

NOTA CIENTÍFICA

Inhibición de la cepa patogénica de *Vibrio cholerae* (*tor1*) por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino

Inhibition of pathogenic strain *Vibrio cholerae* (*tor1*) by *Bacillus pumilus* marine environment isolated

Yanett Leyton¹, Katherine Pohl¹ y Carlos Riquelme¹

¹Laboratorio Mesocosmos Marino, Centro de Bioinnovación de Antofagasta (CBIA), Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Angamos 601, Antofagasta, Chile. yanett.leyton@uantof.cl

Abstract.- This work evaluated the inhibitory activity of 53 marine bacteria against *Vibrio cholerae*, a recognized human pathogen. Strains that showed activity were identified by sequencing the 16S rRNA gene and tested for optimal growth at different temperatures. The pathogen was inhibited by 19 strains, which were identified as *Bacillus pumilus*, optimal growth was at 30 and 37°C. This is the first study that reveals to *B. pumilus* as a growth inhibitor of the pathogenic strain *V. cholerae*, which could be evaluated in further studies for potential use as a control of this pathogen.

Key words: *Bacillus*, *Vibrio cholerae*, pathogen, inhibition

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es un agente etiológico que se encuentra en aguas salobres o marinas, cuyas variaciones climáticas locales de temperatura o aumento en la población del plancton pueden favorecer su proliferación (Ghose 2011). Estas bacterias provocan consecuencias clínicas a nivel internacional al consumir productos marinos contaminados por este patógeno, los síntomas que manifiesta el paciente van desde gastroenteritis, infección de la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos (Rowe-Magnus *et al.* 2006). Existen focos importantes en África hace ya 40 años debido al difícil acceso de agua potable y mala cobertura de salud (Mengel 2014). En Haití, luego del terremoto del 2010 se registró la presencia de *V. cholerae*, después de analizar 301 muestras (Liu *et al.* 2014). La patogenicidad de esta bacteria para el ser humano ha generado una intensiva investigación clínica y científica en la formulación de estrategias de tratamientos efectivas para prevenir los brotes de esta enfermedad (Ghose 2011).

Por años se ha usado antibióticos como medida de control contra patógenos, a pesar de su efectividad se ha demostrado que su uso permite la selección de bacterias resistentes a los antibióticos (Palmer & Kishony 2013) las cuales proliferan y posteriormente su descendencia es resistente a tratamientos con antibióticos específicos. Una alternativa al uso de antibióticos es el uso de probióticos que son bacterias que presentan capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas

controlando su proliferación (Pérez-Sánchez *et al.* 2014). La adición de bacterias vivas y en cantidades adecuadas como alimento o suplemento alimenticio generan un beneficio en el equilibrio biológico intestinal del hospedador (Sihag & Sharma 2012).

A bacterias del género *Bacillus* se les ha atribuido actividad antibacteriana (Oguntoyinbo 2007). Estas bacterias se encuentran distribuidas ampliamente en ambientes terrestres y acuáticos (Siefert 2000), incluidos los sedimentos marinos (Miranda *et al.* 2008). Al respecto, Leyton *et al.* (2012) identificaron a una dicetopiperacina que es un péptido extraído de un *Bacillus pumilus* marino con actividad inhibidora contra una bacteria del género *Vibrio* como *V. parahaemolyticus* que es un patógeno causante de enfermedades gastrointestinales en personas. Igualmente, Yuehua *et al.* (2013) han reportado otro péptido aislado de *Bacillus subtilis* quien presentó inhibición contra el patógeno *V. parahaemolyticus*. A la bacteria *Bacillus licheniformis* igualmente se le ha reportado actividad contra *V. parahaemolyticus* (Vinoj *et al.* 2014). En base a la necesidad que existe por controlar las enfermedades en la industria acuícola y a los antecedentes científicos que comprueban la potencialidad del género *Bacillus* como productores de antibióticos, este estudio tuvo como objetivo buscar bacterias marinas del género *Bacillus* inhibitoras del crecimiento del patógeno *Vibrio cholerae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL PATÓGENO Y BACTERIAS ANTAGONISTAS

La bacteria patógena *Vibrio cholerae* (Tor 1) y las 53 cepas bacterianas marinas fueron obtenidas del cepario de colección del Laboratorio Mesocosmos Marino, Centro de Bioinnovación de Antofagasta de la Universidad de Antofagasta. Las bacterias fueron aisladas previamente desde cápsulas de huevo de *Concholepas concholepas*, según lo descrito por Leyton & Riquelme (2010). Las cepas fueron descongeladas y mantenidas en placas con agar de Trypticase de Soya (TSA, Oxoid) suplementadas al 2% con Cloruro de Sodio (NaCl, Oxoid) e incubadas a 20°C.

SELECCIÓN DE BACTERIAS INHIBIDORAS DE PATÓGENOS

Para cada bacteria se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de 'doble capa' Dopazo (Dopazo *et al.* 1988) modificada según Leyton & Riquelme (2010). En una placa de Agar Mueller-Hinton (M-H) se inoculó 10 µl de un cultivo de 18 h de la cepa de interés crecida en caldo de tripticase de soya (TSB-Oxoid), suplementados con 2% de NaCl. El inóculo fue incubado por un período de 48 h a 20°C. Una vez verificado el crecimiento bacteriano la macro colonia fue inactivada por exposición a vapores de cloroformo por un período de 45 min. Posteriormente, se utilizaron medios de agar blando de TSB suplementados con 2% NaCl y 0,5% agar bacteriológico (Oxoid) los cuales fueron inoculados con 100 µl de un cultivo de 18 h de la bacteria patógena *V. cholerae* cultivada en TSB. Luego, el medio se agitó suave y brevemente vertiendo sobre la placa con la macro colonia de la cepa antagonista. Las placas se incubaron a 20°C durante 24 h. Posteriormente, se verificó inhibición o crecimiento de la cepa patógena alrededor de la cepa antagonista. El bioensayo se realizó por triplicado, y el nivel de actividad antibacteriana se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición, considerando como actividad inhibidora diámetros de halo mayores de 5 mm, según Avendaño-Herrera *et al.* (2005).

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Para cada bacteria antagonista se evaluó por triplicado el crecimiento a diferentes temperaturas (12, 16, 20, 30, 37 y 60°C) para lo cual se inoculó 50 µl de un cultivo de 18 h en tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo TSB, que fueron incubados durante 48 h. Tras el tiempo de

incubación se evaluó cualitativamente el crecimiento bacteriano, según la turbidez del cultivo se usó el siguiente criterio: crecimiento suave (+); crecimiento medio: (++) y crecimiento alto (+++).

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

De un cultivo estéril de cada bacteria antagonista fue extraído el fragmento 16S ARNr mediante el Kit Genomic DNA Purification (Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante), y amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Buffer 5x, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, BSA 1X, 1 µM de cada oligonucleótido, y 0,04 U/µl *Taq* ADN polimerasa (Fermentas), usando los siguientes primers universales: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-32)/1542R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). El protocolo de PCR se basó en: Buffer 2 µl, MgCl₂ 1 µl, dmlpr, F, R 0,5 µl para cada uno, *taq* 0,1 µl, H₂O 14,4 µl, ADN 1 µl. La amplificación de los productos se analizó en un termociclador Px2 (Thermo Corporation), las condiciones de PCR fueron 30 min a 35°C, 4 min a 95°C, 30 min 95°C, 30 min 56°C, 1,30 min a 72°C y 1,7 min a 72°C. Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1% cargado con 1 µl de muestra y buffer de carga Blue juice 10x y como marcador 100 bp plus. El producto de PCR fue purificado con el kit de purificación (UltraCleanTM15 DNA, MoBio Laboratories, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó en MacroGen Inc. (Corea). Las secuencias fueron analizadas usando el programa Bio Edit y Blast en GenBank¹. Los alineamientos fueron realizados con Clustal W (Thompson *et al.* 1994) y la secuencia fue comparada con aquellas que se encontraron disponibles en la base de datos GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios científicos comprueban que *V. cholerae* ha presentado resistencia a antibióticos como lo evaluado por Raytekar *et al.* (2014) quienes expusieron la resistencia a antibióticos de 28 cepas de *V. cholerae* O1 aislados desde 544 muestras de pacientes con gastroenteritis aguda de un hospital rural en India. Todos los aislados fueron resistentes a cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ampicilina. Sin embargo la sensibilidad máxima se observó a la norfloxacin, gentamicina y cloranfenicol. Estos autores discuten que se requiere una vigilancia continua para *V. cholerae* en lo que respecta a la aparición de cepas resistentes a antibióticos para investigar las estrategias

¹<www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

de gestión adecuadas. El aumento en la frecuencia de brotes de cólera hace convincente el complementar medidas de control, además de las ya existentes. Al respecto, en África, hoy en día una forma de hacer frente a la problemática del cólera, se basa en la aplicación de una vacuna oral contra el cólera, iniciativa apoyada por African Cholera Surveillance Network (Africhol) (Mengel 2014). Los mecanismos de acción de estos antibacterianos, impiden a los patógenos colonizar el tracto digestivo, o al menos reducir su concentración o capacidad de producir toxinas (Hemaiswarya *et al.* 2013).

Los resultados de esta investigación revelaron que con los análisis de 16S ARNr, se confirmó que la secuencia del gen de todas las cepas bacterianas anti- *V. cholerae* analizadas pertenecen al género *Bacillus*, compartiendo un porcentaje de similitud entre el 99 y 100% con la especie *Bacillus pumilus*. Del total de 53 cepas bacterianas analizadas 19 cepas (36%) inhibieron el crecimiento de *V. cholerae*, los halos de inhibición variaron entre 11 y 40 mm de diámetro (Fig. 1). Las cepas *Bacillus pumilus* con mayor actividad inhibidora fueron C31 (35 mm) y C32 (40 mm). Estos resultados de actividad inhibidora representada por los halos, fueron reproducibles y no se observaron diferencias entre las réplicas. Bacterias del género *Bacillus* marinos como *Bacillus* sp. fueron importantes agentes antibacterianos contra *V. cholerae* (halos de inhibición de 12 mm) cuya actividad fue atribuida a proteínas y ácidos grasos de esta bacteria (Sujith *et al.* 2014). Estos resultados de actividad inhibidora observada contra *V. cholerae* fueron mucho menor al compararlos con los presentes resultados.

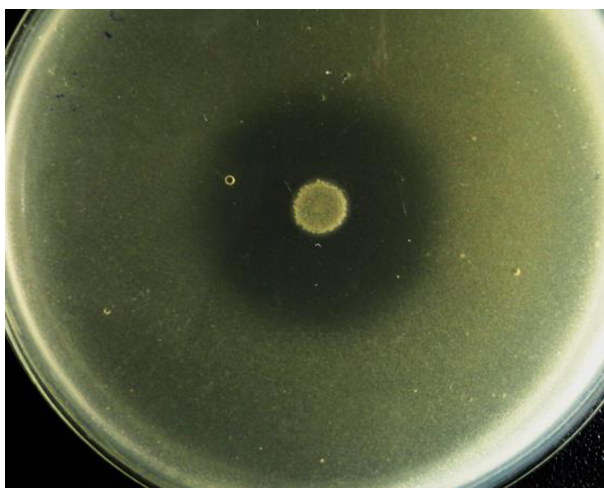


Figura 1. Actividad inhibitoria de *B. pumilus* C42 contra el patógeno *V. cholerae* / *B. pumilus* C42 inhibitory activity against the pathogenic *V. cholerae*

Respecto a *B. pumilus* se ha evidenciado actividad inhibidora contra *Vibrio* (Murni *et al.* 2013). Por ejemplo, se ha reportado que *B. pumilus* inhibió el crecimiento de *V. parahaemolyticus* (Leyton & Riquelme 2010, 2013; Leyton *et al.* 2012) cuya actividad inhibidora fue atribuida al péptido dicetopiperacina aislado desde la bacteria (Leyton *et al.* 2012). Similares resultados fueron revelados por Brack *et al.* (2014) quienes analizaron al menos 13 dicetopiperazinas (DKPS) secretadas por 2 cepas de *B. pumilus* quienes presentaron actividad inhibidora contra la bacteria *Arthrobacter citreus*. Por otro lado, se ha sugerido que el uso de *B. subtilis* en el cultivo de camarones (*Penaeus monodon*) mejora su crecimiento y resistencia a patógenos como Vibrios (Nimrat *et al.* 2013). Los resultados de Ambas *et al.* (2014) demostraron que *B. subtilis* (PM3) y *Bacillus* sp. (PM4) presentaron una fuerte inhibición contra *Vibrio mimicus* y *V. cholerae* no-01. Las bacterias del género *Bacillus* no sólo se han estudiado como antibacterianos, sino que también como probióticos en el área acuícola (Del Duca *et al.* 2013), agrícola (Orberá *et al.* 2014) y clínica (Hanifi *et al.* 2014), así como actualmente se ha reportado la búsqueda en *Bacillus* sp. de metabolitos anticancerígenos (Mishra *et al.* 2014).

La susceptibilidad con la temperatura de las diferentes cepas se clasificó cualitativamente según la densidad del cultivo. Los resultados demostraron que todas las cepas crecieron a las 48 h de cultivo entre los 12 y 37°C, observándose diferentes densidades entre ellas. Y solo las cepas C29; C30; C35; C36 y C51 presentaron crecimiento (+) a los 60°C. El crecimiento óptimo (+++) de todas las cepas bacterianas se observó entre los 30 y 37°C (Tabla 1). Estos resultados coinciden con Ramírez (2000) quien reportó que *Bacillus sphaericus* tiene un crecimiento entre los 20 y 40°C con un máximo crecimiento a los 37°C. Las bacterias del género *Bacillus* son muy importantes industrialmente, ya que, producen metabolitos secundarios como antibióticos (Al-Dohail 2011), bioinsecticidas y probióticos (Cutting 2011). Además sus enzimas son muy eficaces en transformar en unidades más pequeñas una gran variedad de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Otra ventaja de este género es que crecen eficientemente en bajas concentraciones de carbono y fuentes de nitrógeno.

Existen pocos estudios sobre *Bacillus* marinos contra patógenos (Ki *et al.* 2009). Durante la elaboración de este manuscrito no se encontró investigación que indique a *Bacillus* marinos como inhibidores del *V. cholerae*. Por esta razón, los resultados obtenidos en esta investigación

Tabla 1. Bacterias que presentaron actividad inhibidora contra el patógeno *V. cholerae* y su crecimiento a diferentes temperaturas
/ Bacteria that showed inhibitory activity against the pathogen *V. cholerae* and its growth at different temperatures

Cepas	Pariente cercano Genbank y número de acceso	% similitud pariente cercano	Nº pares de bases	Diámetro halo inhibición (mm)	T 12°C	T 16°C	T 20°C	T 30°C	T 37°C	T 60°C
C32	<i>B. pumilus</i> (NR112637)	99	1335	40	+	++	++	+++	+++	-
C31	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1476	35	+	++	++	+++	+++	-
C42	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1369	31	+	++	++	+++	+++	-
C33	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1400	29	+	++	++	+++	+++	-
C28	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1389	27	+	++	++	+++	+++	-
C41	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1388	25	+	++	++	+++	+++	-
C43	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1397	25	+	++	++	+++	+++	-
C46	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1417	25	+	++	++	+++	+++	-
C52	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1443	25	+	++	++	+++	+++	-
C38	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1373	24	+	++	++	+++	+++	-
C48	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1424	24	+	++	++	+++	+++	-
C23	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	99	1432	23	+	++	++	+++	+++	-
C29	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1380	23	+	++	++	+++	+++	+
C36	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1400	22	+	++	++	+++	+++	+
C30	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1438	19	+	++	++	+++	+++	+
C51	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1323	19	+	++	++	+++	+++	+
C44	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	95	1443	17	+	++	++	+++	+++	-
C50	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1400	16	+	++	++	+++	+++	-
C35	<i>B. pumilus</i> (NR074977)	100	1412	11	+	++	++	+++	+++	+

representan una contribución científica a futuras investigaciones de antibióticos y quimioterapéuticos obtenidos desde bacterias. En estudios posteriores se puede considerar: aislar e identificar los productos activos; optimizar la producción del cultivo de estas bacterias para obtener mayor concentración de los productos activos para usarlos como una estrategia de control bacteriológico; estudiar y comprender los mecanismos de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos como biocontrol. Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio representan una contribución a la investigación sobre bacterias del género *Bacillus* productoras de sustancias antibacterianas, demostrando que en el ecosistema marino existen *Bacillus* marinos con propiedades antibacterianas que inhiben el crecimiento del patógeno *V. cholerae* que causan grandes problemáticas a nivel clínico.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos FONDEF: MRO7I1006 y D10I1050.

LITERATURA CITADA

- Al-Dohail MA, R Hashim & M Aliyu-Paiko. 2011.** Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquaculture Research* 42: 196-209.
- Ambas I, N Buller & R Fotedar. 2014.** Isolation and screening of probiotic candidates from marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002) gastrointestinal tract (GIT) and commercial probiotic products for the use in marron culture. *Journal of Fish Diseases*, <doi: 10.1111/jfd.12257>
- Avendaño-Herrera R, M Lody & CE Riquelme. 2005.** Production of inhibitory substances among bacterial biofilms on marine substrates. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40: 117-125.

- Brack C, A Mikolasch & F Schauer. 2014.** 2,5-Diketopiperazines produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology* 16: 385-395.
- Cutting SM. 2011.** *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28: 214-220.
- Del'Duca A, D Evangelista, C Galuppo & PC Abreud. 2013.** Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture* 388-391: 115-121.
- Dopazo CP, ML Lemos, C Lodeiros, JJ Bolinches, JL Barja & AE Toranzo. 1988.** Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 97-101.
- Ghose AC. 2011.** Lessons from cholera & *Vibrio cholerae*. *Indian Journal of Medical Research* 133: 164-170.
- Hanifi A, T Culpepper, V Mai, A Anand, AL Ford, M Ukhanova, M Christman, TA Tompkins & WJ Dahl. 2014.** Evaluation of *Bacillus subtilis* R0179 on gastrointestinal viability and general wellness: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. *Beneficial Microbes* <doi: 10.3920/BM2014.0031>
- Hemaiswarya S, R Raja, R Ravikumar & IS Carvalho. 2013.** Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 113-119.
- Ki J-S, W Zhang & P-Y Qian. 2009.** Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiology Methods* 77: 48-57.
- Leyton Y & C Riquelme. 2010.** Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name 'Loco') have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Ecology* 60: 599-605.
- Leyton Y & C Riquelme. 2013.** Oleic acid and diketopiperazines produced by marine bacteria reduce the load of the pathogen *Vibrio parahaemolyticus* in *Argopecten purpuratus*. *Journal of Aquaculture Research and Development* 4(4): 1000179 <doi:10.4172/2155-9546.1000179>
- Leyton Y, J Borquez, J Darias, M Cueto, AR Díaz-Marrero & C Riquelme. 2012.** Diketopiperazines produced by a *Bacillus* species inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Aquaculture Research and Development* 3(4): <doi: 10.4172/2155-9546.1000144>
- Liu J, C Winstead-Derlega, E Houpt, R Heidkamp, J Pape & R Dillingham. 2014.** Pre-earth quake non-epidemic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Journal of Infection in Developing Countries* 8(1): 120-122.
- Mengel MA. 2014.** Cholera in Africa: new momentum in fighting an old problem. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108(7): 391-392. <doi: 10.1093/trstmh/tru077>
- Miranda CA, OB Martins & MM Clementino. 2008.** Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16 S rRNA gene sequencing and intertRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93: 297-304.
- Mishra S, P Malhotra, AK Gupta, PK Singh, S Javed & R Kumar. 2014.** A semiquinone glucoside derivative isolated from *Bacillus* sp. INM-1 provides protection against 5-fluorouracil-induced immunotoxicity. *Journal of Immunotoxicology* <doi: 10.3109/1547691X.2014.882448>
- Murni K, W Zhao, D Rowley, D Nelson & M Gomez-Chiarri. 2013.** Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *Journal of Shellfish Research* 32: 401-408.
- Nimrat S, P Tanutpongpalin, K Sritunyalucksana, T Boonthai & V Vuthiphandchai. 2013.** Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquaculture International* 21: 655-666.
- Oguntoyinbo FA. 2007.** Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *African Journal Biotechnology* 6: 163-166.
- Orberá TM, MJ Serrat & E Ortega. 2014.** Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada* 31: 7-12.
- Palmer AC & R Kishony. 2013.** Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nature Reviews Genetics* 14: 243-248.
- Pérez-Sánchez T, I Ruiz-Zarzuela, I de Blas & JL Balcázar. 2013.** Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture* 6(3): 133-146 <doi: 10.1111/raq.12033>
- Ramirez F. 2000.** Fisiología de *Bacillus sphaericus* y su interacción con *Methanosarcina mazel* en la degradación de acetamida, 67 pp. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, México.
- Raytekar NA, S Saini, D Bhalerao, S Deorukhkar & BL Sarkar. 2014.** A bacteriological study of *Vibrio cholerae* isolated from rural tertiary care hospital of Loni, western Maharashtra. *British Microbiology Research Journal* 4(9): 949-958.
- Rowe-Magnus DA, Z Mohamed & D Mazel. 2006.** The adaptive genetic arsenal of pathogenic *Vibrio* species: the role of integrons. In: Fabiano LT, A Brian & JG Swings (eds). *The biology of vibrios*, pp. 95-111. ASM Press, Washington.

Siefert JL, M Larios-Sanz, LK Nakamura, RA Slepecky, JH Paul, ER Moore, GE Fox & P Jurtschuk Jr. 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology* 41: 84-88.

Sihag RC & P Sharma. 2012. Probiotics: The new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 7: 72-103.

Sujith P, B Rohini & S Jayalakshmi. 2014. Cellular fatty acid composition, protein profile and antimicrobial activity of *Bacillus* sp., isolated from fish gut. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(1): 59-63.

Thompson D, G Higgins & J Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Vinoj G, B Vaseeharan, S Thomas, AJ Spiers & S Shanthi. 2014. Quorum-quenching activity of the AHL-Lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation *in vitro* and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Marine Biotechnology* 16(6): 707-715. <doi: 10.1007/s10126-014-9585-9>

Yuehua P, L Sun, Y Wang, D Qi, D Chen, H Liu, D Xu, C Deng & J Li. 2013. Modeling inhibitory activity of a novel antimicrobial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp under various environmental conditions. *Food Control* 33: 249-253.

Recibido el 5 de noviembre de 2013 y aceptado el 4 de septiembre de 2014

Editor: Claudia Bustos D.