



Gradu Amaierako Lana

Biologiako Gradua

Konposatu antimikrobianoak ekoizten dituzten itsas bakterioen baheketa

Egilea:

Amaia Hernández Fernández de Retana

Zuzendariak:

Iñigo Azúa Pérez
Zuriñe Baña García

Aurkibidea

Laburpena.....	1
Abstract	1
Sarrera	2
Helburuak eta hipotesia.....	4
Material eta metodoak.....	4
1) Bakterio eta onddoen kultiboa eta mantentzea.....	4
2) Itsas bakterioen kultiboak	5
3) Sekretomaren esterilizazioa eta kontzentrazioa	6
4) Itsas bakterioen sekretomaren aktibitate antimikrobianoaren detekzioa.....	7
5) Analisi estatistikoa	8
Emaitzak.....	8
1) Aktibitate antimikrobianoaren detekzioa	8
2) Kultibo-medioen eragina aktibitate antimikrobianoaren detektapenean	10
Eztabaida	12
Ondorioak.....	16
Bibliografia	17
Eranskinak.....	21

Laburpena

Bakterio patogeno ugarik egungo antibiotikoekiko garatutako erresistentziek eta garrantzi klinikodun onddoen aurkako neurri profilaktiko urriek agerian uzten dute patogeno horien larritasuna eta antimikrobiano berrien beharra. Itsasoko baldintza bereziek (oligotrofia, tenperatura, gazitasuna,...) medio lehiakorra izatea eragiten dute. Ondorioz, ingurumeneko bestelako mikroorganismoetatik babesteko, itsas bakterioek aktibitate inhibitzailea duten bigarren mailako metabolito asko ekoizten dituzte. Beraz, itsasoa konposatu antimikrobiano berriak aurkitzeko ekosistema aproposa suertatzen da. Kantauri kostaldeko gainazal-uretatik eta korrokoien hesteetatik isolatutako 21 itsas bakterioen aktibitate antimikrobianoaren ahalmena probatu zen garrantzi klinikoa eta erresistentziak garatzen ari diren 6 bakterio patogenoren (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* eta *Escherichia coli*) eta 4 onddoren (*Aspergillus fumigatus*, *Candida auris*, *Lomentospora prolificans* eta *Scedosporium boydii*) aurka. Halaber, kultibo-medio ezberdinak erabili ziren antimikrobianoen ekoizpenerako medio aproposena zein den ebazteko asmoarekin. Emaitzak esperantzagarriak dira, 2 antibiotiko ekoizle (*Flavobacterium granuli* E22 eta *Pseudoalteromonas* sp. ES104), 2 antifungiko ekoizle (*Aliivibrio finisterrensis* KH1 eta *Glutamicibacter bergerei* KH35) eta aktibitate biak aurkezten dituen ekoizle bat (*Bacillus* sp. KH33) detektatu baitira. Etorkizunerako lanean konposatu antimikrobiano horien karakterizazioa egiteko aukera zabaltzen da.

Abstract

The increasing resistance of pathogenic bacteria to current antibiotics, along with the limited preventive measures against clinically relevant fungi, underscores the urgent need for new antimicrobial treatments. The sea, with its unique conditions such as low nutrient levels, temperature and salinity, is a highly competitive environment. Thus, marine bacteria produce a wide variety of secondary metabolites, many of which have antimicrobial properties, to protect themselves from other microorganisms. The potential antimicrobial activity of 21 marine bacteria isolated from the surface waters of the Cantabrian coast and mullet intestines has been tested against 6 pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*) and 4 clinically relevant fungi (*Aspergillus fumigatus*, *Candida auris*, *Lomentospora prolificans* and *Scedosporium*

boydii). Additionally, different culture media have also been used to determine the most suitable one for antimicrobial production. The results are promising, as 2 antibacterial producers (*Flavobacterium granuli* E22 and *Pseudoalteromonas* sp. ES104), 2 antifungal producers (*Aliivibrio finisterrensis* KH1 eta *Glutamicibacter bergerei* KH35), and an isolate (*Bacillus* sp. KH33) with both activities have been detected. Future work will involve characterizing these antimicrobial compounds.

Sarrera

Mikroorganismo patogenoek garatutako antimikrobianoekiko erresistentziaren sakabanaketa arazo globala eta larria da. Antibiotikoekiko bakterio erresistenteen artean, Osasun Mundu Erakundeak (OME) 2024an eguneratu berri duen txostenean azken belaunaldiko antibiotikoekiko erresistenteak izateagatik lehentasunezkoak diren bakterio arriskutsuenen zerrenda argitaratu du (WHO, 2024). Haien artean *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* eta *Enterobacter* spp. aurkitzen dira. Bakterio horiek erabili ohi diren antibiotikoekiko multirresistentziak garatu dituzte. Hori dela eta, gaixotasun nosokomialen erantzule garrantzitsuenak dira, gaixo immunodeprimituen heriotza eragin dezaketelarik (Mulani *et al.*, 2019). 2019. urtean antibiotikoekiko erresistenteak diren bakterioek 1,27 milioi hildako utzi omen zituzten.

Bakterioek 5 mekanismo nagusi dituzte antibiotikoen aurreko erresistenteak izateko: antibiotikoen inaktibazioa edo eraldaketa, antibiotikoen ponpaketa, antibiotikoekin lotzen diren itu-molekulen eraldaketa, iragazkortasunaren aldaketa eta biofilmen eraketa (Santajit eta Indrawattana, 2016). Biofilmeko matrize polimerikoek babes fisiko eta biokimikoa ematen omen die mikroorganismoek, farmakoen aktibitatea indargetuz. Elikagaien eskasia dagoenean, mikroorganismoak fenotipikoki antibiotikoekiko tolerante ere bihur omen daitezke. Erresistentziarako geneak kromosoma bakterianoan zein plasmidoetan kode daitezke, baina plasmidoetan kodetuz gero, erresistentzia horiek bakterioz bakterio transmititu daitezke (Santajit eta Indrawattana, 2016).

Bestalde, infekzio fungikoak ere garrantzia hartzen ari dira asken urteotan. Onddoek eragindako infekzio gehienak giza azalekoak dira, baina zenbait espeziek, *A. fumigatus*-ek eta *Candida albicans*-ek esaterako, infekzio sistemikoak sortzen dituzte, eta heriotza eragin dezakete (Nnadi eta Carter, 2021). *Aspergillus*-ek, adibidez, erraztasunez koloniza ditzake gaixo asmatikoen bronkioak, asma iraunkor larria eta birikaren funtzio gutxitua

sortuz, edota birikietako mikosi bronkoalergikoak eraginez, osasunean ondorio larriagoak eragin ditzaketenak (Osaki *et al.*, 2021). *Scedosporium boydii* eta *Lomentospora prolificans* onddoek paziente immunodeprimituei ez ezik, paziente immunokonpetenteei ere gaixotasun fungiko inbaditzaileak sortarazten dizkiete (Vignals *et al.*, 2024). Tamalez, ez dago infekzio fungikoen aurkako txertorik, antifungiko gutxi ezagutzen dira, antifungikoekiko erresistentzien garapena gero eta handiagoa da, eta espezie asko esporasortzaileak direnez, ez da beharrezkoa gaixo batekin kontaktu zuzena izatea kutsadura gertatzeko (Nnadi eta Carter, 2021; Strickland eta Shi, 2021). Hori dela eta, gero eta garrantzi handiagoa ematen zaie, eta horrela, 2022an OMEk lehentasuneko onddo patogenoen zerrendan lehen hamahiruen artean agertzen dira aurretik aipatutakoak (WHO, 2022).

Izaki bizidunek mota askotariko konposatu antimikrobianoak ekoitz ditzakete: H_2O_2 , gantz azidoak, azido organikoak, etanola, entzima litikoak, pigmentuak, alkaloideak, antibiotikoak, antifungikoak eta bakteriozinak, besteak beste. Horiek guztiak antagonismo mikrobianoaren parte-hartzaileak dira baliagaien eta espazioaren lehiakortasunean laguntzen duten erreakzio immuneak eta defentsa-mekanismoak mediatzen dituztelako (Darbandi *et al.*, 2022). Mikroorganismoen hazkuntza inhibitzen edota oztopatzen duten konposatuen artean, bakteriozinak eta antibiotikoak ezagunenak dira. Bakteriozinak pisu molekular baxuko (20 eta 60 aminoazido) peptido erribosomikoak dira, bakterio Gram negatibo eta Gram positibo batzuek ekoitzen dituztenak (Danqua *et al.*, 2022; Rani *et al.*, 2021). Gainera, aktibitate antibakterianoa eta immunitate espezifikoa dute ekoizleari ahaidetutako anduiekiko, eta beraz, espektro estuko ahalmen inhibitzailea daukate. Bakteriozinak lehen mailako metabolito moduan sailkatzen dira, hau da, hazkuntzaren fase esponentzian sintetizatzen dira. Antibiotikoak, aldiz, bigarren mailako metabolitoak dira, hazkuntzaren fase geldikorrean edota heriotza-fasean sintetizatzen eta askatzen direnak (Darbandi *et al.*, 2022). Antibiotiko naturalen zein sintetikoen artean, hurrengo 4 ekintza-mekanismo eragileak dira ohikoenak: zelula-paretaren biosintesiaren inhibizioa, zelula-mintzaren desegonkortzea, azido nukleikoen edota proteinen sintesia galaraztea, eta bide metaboliko gakoaren eragozpena (Baran *et al.*, 2023). Horrez gain, pigmentuak ere badira antimikrobiano-iturri interesgarriak (Mahla *et al.*, 2020). Izan ere, baheketan aztertutako bakterioen hautapenerako irizpide nagusienetariko bat pigmentuen ekoizpena izan da.

Horietako askok aktibitate antimikrobianoa (antibiotikoa eta antifungikoa) daukate, eta espezie bat baino gehiagotan deskribatuak eta isolatuak izan dira.

Lurreko ekosistemetako antimikrobiano ekoizleekin alderaturik, itsas bakterioek metabolito sekundario bereziak ekoizten dituzte, ingurune oligotrofiko lehiakorragoetan bizi direlako, eta presio-, temperatura-, gazitasun-, oxigeno kontzentrazio, argitasun- eta pH-baldintza bereziak jasaten dituztelako. Faktore horiek antibiotiko eraginkorren iturri oparoa bihurtzen dituzte (Rani *et al.*, 2021). Esaterako, *Posidonia oceanica*-tik isolatutako *Mariomonas mediterranea*-k ekoiztutako marinozina proteinak espektro zabaleko (Gram positiboen eta Gram negatiboen aurka) aktibitate antimikrobianoa dauka, edo *Mytilus edulis*-etik *Bacillus* sp. BC028 anduiak ekoiztutako baziziklina peptido ziklikoak *E. faecalis*-en eta *S. aureus*-en hazkuntza inhibitzen du. Gainera, erauzitako baziziklina eraginkortasun altuko analogoak diseinatzeko erabili da (Rani *et al.*, 2021). Beraz, itsas bakterioak oso iturri interesgarria izan daiteke patogeno erresistenteek eta garrantzi klinikodun onddoek eragiten duten mehatxuaren aurrean irtenbide berrien bilaketan.

Helburuak eta hipotesia

Gradu Amaierako Lan honen helburua da Kantauriar itsasoko Bizkaiko kostaldeko gainazal-uretatik eta korrokoien hesteetatik isolatutako 21 itsas bakterioetan 6 bakterio patogenoen (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* eta *Escherichia coli*) eta 4 onddo patogenoen (*Aspergillus fumigatus*, *Candida auris*, *Lomentospora prolificans* eta *Scedosporium boydii*) aurkako aktibitate antimikrobianoa bilatzea. Horretaz gain, beste helburu bat izan da hiru kultibo-medio ezberdinetatik antifungikoaren ekoizpena hobekien sustatzen duen kultibo-medioa zehaztea. Helburuek Garapen Iraunkorrerako Helburuekin (GIH) bat egiten dute, osasun eta ongizatearekin (GIH3), hain zuzen.

Lanaren hipotesia da Kantauriar itsasoko hainbat itsas bakterio antimikrobiano ekoizleak, antibakteriano-ekoizleak, batez ere, direla.

Material eta metodoak

1) Bakterio eta onddoen kultiboa eta mantentzea

Eragin antibakterianoa detektatzeko CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) mikroorganismo-bildumatik garrantzi klinikodun 6 bakterio erabili ziren: *Enterococcus*

faecalis CECT 481 (Gram +), *Staphylococcus aureus* CECT 240 (Gram +), *Klebsiella pneumoniae* CECT 143T (Gram -), *Acinetobacter baumannii* CECT 9111 (Gram -), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (Gram -) eta *Escherichia coli* CECT 101 (Gram -).

Eragin antifungikoa detektatzeko garrantzi klinikodun 4 onddo erabili ziren: *Scedosporium boydii* CBS 116995 (Centraalbureau voor Schimmelcultures), *Lomentospora prolificans* CECT 20842, *Candida auris* CJ-197 eta *Aspergillus fumigatus* AF293. Azken biak Valentziako La Fe ospitalean gertatutako agerraldi kliniko batetik (García-Bustos *et al.*, 2021) eta Shrewsbury-ko Ospitale Errealeko Osasun Publikoaren laborategian egindako birikako biopsia batetik (Bertuzzi *et al.*, 2021) isolatuak izan ziren, hurrenez hurren.

Bizkaiko kostaldeko gainazal-uretatik, Plentziako estuario eta badiatik (ES eta B kodeaz izendatuak, hurrenez hurren) eta Getxoko estuariotik (E kodeaz izendatuak), hain zuzen, eta Plentziako portuko korrokoien hesteetatik (KH kodea duten bakterioak) isolatutako 21 bakterioen antimikrobianoen ekoizpen-ahalmena analizatu zen, Mikrobio Itsastarrak (Mikrobiologia, Immunologia eta Parasitologia Saila, UPV/EHU) ikerketa-taldearen mikroorganismo bilduman gordeak (1. eranskina). Kontrol positibo moduan *Marinomonas mediterranea* CECT 4803T- erabili zen.

Mikroorganismoen kultiboak agar inklinatudun saio-hodietan egin ziren: itsas mikrobioen hazkuntzarako Itsas Agarra (2. eranskina), erreferentziazko bakterioen hazkuntzarako Agar elikagarria (3. eranskina) eta onddoen hazkuntzarako Sabouraud Agarra (4. eranskina) erabili ziren andui bakoitzaren hazkuntza-eskakizunen arabera. Behin inokulatu ondoren, tenperatura optimoetan kultibatu ziren mikroorganismoak. Kultiboak mantentzerako 4 °C-tan kontserbatu ziren.

Aktibitate antimikrobianoa detektatzeko saioetan itsas bakterioen inokulua egiteko 24-48 orduko kultiboak erabili ziren, 25 °C-tan inkubatu zirenak. Erreferentziazko bakterioen eta onddoen kultibo berriak eta aktiboak erabili ziren, saioa egin baino 24-48 ordu lehenago erein zirenak eta 37 °C-tan eta 28 °C-tan inkubatu zirenak, hurrenez hurren.

2) Itsas bakterioen kultiboak

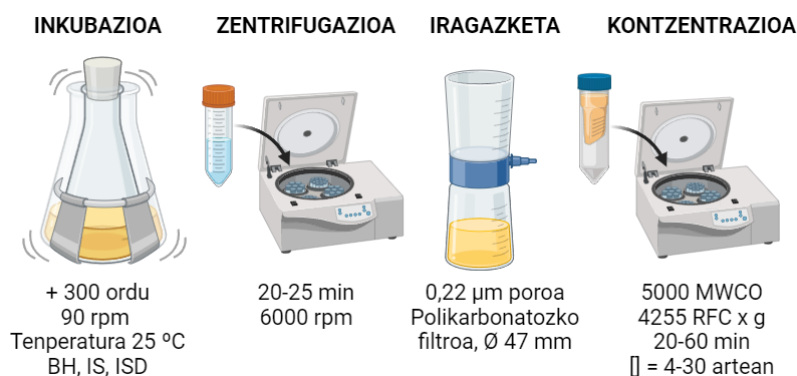
Aktibitate antimikrobianoa detektatzeko saioetan itsas bakterioek kultibo mediora askatutako sekretomak erabili ziren. Sekretoma proteinen eta bestelako molekulen

multzoa da, organismo baten metabolismoaren ondorioa, zelulaz kanpoko espazioan metatzen dena. Itsas bakterioen sekretomen berreskurapenerako eta balizko konposatu antimikrobianoen ekoizpenerako hiru kultibo-medio likido ezberdin erabili ziren: 2 g/L glukosaz eta 20 g/L NaCl-z aberastutako Bushnell-Haas salda minimoa (BH) (5. eranskina), Itsas Salda (IS) (6. eranskina) eta erdira diluitutako Itsas Salda (ISD). Kultibo-medioen konposizioari dagokionez, ISak (PanReac) itsas uraren konposizioa antzeratzen duen medioa da, eta BH (HiMedia) aberastuak karbono-iturri bakar moduan glukosa duen medioa da. Hiru kultibo-medioek baldintza oligotrofikoak simulatzen dituzte, eta antimikrobianoen ekoizpena bultzatu dezakete.

Matrazeak 200 ml saldekin 10^6 bakterio/mL-ko hasierako itsas bakterioen dentsitatearekin inokulatzeko epifluoreszentsia-mikroskopioaren bidezko dentsitatearen estimazio zuzena egin zen (Porter eta Feig, 1980). Horretarako, itsas agar inklinatuan 24-48 h-tan hazitako kultiboei 5-8 ml IS gehituz bakterioen suspentsio bat lortu zen. Esekiduratik 1 mL hartu, eta CaCO_3 -z tanponaturiko formalinaz (% 4,5 bol/bol) fixatu zen. Laginaren zenbaketa egokia egiteko, diluzio hamartarrak egin, eta DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amaierako kontzentrazioa) tindatzaileaz tindatu ziren 10 minutuz. Laginak 0,2 μm -ko poroa eta 25 mm-tako diametrodun Irgalan Beltza soluzioaz tindatutako polikarbonatozko iragazkietan zehar iragazi ziren (Whatman; 7. eranskina). Epifluoreszentsia-mikroskopioan lagin bakoitzetik 40 eremuko bakterio-kopuruak zenbatu egin ziren esekiduraren dentsitatea kalkulatzeko. Behin dentsitatea estimatu eta aipatutako hasierako dentsitatearekin inokulatu ondoren, bigarren mailako metabolitoak izateko fase geldikorra lortu arte matrazeak 300 orduz 25 °C-tan eta 90 rpm-pean inkubatu ziren.

3) Sekretomaren esterilizazioa eta kontzentrazioa

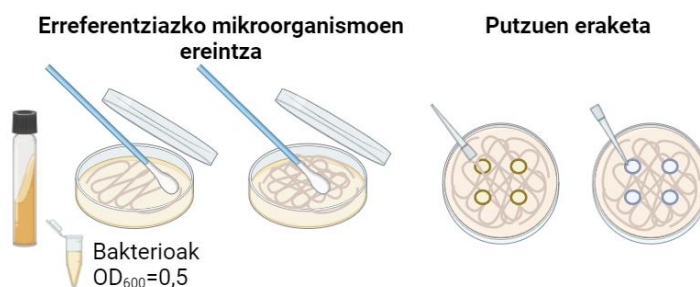
Sekretoma esterilaren lorpenerako kultiboak fase geldikorrean izan ondoren, zentrifugazioa (6000 rpm-tan 20-25 minutuz) eta iragazpena (0,2 μm -ko poroa eta 47 mm diametroa dituzten polikarbonatozko filtroak; Whatman) egin ziren. Balizko konposatu antimikrobianoen kontzentrazioa handitzeko, eta, beraz, horiek eragindako aktibitate antimikrobianoaren detekzioa errazteko, sekretomaren kontzentrazioa MWCO (Molecular Weight Cut-Off) teknikaz kontzentratu zen (Andrew *et al.*, 2002). Ultrairagazpena 5000 kDa poroa zuen mintzaz egin zen (4255 RCF \times g, 20-60 min, Vivaspin 20, Sartorius) (1. irudia).



- irudia:** Itsas bakterioen inkubazio-, zentrifugazio-, eta iragazketa-prozesuak soluzio esterilaren lorpenerako eta sekretomaren kontzentrazioa lortzeko.

4) Itsas bakterioen sekretomaren aktibitate antimikrobianoaren detekzioa

Sekretomaren aktibitate antimikrobianoa zehazteko Kirby-Bauer metodoa (agar difusio metodoa), zeinean mikrobio-agente batek antimikrobiano baten aurrean duen sentikortasuna zehazten den, erabili zen (Balouiri *et al.*, 2016). Garrantzi klinikoak duten erreferentziazko bakterio eta onddoen kultibo aktiboak Müller-Hinton agarradun Petri kutxetan erein ziren (8. eranskina). Bakterioei zegokienez, 0,5 dentsitate optikoa ($OD_{600} = 0,5$; OD: Optical density) zuten esekiduratik isipua busti eta agarraren azalera osotik erein ziren. Bigarren aldi batez igurtzi zen agarraren gainazala, aurreko ereintzaren norabidearekiko perpendikular, baina isipua berriro busti gabe, tapete modukoa eratzeko, eta erreferentziazko bakterioaren hazkuntza homogeneoa eta berdina kasu guztietan izan zedin. Onddoen kasuan, berriz, kultibo aktiboaren mizelioak eta esporak (*Candida auris*-en kasuan, zelulak) isipuz hartu eta teknika berdinez erein ziren, gero isipua mikroorganismoaz berriro kargatu gabe perpendikularki igurtzeko eta tapete homogeneoa lortzeko. Erreferentziazko bakterio eta onddo bakoitzeko bina plaka erein ziren, horrela, bi erreplika egin zirelarik. Ostean, behin mikrobio-esekidura xurgatuta, pipeta-punta esterilen alde zabalarekin agarra zulatu zen, 8 mm zuten diametroko putzuak eginez (2. irudia).



- irudia:** Erreferentziazko mikroorganismoen ereintza (bakterioen kasuan $OD_{600}=0,5$ duen esekiduraz ereindako tapetik eta onddoen kasuan ereintza zuzenetik abiatutakoa), putzuen eraketa eta inokulazioa.

Putzu bakoitzean 150 µL sekretoma kontzentratu esteril bota zen. Kontrol negatibo moduan 150 µL ur distilatu esteril bota zen, eta kontrol positibo moduan, aldiz, *Marinomonas mediterranea* bakterioaren 150 µL sekretoma esteril. Petri kutxak 24-48 orduz inkubatu ziren 37 °C-tan, eta 24 h igarotakoan beste 150 µL gehitu ziren.

Sekretoma kontzentratu esterilen aktibitate antimikrobianoaren detekzioarako eta kuantifikazioarako, erreferentziazko bakterioen eta onddoen hazkuntzaren inhibizioan sortutako haloak behatu eta horien diametroak neurtu ziren.

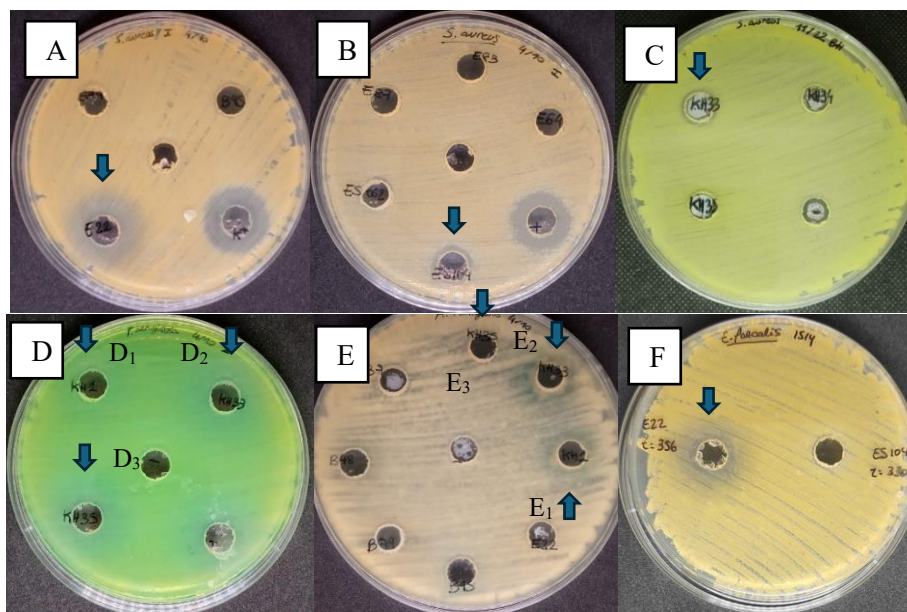
5) Analisi estatistikoa

Itsas bakterioek erreferentziazko bakterioen eta onddoen aurrean eragindako aktibitate antimikrobianoaren arteko konparaketarako haloen diametroen batezbestekoen arteko konparaketak estatistikoki konprobatu ziren SPSS programa erabiliz. Horretarako, ANOVA eta post-hoc Bonferroni testak erabili ziren batez besteko bat baino gehiagoren konparaketarako. Bi batez bestekoen arteko konparaketarako lagin independenteentzako Student t testa eta binakako konparaketentzako Student t testa erabili ziren. Desberdintasunak onartu ziren $p < 0,05$ zirenean.

Emaitzak

1) Aktibitate antimikrobianoaren detekzioa

Itsas saldatik lortutako hasierako kontzentrazioa baino 4-30 aldiz artean kontzentratuagoko sekretomen soluzioak jaso ziren. Probatutako itsas bakterioetatik, hiruk azaldu zuten aktibitate antibakterianoa (% 14,3), hiruk antifungikoa (% 14,3), eta bakar batek aktibitate biak batera (% 4,8). Guztira, erreferentziazko mikroorganismoen aurkako 5 antimikrobiano ekoizle (% 23,8) detektatu ziren (3. irudia, 1. taula).



3. irudia: *F. granulii* E22-k (A), *Pseudoalteromonas* sp. ES104-k (B) eta *Bacillus* sp. KH33-k (C) *S. aureus*-en aurka eragindako inhibizioa. *A. finisterrensis* KH1-k (D₁), *Bacillus* sp. KH33-k (D₂) eta *G. bergerei* KH35-k (D₃) *P. aeruginosa*-ren pigmentu ekoizpenean eragindako inhibizioa; *A. finisterrensis* KH1-k (E₁), *Bacillus* sp. KH33-k (E₂) eta *G. bergerei* KH35-k (E₃) *A. fumigatus*-en hazkuntzan eragindako inhibizioa; *F. granulii* E22-k *E. faecalis*-en aurkako inhibizioa (F). K⁺, *M. mediterranea*-ren sekretoma esterila; (-), kontrol negatiboa, ur distilatu esterila.

Bakterioen aurrean, erreferentziako bakterio Gram positiboek dagokiola, *S. aureus*-en aurka *Flavobacterium granulii* E22-k eragindako inhibizioa esangarriki handiagoa zen *Pseudoalteromonas* sp. ES104-k eta *Bacillus* sp. KH33-k eragindakoarekin alderaturik (ANOVA, $p < 0,05$). *F. granulii* E22 isolatuak *E. faecalis*-ekiko inhibizioa eragin zuen frogatutako bakterio bakarra izan zen. *F. granulii* E22-k *S. aureus*-en aurrean izan zuen aktibitate antibakterianoa *E. faecalis*-en aurrean izandakoa baino handiagoa izan zen (Student t, $p = 0,021$).

Erreferentziako bakterio Gram negatiboek artean ez zen hazkuntzaren inhibizioa behatu, bai ordea, *Pseudomonas aeruginosa*-ren metabolismoaren alterazioa (patogenoaren ohiko pigmentu fluoreszentearen inhibizioa), korrokoietatik isolatutako hiru bakterioek eraginda: *Aliivibrio finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *Glutamicibacter bergerei* KH35. Ezberdintasunak estatistikoki esangarriak ziren *A. finisterrensis* KH1 eta *Bacillus* sp. KH33 artean, eta *A. finisterrensis* KH1 eta *G. bergerei* KH35 artean (ANOVA Bonferroni, $p = 0,007$ eta $p = 0,004$, hurrenez hurren) KH35 isolatuak aktibitate antagonista altuena izan zuen.

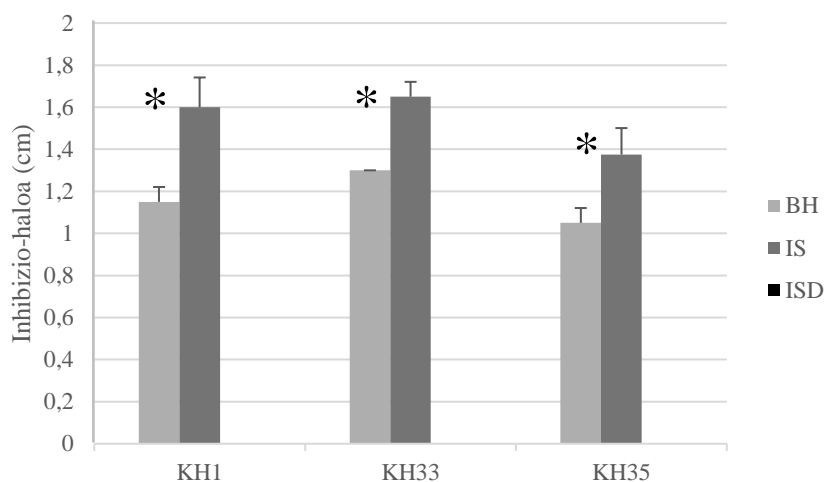
Onddoen aurrean, *A. finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *G. bergerei* KH35 anduiek ahalmen inhibitzailea eragin zuten *A. fumigatus* onddo firukararen aurka, baina nahiz eta lehenengo biek sorturiko haloen diametroen tamaina hirugarrenarena baino

pixka bat handiagoak izan, inhibizio-haloen diametroen artean ez zegoen ezberdintasun esangarririk (ANOVA, $p = 0,061$). Analizatutako itsas bakterioen artean ez zen behatu beste onddoen aurkako aktibitate antifungikoa zeukan isolaturik.

Bestalde, *Bacillus* sp. KH33-k eragindako aktibitate antibakteriano eta antifungikoen artean ez zegoen ezberdintasun esangarririk (Student t, $p = 0,078$)

2) Kultibo-medioen eragina aktibitate antimikrobianoaren detektapenean

Kultibo-medioen eragina aztertzeko eta antifungikoen ekoizpenerako medio egokiena zehazteko, 3 bakterio (*A. finisterrenis* KH 1, *Bacillus* sp. KH 33 eta *G. bergerei* KH 35) antifungiko sortzaileak kultibo-medio likido ezberdinetan (BH, IS eta ISD) inkubatu ziren. Lehendabizi, aipatu behar da ISD-an ez zela aktibitate antifungikorik behatu. Erabilitako beste bi salden artean, ezberdintasun esangarriak agertu ziren *A. fumigatus*-en inhibizioan hiru itsas bakterioen sekretometan (Student t, KH1 $p = 0,028$; KH33 $p = 0,01$; KH35 $p = 0,015$) (4. irudia), ISan sorturiko aktibitate antifungikoak BH saldan sorturikoak baino handiagoak izanik.



4. irudia: *A. finisterrenis* KH 1, *Bacillus* sp. KH 33 eta *G. bergerei* KH 35 itsas bakterioek medio ezberdinetan (BH, IS eta ISD) *A. fumigatus*-en aurka eragindako hazkuntzaren inhibizio-haloaren diametroa.

1. **taula:** Itsas bakterioek erreferentziako bakterioen eta onddoen aurrean eragindako aktibitate antimikrobianoa. Inhibizio-haloaren diametroa cm-tan (batez bestekoa \pm desbideratze estandarra). *, pigmentu-ekoizpenean eragindako inhibizioaren haloa; df, datu-falta. Gris argia, aktibitate antimikrobiano baxua; tarteko gris iluna, aktibitate antimikrobiano ertaina; gris iluna aktibitate antimikrobiano altua.

Itsas bakterioak		Erreferentziako bakterioak						Erreferentziako onddoak			
Identifikapena	KODEA	Gram positiboak		Gram negatiboak				<i>A. fumigatus</i>	<i>C. auris</i>	<i>L. prolificans</i>	<i>S. boydii</i>
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>				
<i>Arthrobacter</i> sp.	B37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glutamicibacter</i> sp.	B48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	B79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium granuli</i>	E22	1,4 \pm 0,00	2,15 \pm 0,07	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Qipengyuania</i> sp.	E64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Marinomonas blandensis</i>	E83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i> sp.	E87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	ES62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	ES104	-	1,6 \pm 0,14	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseumonas cichorii</i>	ES155	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aliivibrio finisterrensis</i>	KH1	-	-	-	-	*1,45 \pm 0,07	-	1,6 \pm 0,14	-	-	-
<i>Photocaterium piscicola</i>	KH3	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio</i> sp.	KH9	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Buttiauxella</i> sp.	KH15	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	KH18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KH19	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rahnella variignea</i>	KH29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	KH33	-	1,25 \pm 0,07	-	-	*2,00 \pm 0,00	-	1,65 \pm 0,07	-	-	-
<i>Planococcus maritimus</i>	KH34	df	-	df	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glutamicibacter bergerei</i>	KH35	-	-	-	-	*2,15 \pm 0,07	-	1,375 \pm 0,12	-	-	-

Eztabaida

Gradu Amaierako Lan honetan UPV/EHU-ko Mikrobio Itsastarrak ikerketa-taldearen mikroorganismo-bildumatik 21 bakterio aztertu dira, garrantzi klinikoak duten 6 bakterioen eta lau onddoen aurkako inhibizioa eragiten dutenetz konprobatzeko. Aztertuetatik ia laurden batek (% 23,8k) aktibitate antimikrobiana aurkeztu du. Beraz, Kantauriar itsasoa antimikrobianoen aurkikuntzarako iturri aproposa izan daitekeela konprobatu da. Izan ere, hainbatetan itsas mikroorganismoak proposatu izan dira antimikrobiano ekoizle moduan, eta bioteknologia urdina garrantzi handia hartzen ari da azken urteotan (Rani *et al.*, 2021). Haatik, ez zen espero hainbeste antifungiko ekoizle detektatzea. Egia da itsas onddoen inguruko informazioa eskasa dela, baina gaur egun euren presentzia, ugaritasuna eta garrantzi ekologikoa itsasoan konprobatuta dago (Gonçalves *et al.*, 2022). Beraz, itsas bakterioek onddoen aurka lehiatzeko eta babesteko mekanismoak badituzte. Ohikoa da, adibidez, itsas bakterioek kitinasak (onddoen zelulapareta lisatzeko entzimak) eta aktibitate antifungikoa edukitzea (Danqua *et al.*, 2022).

Nahiz eta itsasoan bakterio Gram negatibo proportzioa Gram positiboena baino altuagoa izan (Madigan *et al.*, 2019), saio esperimentalean ez da lehengoan aurkako aktibitate antibakteriano argirik detektatu. Gram negatiboak Gram positiboak baino ugariagoak izanda, pentsa daiteke bakterioek sorturiko aktibitate antagonistak batez ere bakterio Gram negatiboen aurka izango zela, baina gure emaitzek kontrako adierazten dute. Agian halako bakterio Gram positiboen aurkako aktibitate antibakterioaren sakabaketa itsasoan izan daiteke bakterio Gram positiboen ugaritasunaren eragile negatibo bat, besteak beste. Beste arrazoi bat emaitza hau azal dezakeena da probaturiko bakterio Gram negatiboak itsas inguruntara askotan heltzen direnez ibaien bidez (Madigan *et al.*, 2019), itsas bakterioek sorturiko antibakterianoekiko erresistentziak arruntak izatea. Dena den, sakonago ikertu beharko litzateke Gram negatiboekiko hazkuntzaren inhibizioa zergatik ez den detektatu azaltzeko.

Bakterio Gram positiboen aurkako aktibitate antibakterianoa, *Bacillus* sp. KH33 *Flavobacterium granuli* E22 eta *Pseudoalteromonas* sp. ES104 itsas anduiek eragindakoa, batez ere *S. aureus*-en aurka ikusi da. Kontuan izanda metizilinarekiko *S. aureus*-en erresistentziaren sakabanaketa handia, bakterio horrek sorturiko infekzioaren larritasuna eta horren kontra gaur egun dauden terapia farmazeutikoen eragin baxua,

emaitzek iradokitzen dute Kantauriar itsasoko bakterioak izan daitezkeela izaki bizidun interesgarriak bakterio patogeno larri honen kontrako antibiotiko berriak bilatzeko.

F. granuli E22 isolatuak duen *E. faecalis*-en aurkako aktibitateak (aurkitutako bakarra) eta *S. aureus*-en aurkako aktibitateak (aurkitutako handiena) itsas bakterio honen garrantzia islatzen dute. Nabarmentzekoa da literatura zientifikoan ez dela oraindik espezie horren aktibitate antibakterianoa deskribatu, bai ordea, genero mailan. Aktibitate antibiotikoaren mekanismo eragile ezberdinak deskribatu dira *Flavobacterium* generoan. Esaterako, *F. panacis*-ek zelulaz kanpo sintetizatutako zilar kloruro nanopartikulek ezaugarri antibiotikoak (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* eta *S. aureus* patogenoen aurka) eta antifungikoak (*Rhizoctonia solani*-ren aurka) dituztela behatu da (Huo *et al.*, 2021); eta *Flavobacterium* sp. Ant342-ak ekoiztutako flexirrubina motatako pigmentuak *Mycobacterium tuberculosis*-en aurkako aktibitatea du (Aruldass *et al.*, 2018). Oro har, *Flavobacterium* spp.-tan ohikoa da flexirrubina motatako pigmentuen ekoizpena. Flexirrubinak karotenoide hori-laranja dira, eta horietako zenbaitek aktibitate antimikrobianoa dute, aurretik aipatu bezala (Aruldass *et al.*, 2018). Dena den, *F. granuli* Kw05^T eredu-anduian ez da flexirrubinaren ekoizpenik detektatu nahiz eta, gure anduiak bezala, R2A agarrean kolore hori-laranja hartzen duen (Aslam *et al.*, 2005). Hala ere, *F. granuli* E22 isolatuaren pigmentazioa itsas agarrean, ez da hori-laranja, marroi-grisa baizik, eta beraz, medioak beste pigmentuen ekoizpena edo pigmentuaren eraldaketa eragiten dituela pentsa daiteke. Literatura zientifikoan deskribatu da ere beste flabobakterio bat, *Tenacibaculum discolor* sv11, fenetilaminadun alkaloide bioaktiboak ekoizteko gai dena. Konposatu horiek bakterio Gram positiboen (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Lysteria monocytogenes* eta *S. aureus*) eta Gram negatiboen (*E. coli*) eta onddoen (*C. albicans* eta *Aspergillus flavus*) aurrean frogatzean, ikusi zen aktibitate antibiotiko altua zutela Gram positiboekiko eta onddoekiko, baina *E. coli*-rekiko ez ziren eraginkorrak izan (Wang *et al.*, 2022).

Pseudoalteromonas sp. ES104-ren sekretoma kontzentratu esterilak *S. aureus*-ekiko aktibitate antimikrobianoa dauka, bibliografiarekin bat egiten du. Itsasoko *Pseudoalteromonas* generoaren andui desberdinetan aktibitate antibiotikoa aurkitu egin da. Adibidez, Itsaso Gorriko koral holobionteetatik isolatutako *Pseudoalteromonas* spp.-ek Gram positiboen aurkako zelulaz kanpoko aktibitate antibakterianoa erakutsi zuen, *S. aureus*-en eta *Bacillus cereus*-en aurka, hain zuzen, ez ordea, Gram negatiboen aurka

(Shnit-Orlan *et al.*, 2012). Bestetik, bakteriozinen, alkaloide eta pigmentu antibakterianoen ekoizpenean genero ezaguna da (Danquah *et al.*, 2022).

Bacillus sp. KH33 anduiak, ere *S. aureus*-en aurkako aktibitate antibiotikoa aurkitu da. *Bacillus* generoko anduiak, lur- zein itsas inguruneak, metabolito bioaktiboak ekoizteagatik ezagunak dira. Konposatu horiek bakteriozinak, peptido ez-erribosomikoak eta poliketidoak dira (Rani *et al.*, 2021). Izan ere, generoak BGC (Biosynthetic gene clusters) ugari ditu, estres altuko ingurunetan bizirauteko metabolito sekundarioak kodetzen dituztenak (Salazar *et al.*, 2022). Gainera, akuikulturako arrainetatik isolatutako *Bacillus* spp.-k aktibitate antimikrobianoa eragiten dute hala giza nola arrain-patogenoekiko (Santos *et al.*, 2021). *Bacillus* spp.-en zelulaz kanpoko konposatu antimikrobianoek *Vibrio parahaemolyticus* eta *S. aureus*-en hazkuntza moteltzen dute, eta gainjalkin esterilek *V. parahaemolyticus* giza patogenoaren eta zenbait arrain-patogenoren biofilmen eraketa galarazten dute (Santos *et al.*, 2021). Bestalde, itsasoko *Bacillus* sp. 09ID194 anduiak ekoiztutako makrolaktinak *S. aureus*-en aurkako aktibitate antibiotiko altua du (Mondol *et al.*, 2013).

Aktibitate antibiotiko argia eragin ez arren, *Aliivibrio finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *Glutamicibacter bergerei* KH35 isolatuek *P. aeruginosa*-ren pigmentazioa eragotzi dute. Antagonismo hori *quorum quenching*-ari (*quorum sensing*-aren indargabetzea) zor dakioke, askotan pigmentu-ekoizpena *quorum sensing* mekanismoaren menpekoa baita. Esaterako, *Bacillus* spp. askok, *quorum sensing*-aren kontrako AHL-laktonasak eta AHL-oxidoreduktasak ekoizten dituzte (Santos *et al.*, 2021). Horri lotuta, bibliografian konprobatu da *quorum quenching*-a *P. aeruginosa*-ren birulentzia deuseztatzeko mekanismo baliagarria izan daitekeela (Rather *et al.*, 2022). Beharbada, pigmentuaren ekoizpena inhibitu duten konposatu horiek aktibitate antifungikoa ere badaukate, probatutako isolatuetatik *P. aeruginosa*-ren aurkako antagonismoa eta aktibitate antifungikoa eragin duten bakarrak izan direlako.

Baheketan detektatu den aktibitate antifungiko bakarra *Aspergillus fumigatus*-en aurka izan da, eta hiru kasutan korrokoien mikrobiotakoek, *A. finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *G. bergerei* KH35 isolatuek eraginda. *A. fumigatus*-en garrantzi klinikoa eta OMERen arabera, *A. fumigatus* lehentasun kritikoko onddo patogenoa dela (WHO, 2022) kontuan harturik, lortutako emaitzak garrantzizkoak dira, eta iradokitzen dute Kantauriar itsasoko bakterioak ere iturri on bat izan daitezkeela onddo patogeno larri horren aurkako antifungiko berrien bilaketan.

Aliivibrio finisterrensis KH1 isolatuari dagokionez, *A. finisterrensis* CMJ11.1^T eredu-anduia DNasa eta kitinasa positiboa da (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Izan omen daiteke entzima horien aktibitateagatik *A. fumigatus*-en hazkuntza inhibitu izana, baina horrela izanda ziurrenik beste onddoetan ere inhibizioa eragingo luke. Beharbada, beste onddoen inhibizioa sortarazteko sekretomaren konposatu bioaktiboen kontzentrazioa ez da nahikoa izan, edo *A. finisterrensis* KH1-k *A. fumigatus*-ekiko bestelako antifungiko espezifikoak ekoizten omen ditu. Generoaren barruan badago beste espezie bat konposatu inhibitzailak sortzen dituenak (Hjerde *et al.*, 2015), baina antifungikoen ekoizpena ez da deskribatu. Ondorioz, generoak sorturiko aktibitate antifungikoaren lehen aipamena da.

Glutamicibacter bergerei KH35 isolatuari dagokionez, *A. fumigatus*-en hazkuntza inhibitu duen arren, espezie-mailan ez da aktibitate antifungikorik deskribatu bibliografian, beraz, espezieak sorturiko aktibitate antifungikoaren lehenengo aipamena da. Aldiz, *Glutamicibacter mysorens*-ek konposatu bioaktibo antifungikoak, azido undekanoiko eta 2-metil azido undekanoiko gantz azidoak, besteak beste, sintetizatzen dituela deskribatu da (Karthik *et al.*, 2023). Gainera, azido undekanoikoa infekzio fungikoak tratatzeko estrategia terapeutiko moduan planteatu da. Are gehiago, azido undekanoikoaren deribatuak *E. coli*-ren, *Enterococcus faecalis*-en, *Candida albicans*-en eta *Aspergillus niger*-en hazkuntza kontrola dezake burdinaren homeostasia aldatuz (Rossi *et al.*, 2021). *G. bergerei* Ca106^T eredu-anduiak kitina substratu moduan erabiltzen ez duenez (Irlinger *et al.*, 2005), *A. fumigatus*-en zelula-pareta kitinasa entzimaren ondorioz lisatzea ez da probablea. Horrenbestez, onddoaren metabolismoan interferitzen duen beste konposatu antifungiko sintetizatzen omen du, beharbada, aurretik aipatutakoak.

Halaber, *Bacillus* spp. askok antifungikoak ere ekoizten dituzte, biofungizida ekoizle eraginkorrak baitira, lipopeptido ziklikoen taldea antifungiko nagusienatarikoa izanik (Salazar *et al.*, 2022). Adibidez, *B. sporothermodurans* TM-I-3 anduiak *Aspergillus*-en eta *Cladosporium cladosporioides*-en esporen hozidura inhibitzen du (Osaki *et al.*, 2021); eta askok ondoen zelula-pareta hidrolizatzen dituzten kitinasak ere badituzte, *Bacillus aryabhatai*-k, hain zuzen, *Candida albicans* eta *Fusarium oxysporum* onddoen aurkako aktibitate antifungikoa duten kitinasak ditu (Subramani *et al.*, 2022).

Bestaldetik, emaitzek aditzera ematen dute medioen osaketan arteko ezberdintasunek eragina daukatela antimikrobiano-ekoizpenean. ISDan hazitako itsas bakterioek (*A. finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *G. bergerei* KH35) ez dute inhibiziorik eragin

erreferentziatzko onddoekiko, beharbada kultiboak fase geldikorrera edota *quorum sensing*-a lortzeko dentsitate minimora ez direlako heldu. IS medio egokioagoa dirudi antimikrobianoen ekoizpenerako, *A. fumigatus*-en aurkako antifungikoen ekoizpenerako, behintzat. BHari dagokionez, medioan glukosa gehitu da karbono-iturri bakar moduan, mikroorganismo gehienek erabil dezaketena, baina zenbait kasutan, glukosak metabolito sekundarioen sintesia eragotzi dezake. Esaterako, *Serratia marcescens* bakterioan glukosaren erabilerak prodigiosina pigmentu bioaktiboaren sintesia galarazten du, glukosaz hazten denean pHa azidotzea dakarrelako. Metabolito sekundarioen sintesia nutriente-mota eta kontzentrazioaren menpekota da. Bide erregulatuak, hala ere, ez dira guztiz ezagutzen, baina sintesia erregulatu duten mekanismo molekular batzuen inguruan orokortasunak jakinak dira. Karbono-katabolitoen errepresioa (Carbon catabolite repression, CCR) karbono-iturrien erabilera erregulatu duen mekanismoa da, eta beste funtzio zelular askotan eragina du. CCRak gene-adierazpen diferentziala eraentzen du, eta, beraz, hazkuntza faboratzen duten nutrienteak erabiltzen direnean, hazkuntzarako esentziala ez den gene-adierazpena mugatzen da (Ruiz-Villafán *et al.*, 2022). Horrenbestez, mikroorganismoek substratuekiko daukaten lehentasunak kontuan hartzea komenigarria izango da, metabolito sekundarioen gene-adierazpena eta sintesia erreprimetuta ez egoteko; baita induktoreen presentzia, bakterio-dentsitatea, inkubazio-baldintzak eta iraupena kontuan hartzea ere, ekoizpen optimoa lortzeko.

Kantauriar itsasoko bakterioek lehentasuneko patogenoen aurkako aktibitate antimikrobianoa daukatela ikusita, etorkizunerako lanean isolatu horiek sakonago ikertu ahal izango dira. Alde batetik, ikerketa gehiago beharko lirateke anduiek eragindako inhibizioak jada deskribatutako mekanismoren bati esker gertatu direnentz edo konposatu berriak direnentz jakiteko. Bestetik, *Pseudoalteromonas* sp. ES104 eta *Bacillus* sp. KH33 isolatuak espezie-mailara identifikatu beharko dira, azken hori, batez ere, etorkizun oparoko antimikrobiano ekoizlea suerta daitekeelako.

Ondorioak

- 1) Kantauriar Itsasoa antibiotiko berrien bilaketarako iturri oparoa izan daiteke. Emaitzetan oinarrituta, Gram positiboan (*S. aureus*-en aurka eta *E. faecalis*-en aurka) aurkako antibiotikoen bilaketan bakterio Gram negatiboan aurkakoan baino iturri aproposagoa da.

- 2) Baheketan probaturiko itsas bakterioetatik, *Flavobacterium granuli* E22 isolatuak aktibitate antibakterianorik altuena eragin du eta, beraz, aldez aurretik deskribatu ez den Gram positiboen aurkako antibiotiko ekoizle oso interesgarria izan daiteke.
- 3) Baheketan probaturiko antibiotiko ekoizleek (*Flavobacterium granuli* E22, *Pseudoalteromonas* sp. ES104 eta *Bacillus* sp. KH33) metizilinarekiko erresistentea den *S. aureus* (MRSA) lehenetasuneko patogenoaren aurkako antibiotiko eraginkorrak ekoitzi ditzakete.
- 4) Bakterio patogenoen aurkako antagonismoa eragiten duten ekoizleek (*Aliivibrio finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *Glutamicibacter bergerei* KH35) hazkuntzaren inhibizioan oinarritzen ez diren patogenia kontrolatzeko mekanismoak azal ditzakete.
- 5) Korrokoietatik isolatutako *A. finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *G. bergerei* KH35 bakterioek *A. fumigatus*-en aurkako aktibitate antifungikoak iradokitzen du korrokoien mikrobiota onddo patogeno larri horren kontrako antifungikoen iturri aproposa izan daitekeela.
- 6) *Bacillus* sp. KH33 isolatua ekoizle oso interesgarria izan da, aktibitate antifungikoa (*A. fumigatus*-en aurka) zein antibakterianoa (*S. aureus*-en aurka) baitauzka, etorkizunean espeziea identifikatzea interesgarria izan daiteke.
- 7) Itsas Salda kultibo-medio egokiena izan da *A. finisterrensis* KH1, *Bacillus* sp. KH33 eta *G. bergerei* KH35 isolatuek *A. fumigatus* onddoaren aurkako aktibitate antifungikoa eragiteko.

Bibliografia

- Andrew, S. M., Titus, J. A., & Zumstein, L. (2002). Dialysis and concentration of protein solutions. *Current protocols in toxicology, Appendix 3*, A.3H.1–A.3H.5. <https://doi.org/10.1002/0471140856.txa03hs10>
- Aruldass, C. A., Dufossé, L., & Ahmad, W. A. (2018). Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *Journal Of Cleaner Production*, 180, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>
- Aslam, Z., Im, W., Kim, M. K., & Lee, S. (2005). *Flavobacterium granuli* sp. nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 55(2), 747-751. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63459-0>
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Beaz-Hidalgo, R., Doce, A., Balboa, S., Barja, J. L., & Romalde, J. L. (2010). *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 1), 223–228. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010710-0>
- Bertuzzi, M., Van Rhijn, N., Krappmann, S., Bowyer, P., Bromley, M. J., & Bignell, E. M. (2021). On the lineage of *Aspergillus fumigatus* isolates in common laboratory use. *Medical Mycology*, 59(1), 7–13.
- Danquah, C. A., Minkah, P. A. B., Duah, I. O., Junior, Amankwah, K. B., & Somuah, S. O. (2022). Antimicrobial Compounds from Microorganisms. *Antibiotics*, 11(3), 285. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030285>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., ... & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of clinical laboratory analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- García-Bustos, V., Ruiz-Saurí, A., Ruiz-Gaitán, A., Sigona-Giangreco, I. A., Cabañero-Navalon, M. D., Sabalza-Baztán, O., ... & Pemán, J. (2021). Characterization of the differential pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* infection model. *Microbiology spectrum*, 9(1), e0001321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00013-21>
- Gonçalves, M. F. M., Esteves, A. C., Alves, A. (2022). Marine Fungi: Opportunities and Challenges. *Encyclopedia 2022*, 2, 559–577.
- Hjerde, E., Karlsen, C., Sørum, H., Parkhill, J., Willassen, N. P., & Thomson, N. R. (2015). Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1669-z>
- Huo, Y., Han, Y. X., Singh, P., Kang, J. P., Pu, J. Y., Piao, C. H., & Yang, D. C. (2021). Antimicrobial, antioxidant, and anticancer potentials of AgCl nanoparticles biosynthesized by *Flavobacterium panacis*. *Applied Physics. A, Materials Science & Processing*, 127(4). <https://doi.org/10.1007/s00339-021-04386-z>
- Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre, M., & Grimont, P. A. D. (2005). *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), 457–462. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63125-0>
- Karthik, Y., Ishwara Kalyani, M., Krishnappa, S., Devappa, R., Anjali Goud, C., Ramakrishna, K., ... & Mushtaq, M. (2023). Antiproliferative activity of antimicrobial peptides and bioactive compounds from the mangrove *Glutamicibacter mysorens*. *Frontiers in microbiology*, 14, 1096826. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1096826>
- Madigan, M. T., (2019). Microbial ecosystems. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A (Eds.). *Brock biology of microorganisms*. (pp. 667-677). Harlow: Pearson.

- Mahla, K., Rinkal, G., Gupta, J., Raval, V.H., Rajput, K., & Panchal, R.R (2020). Production, Characterization and Applications of Yellow Pigment Using Marine Bacteria Isolated from Coastal Region of South Gujarat. *Bioscience Biotechnolgy Research Communications* 13 (1), 144-149. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.34046.00324>
- Mondol, M. A. M., Tareq, F. S., Kim, J. H., Lee, M. A., Lee, H., Lee, J. S., Lee, Y., & Shin, H. J. (2013). New antimicrobial compounds from a marine-derived *Bacillus* sp. *Journal Of Antibiotics*, 66(2), 89-95. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.102>
- Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS pathogens*, 17(4), e1009503. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
- Osaki, C., Miyake, S., Urakawa, S., Mitsuiki, S., Shimomoto, H., & Sato, H. (2021). Growth Inhibitory Mechanism of Contact-independent Antifungal TM-I-3 *Bacillus sporothermodurans* Strain against *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biocontrol science*, 26(1), 49–53. <https://doi.org/10.4265/bio.26.49>
- Porter, K.G., & Feig, Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora¹. *Limnology and Oceanography*, 25, 943-948.
- Rani, A., Saini, K. C., Bast, F., Varjani, S., Mehariya, S., Bhatia, S. K., Sharma, N., & Funk, C. (2021). A Review on Microbial Products and Their Perspective Application as Antimicrobial Agents. *Biomolecules*, 11(12), 1860. <https://doi.org/10.3390/biom11121860>
- Rather, M. A., Saha, D., Bhuyan, S., Jha, A. N., & Mandal, M. (2022). Quorum Quenching: A Drug Discovery Approach Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 264, 127173. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127173>
- Rossi, A., Martins, M. P., Bitencourt, T. A., Peres, N. T. A., Rocha, C. H. L., Rocha, F. M. G., ... & Martinez-Rossi, N. M. (2021). Reassessing the Use of Undecanoic Acid as a Therapeutic Strategy for Treating Fungal Infections. *Mycopathologia*, 186(3), 327–340. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00550-4>
- Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Manzo-Ruiz, M., Passari, A. K., Villarreal-Gómez, K., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2022). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microbial biotechnology*, 15(4), 1058–1072. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13791>
- Salazar, B., Ortiz, A., Keswani, C., Minkina, T., Mandzhieva, S., Singh, S. P., ... & Sansinenea, E. (2022). *Bacillus* spp. as Bio-factories for Antifungal Secondary Metabolites: Innovation Beyond Whole Organism Formulations. *Microbial Ecology*, 86(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02044-2>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Santos, R. A., Oliva-Teles, A., Pousão-Ferreira, P., Jerusik, R., Saavedra, M. J., Enes, P., & Serra, C. R. (2021). Isolation and Characterization of Fish-Gut *Bacillus* spp. as Source of Natural Antimicrobial Compounds to Fight Aquaculture Bacterial Diseases. *Marine Biotechnology*, 23(2), 276-293. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10022-x>

Shnit-Orland, M., Sivan, A., & Kushmaro, A. (2012). Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. *Microbial ecology*, 64(4), 851–859. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0086-y>

Strickland, A. B., & Shi, M. (2021). Mechanisms of fungal dissemination. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(7), 3219–3238. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03736-z>

Subramani, A. K., Raval, R., Sundareshan, S., Sivasengh, R., & Raval, K. (2022). A marine chitinase from *Bacillus aryabhatai* with antifungal activity and broad specificity toward crystalline chitin degradation. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 52(10), 1160–1172. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033994>

Vignals, C., Emmerich, J., Begueret, H., Garcia-Hermoso, D., Martin-Blondel, G., Angoulvant, A., ... & Bronnimann, D. (2024). Deciphering Unexpected Vascular Locations of *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans* Fungal Infections, France. *Emerging infectious diseases*, 30(6), 1077–1087. <https://doi.org/10.3201/eid3006.231409>

Wang, L., Linares-Otoya, V., Liu, Y., Mettal, U., Marner, M., Armas-Mantilla, L., ... & Schäberle, T. F. (2022). Discovery and Biosynthesis of Antimicrobial Phenethylamine Alkaloids from the Marine Flavobacterium *Tenacibaculum discolor* sv11. *Journal of natural products*, 85(4), 1039–1051. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01173>

WHO Antimicrobial Resistance Division (2022), WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2024 ekainaren 15ean. [WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action](#)

WHO Impact Initiatives and Research Coordination (2024), WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024 ekainaren 15ean. [WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance](#)

Eranskinak

1. Eranskina: Baheketan erabilitako itsas bakterioen identifikazioa eta laginketa-puntua

MIKROORGANISMOA	KODEA	ITURRIA
<i>Aliivibrio finisterrensis</i>	KH1	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Arthrobacter</i> sp.	B37	Plentziako badia
<i>Bacillus</i> sp.	KH33	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Buttiausela</i> sp.	KH15	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Flavobacterium granuli</i>	E22	Getxoko estuarioa
<i>Glutamicibacter bergerei</i>	KH35	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Glutamicibacter</i> sp.	B48	Plentziako badia
<i>Kocuria</i> sp.	E87	Getxoko estuarioa
<i>Marinomonas blandensis</i>	E83	Getxoko estuarioa
<i>Photocaterium piscicola</i>	KH3	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Planococcus maritimus</i>	KH34	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	B79	Plentziako badia
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	ES62	Plentziako estuarioa
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	ES104	Plentziako estuarioa
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	KH18	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KH19	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Pseudomonas cichorii</i>	ES155	Plentziako estuarioa
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B95	Plentziako badia
<i>Qipengyuania</i> sp.	E64	Plentziako estuarioa
<i>Rahnella variignea</i>	KH29	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Vibrio</i> sp.	KH9	Plentziako portuko korrokoien hestea
<i>Marinomonas mediterranea</i>	CECT 4803T	Colección Española de Cultivos Tipo

2. Eranskina: Itsas agarraren osaketa eta prestaketa. (Scharlau, 01-291-500)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 7,6 ± 0,2			
H ₃ BO ₃	0,022	KBr	0,08
NH ₄ NO ₃	0,0016	KCl	0,55
CaCl ₂	1,80	NaCl	19,40
SrCl ₂	0,034	Na ₂ PO ₄	0,008
Legami aterakina	1,00	NaHCO ₃	0,16
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,10	NaF	0,0024
MgCl ₂	8,80	Na ₂ SiO ₄	0,004
Peptona bakteriologikoa	5,00	Na ₂ SO ₄	3,24
Agarra	15,00		

Prestakuntza: 1 l ur distilatu esterilean 55,1 g nahasi irakin arte, matrazeetan banatu, eta autoklabatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde.

3. Eranskina: Agar elikagarriaren osaketa eta prestaketa (Scharlau, 01-140-500)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 7,4 ± 0,2			
Haragi aterakina	1,00	NaCl	5,00
Legami aterakina	2,00	Agarra	15,00

Prestakuntza: 1 l ur distilatu esterilean 28 g nahasi irakin arte, matrazeetan banatu, eta autoklabatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde.

4. Eranskina: Sabouraud agararen osaketa eta prestaketa (Scharlau, 01-165-500)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 5,6 ± 0,2			
D(+)- Glukosa	40,00	Kaseina-peptona	5,00
Haragi-peptona	5,00	Agarra	15,00

Prestakuntza: 1 l ur distilatu esterilean 65 g nahasi irakin arte, matrazeetan banatu, eta autoklabatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde.

5. Eranskina: Bushnell Haas medio aberastuaren osaketa eta prestakea. (HIMEDIA, M350-500)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 7,0 ± 0,2			
MgSO ₄	0,20	NH ₄ NO ₃	1,00
CaCl ₂	0,02	FeCl ₃	0,05
KH ₂ PO ₄	1,00	NaCl	20,00
K ₂ HPO ₄	1,00	Glukosa	2,00

Prestakuntza: 3,27 g suspenditu 1 l ur distilatuan, eta 20 g NaCl eta 2 g/l glukosa gehitu. Nahastu irankin arte, matrazeetan banatu, eta autokalbatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde.

6. Eranskina: Itsas saldaren osaketa eta prestaketa. (PanReac; 414698.1210)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 7,6 ± 0,2			
H ₃ BO ₃	0,022	KBr	0,08
NH ₄ NO ₃	0,0016	KCl	0,55
CaCl ₂	1,80	NaCl	19,40
SrCl ₂	0,034	Na ₂ PO ₄	0,008
Legami aterakina	1,00	NaHCO ₃	0,16
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,10	NaF	0,0024
MgCl ₂	8,80	Na ₂ SiO ₄	0,004
Peptona bakteriologikoa	5,00	Na ₂ SO ₄	3,24

Prestakuntza: Ur distilatu esterilean 55,1 g nahasi irakin arte, matrazeetan banatu, eta autoklabatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde. Erdira diluitutako Itsas Saldaren prestaketarako, bolumen jakinak eskatzen duen hautsaren pisuaren erdia erabili zen.

7. Eranskina: Irgalan beltzaz tindatutako iragazkien prestaketa

Osaketa l L ur distilatu		
Irgalan beltza hautsean	2 g	Azido azetikoa % 2

Prestakuntza: Disoluzioa osatu eta iragazkia likidoan utzi 2-24 orduz. Ur ditilatuaz garbitu, eta momentuan erabili ala iragazki-paperen artean gorde.

8. Eranskina: Müller-Hinton agarraren osaketa eta prestaketa. (Millpore, 70191)

Osaketa (g/ l ur distilatu) Amaierako pH: 7,4 ± 0,2			
Haragi-infusioa	2,00	Almidoia	1,50
Kaseina-peptona azidoa	17,50	Agarra	17,00

Prestakuntza: 1 l ur distilatu esterilean 38 g nahasi irakin arte, matrazeetan banatu, eta autoklabatu 121 °C-tan 15 minutuz. 4 °C-tan gorde.