansen, K. (2006). Presence and effects of marine microbial biofilms on biocides-based antifouling paints. *Biofouling*. 22(1): 22-41.
- Zapata, M., Silva, F., Luza, Y., Wilkens, M. and Riquelme, C. (2007). The inhibitory effect of biofilms produced by wild bacterial isolates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputialis*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10: 11 p.
- Zhang, J., Jiang, H., Jiang, J. and Huang, G. (2016). Isolation and identification of *Staphylococcus epidermidis*. S14 screening extracellular antimicrobial metabolites. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 12(1): 56-63.
- Zimmer, R. K. and Butman, C. A. (2000). Chemical signalling processes in the marine environment. *The Biological Bulletin*. 198: 168–187.

ANEXO I

Bacterias del cepario del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del IPN-CICIMAR identificadas como formadoras de biopelículas.

Clave	Especie	Numero de acceso <i>NCBI</i>	% Identidad
96	<i>Vibrio harveyi</i> N2A	KP635244.1	97
110	<i>Vibrio sinaloensis</i> FD O1-1	JN871701.1	96
116	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i> PEL69C	KC871626.1	94

ANEXO II

Bacterias proporcionadas por personal del laboratorio de fisiología vegetal (UBO).

Género	Especie	Código en la colección	Medio de cultivo
<i>Vibrio</i>	<i>V. aestuarianus</i>	ATCC 35048	Medio marino bacterial: caldo marino estéril o agua de mar artificial con 0.5% de peptona
	<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	
	<i>V. carchariae</i>	ATCC 35084	
	<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	
	<i>V. proteolyticus</i>	ATCC 15338	

ANEXO III

Microalgas proporcionadas por personal del laboratorio de fisiología vegetal (UBO).

Género	Especie	Código en la colección	Medio de cultivo
<i>Chlorella</i>	<i>C. vulgaris</i>	GREENSEA	DAUTA O BG11
<i>Stichococcus</i>	<i>S. bacillaris</i>	GREENSEA	DAUTA
<i>Halamphora</i>	<i>H. coffeaeformis</i>	AC 713	
<i>Cylindrotheca</i>	<i>C. closterium</i>	AC 170	F/2
<i>Exanthemachrysis</i>	<i>E. gayraliae</i>	AC 15	

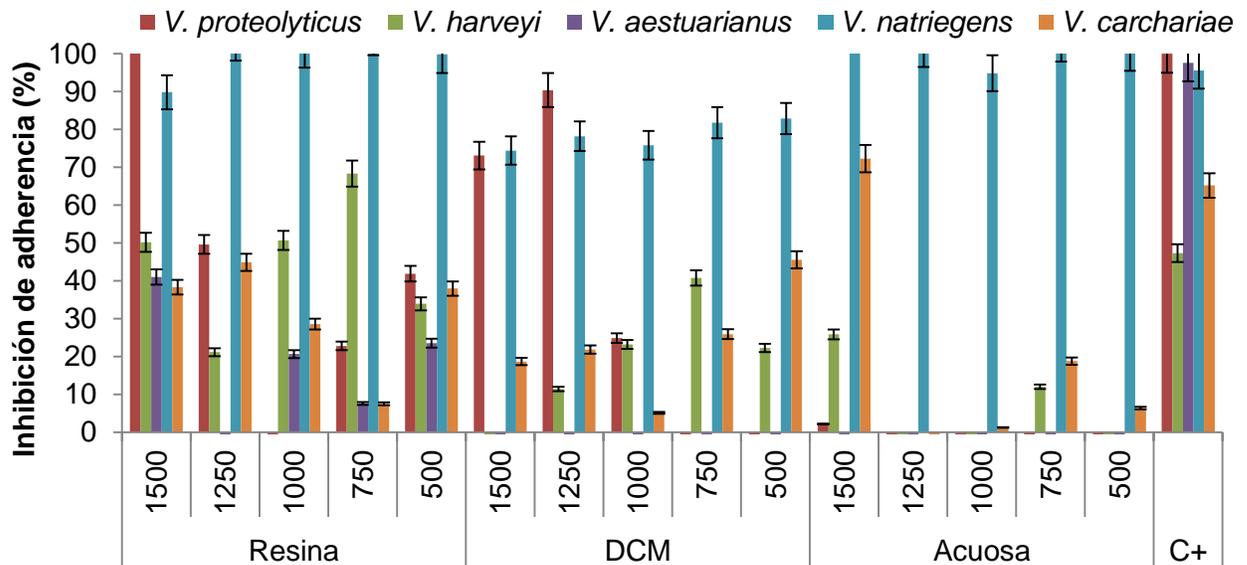
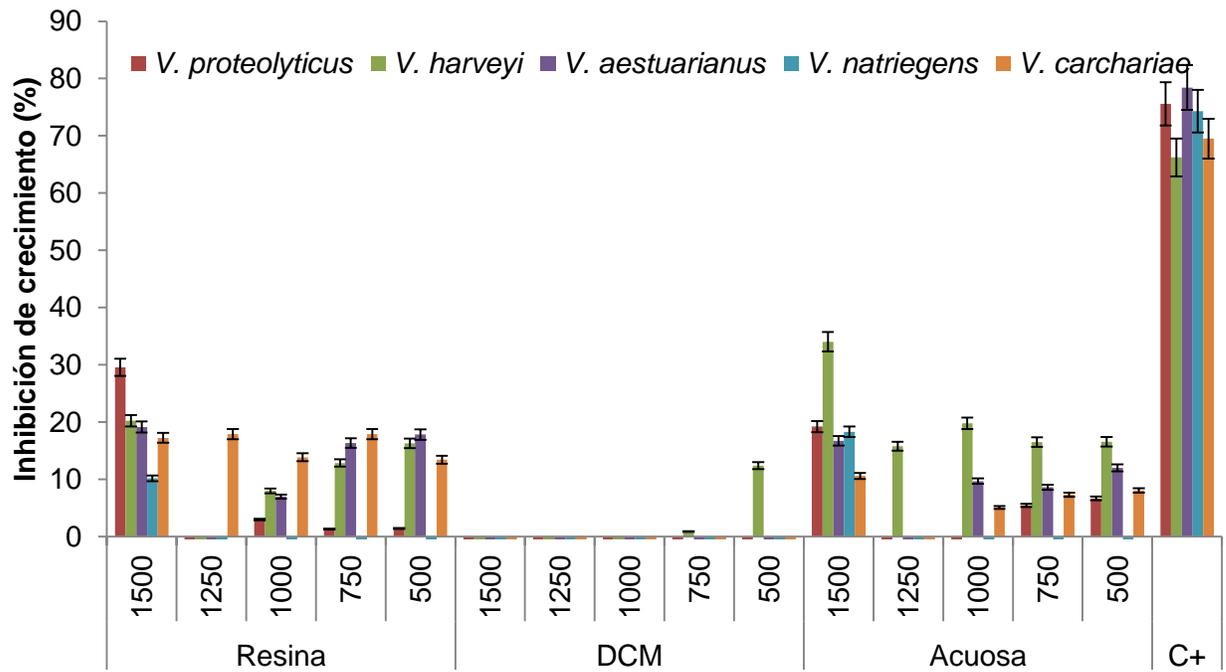
ANEXO IV

Evaluación del porcentaje de inhibición de biopelículas por bacteria adherente.

Medio	Extracto	Bacterias formadoras de biopelículas									
		1D	10D	12M	11M	4M	7A	9A	116	110	96
CM	BuOH	80	94	91	82	52	75	53	84	47	99
	Resina	75	94	92	75	60	57	34	82	28	88
	CHCl ₃	74	92	92	81	77	54	54	76	36	83
	CH ₂ Cl ₂	77	95	90	83	73	54	58	85	50	93
	Acuosa	85	95	89	83	64	74	35	84	40	91
CC	BuOH	86	94	93	83	77	75	46	79	21	96
	Resina	83	95	92	82	80	80	62	77	45	96
	CHCl ₃	81	95	93	80	65	75	40	78	54	94
	CH ₂ Cl ₂	85	95	92	87	72	81	57	80	52	95
	Acuosa	86	95	93	80	80	77	53	83	37	97
TSB	BuOH	84	96	92	79	65	75	61	77	49	98
	Resina	77	90	90	86	66	79	37	82	56	98
	CHCl ₃	85	95	89	85	72	79	63	83	41	82
	CH ₂ Cl ₂	83	96	93	84	80	75	58	83	52	84
	Acuosa	82	95	92	84	73	77	67	81	56	94
C+		82	92	91	85	81	83	54	84	65	87

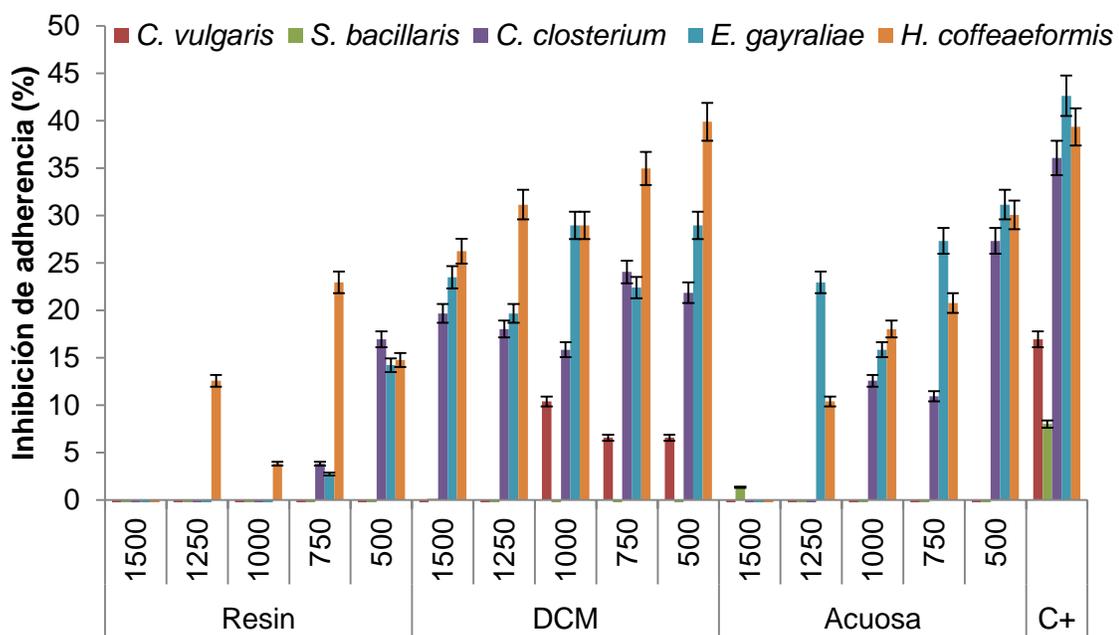
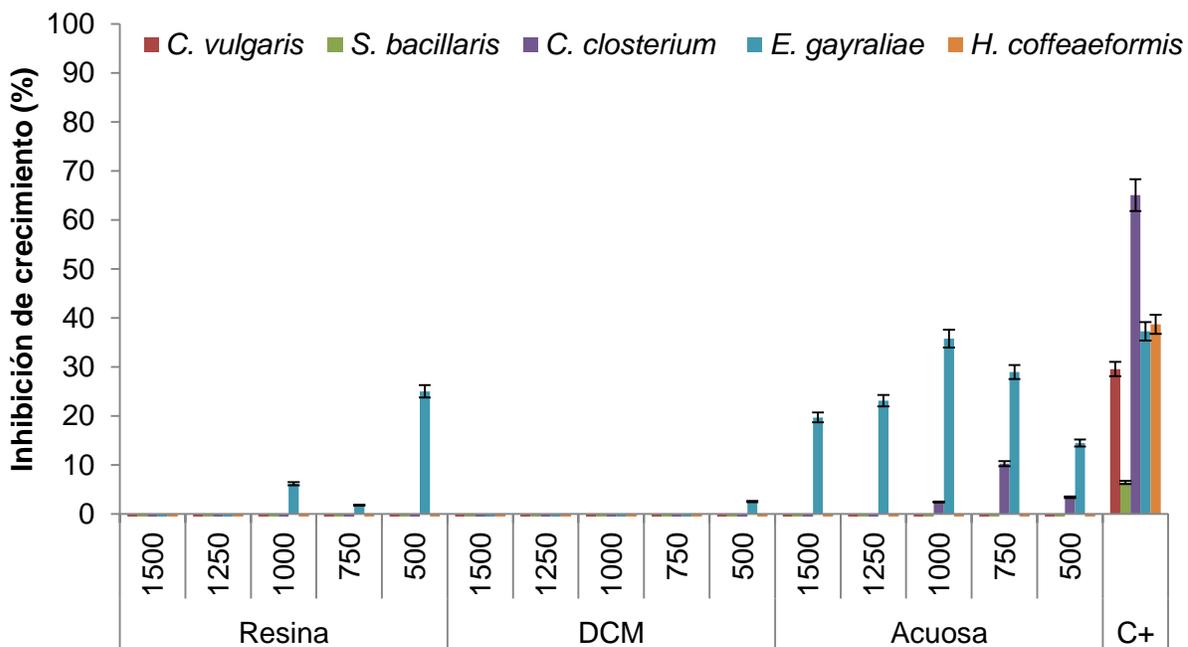
ANEXO V

Evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento y adherencia de bacterias a diferentes concentraciones.



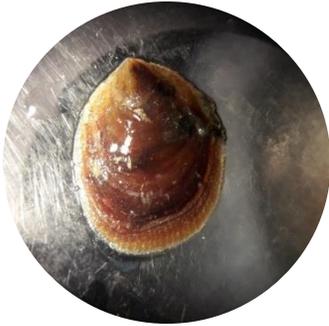
ANEXO VI

Evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento y adherencia de microalgas a diferentes concentraciones.

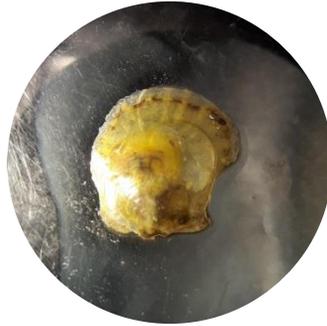


ANEXO VII

Organismos adheridos a las placas con recubrimiento antiincrustante.



Moluscos



Balanos



Poliquetos



N/I



Briozoarios



Ascidias



Algas