

Microbiota bacteriana cultivable del erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus*, habitante de la zona mesofótica superior del cañón submarino de los Arcos, Puerto Vallarta

Cultivable bacterial microbiota of the sea urchin *Hesperocidaris asteriscus*, inhabitant of the upper mesophotic zone in the Los Arcos submarine canyon, Puerto Vallarta

Recepción del artículo: 30/05/2023 • Aceptación para publicación: 21/06/2023 • Publicación: 30/06/2023

● <https://doi.org/10.32870/ecucba.vi20.306>

Paola Berenice Hernández-Vázquez
Héctor Ocampo-Alvarez
Cristian Moisés Galván-Villa
Eduardo Ríos-Jara

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Ecología. Laboratorio de Ecosistemas Marinos y Acuicultura. Zapopan, Jalisco. México.

Amayaly Becerril-Espinosa*

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Ecología. Laboratorio de Ecosistemas Marinos y Acuicultura / CONAHCYT. Zapopan, Jalisco. México.

*Autor para correspondencia: amayaly9@gmail.com / abecerril@conahcyt.mx

Resumen

Los organismos marinos, como los erizos de mar, albergan bacterias simbiotas que producen metabolitos con actividad antibiótica. Estos metabolitos pueden conferir al hospedero un mecanismo de defensa contra patógenos, contribuyendo a su aptitud ecológica y pueden también ser utilizados con fines biotecnológicos.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar la microbiota cultivable del erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus* y analizarla en busca de cepas con actividad antibiótica. Las bacterias se aislaron en cuatro medios de aislamiento y la actividad antibiótica se evaluó por inhibición del crecimiento en tres patógenos: *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Como resultado se recuperaron 29 cepas con morfología colonial diferente y de estas nueve presentaron bioactividad contra al menos un patógeno. Cuatro de estas cepas bioactivas presentaron atributos morfológicos propios del phylum Actinobacteria. Se concluye que las bacterias bioactivas podrían contribuir en la defensa del erizo, al ser capaces de inhibir el crecimiento de patógenos. Sin embargo, es importante continuar esta línea de investigación hacia la búsqueda y caracterización de estos metabolitos, ya que podrían ser usados para el tratamiento de bacterias patógenas resistentes a los fármacos conocidos actualmente.

Palabras clave: Bioactividad, simbiosis, bacterias marinas, Echinoidea.

Abstract

Marine organisms, such as sea urchins, harbor symbiotic bacteria that produce metabolites with antibiotic activity. These metabolites can confer to the host a defense mechanism against pathogens, contributing to its ecological suitability, and can also be used for biotechnological purposes.

Considering the above, the objective of this work was to isolate the culturable microbiota of the sea urchin *Hesperocidaris asteriscus* and analyze it in search of strains with antibiotic activity. The bacteria were isolated in four isolation media and the antibiotic activity was evaluated by growth inhibition in three pathogens: *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. As a result, 29 strains with different colonial morphology were recovered and nine of these strains presented bioactivity against at least one pathogen. Four of these bioactive strains presented morphological attributes typical of the phylum Actinobacteria. It is concluded that bioactive bacteria could contribute to the defense of the sea urchin, by being able to inhibit the growth of its pathogens. However, it is important to continue this line of research towards the search and characterization of these metabolites, since they could be used for the treatment of pathogenic bacteria resistant to currently known drugs.

Keywords: Bioactivity, symbiosis, marine bacteria, Echinoidea

Introducción

Los erizos de mar pertenecen a la clase Echinoidea dentro del phylum Echinodermata. Se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats marinos someros muy diversos como los arrecifes rocosos y de coral (Spyksma *et al.*, 2022; Nozawa *et al.*, 2020), las praderas de pasto marino (Nadiarti *et al.*, 2021) y los bosques de macroalgas (Williams *et al.*, 2021). Los erizos también pueden ser habitantes de zonas profundas, aunque su densidad tiende a disminuir (Stevenson y Kroh 2020). Al ser organismos marinos bentónicos con muy poca movilidad, los erizos producen o bioacumulan compuestos químicos bioactivos. De hecho, los extractos orgánicos obtenidos de los erizos generalmente presentan actividad biológica de tipo antiinflamatoria (Jiao *et al.*, 2015, Sadek *et al.*, 2022), antitumoral (Liu *et al.*, 2006), antioxidante (Archana y Babu 2016), antimicrobiana (Sidiqi *et al.*, 2019), entre otras. Por ejemplo, del celoma del erizo verde *Strongylocentrotus droebachiensis* se han aislado péptidos de tipo estrogonilocinas, que tienen actividad contra bacterias Gram positivas y negativas como *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio anguillarum* (Haug *et al.*, 2002); Otro ejemplo es el extracto orgánico obtenido del erizo *Diadema antillarum* que presentó actividad antibiótica contra *S. aureus* y actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp., y *Rhizoctonia* sp. (Franco *et al.*, 2015).

Cabe destacar que los organismos marinos no siempre son los productores de los metabolitos con actividad biológica, si no que generalmente bioacumulan los compuestos bioactivos que producen sus microorganismos simbiotes (Abdelmohsen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Por ejemplo, el compuesto antitumoral tiocoralina descubierto en extractos orgánicos de corales, en realidad es producido por sus bacterias simbiotes del género *Micromonospora* (Lombó *et al.*, 2006). Actividad biológica similar se ha reportado también en esponjas (Mehbub *et al.*, 2014), peces (Moore *et al.*, 1999), entre otros organismos marinos.

Este patrón químico ecológico, en el que los simbiotes microbianos de organismos marinos producen metabolitos con actividad biológica, los

convertido en las nuevas dianas para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.

Los estudios de secuenciación masiva indican que la comunidad microbiana asociada a los erizos de mar contiene bacterias que le pueden conferir metabolitos clave al huésped para la defensa contra patógenos (Hakim *et al.*, 2016, 2019; Medina *et al.*, 2019). Además, se ha logrado aislar y evaluar la actividad biológica de las bacterias simbiotes de erizos, y se ha comprobado que hasta el 18% de las especies aisladas presentan actividad antagónica contra bacterias potencialmente patógenas (Laport *et al.*, 2018).

La búsqueda de las moléculas químicas responsables de la actividad biológica en las bacterias simbiotes de erizos ha dado importantes resultados. Algunas cepas del género *Bacillus* aisladas del tracto digestivo del erizo *Anthocidaris crassispina* producen bacillusamidas, que son compuestos con estructuras químicas derivadas de dicetopiperazida que presentan potente actividad antifúngica (Yonezawa *et al.*, 2011).

En Actinobacterias del género *Streptomyces* aisladas del erizo *Anthocidaris crassispina* se descubrieron metabolitos secundarios con estructuras químicas de aromáticos y con actividad antibacterial (Guo *et al.*, 2018a). Además, en la búsqueda de bacterias productoras de moléculas bioactivas, se han descubierto nuevos géneros y especies bacterianas que incrementan el conocimiento de la microbiota que habita en los erizos. Tal es el caso de las bacterias *Echinimonas agarilytica* y *Mariniflexile gromovii* aisladas del erizo *Strongylocentrotus intermedius* (Nedashkovskaya *et al.*, 2006, 2013). También especies nuevas relacionadas al phylum Firmicutes del género *Bacillus* como *B. berkeleyi* y *B. hemicentrotis* aisladas de los erizos *S. intermedius* y *Hemicentrotus pulcherrimus* respectivamente (Nedashkovskaya *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011).

Considerando lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar la microbiota marina cultivable del erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus* H.L. Clark, 1948 (Echinoidea: Cidaridae) en busca de cepas con actividad antibiótica.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Los Arcos es un área natural protegida por el Gobier-

no Federal Mexicano como zona de protección de la flora y fauna marina. Está localizada en Bahía de Banderas, a 10 Km en dirección sureste de Puerto Vallarta (20°,33" N; 105°,18.5" O). Presenta un cañón submarino con más de 1,400 m de profundidad (DOF, 1975). La zona mesofótica entre los 50 y 70 metros de profundidad de Los Arcos corresponde a una pared vertical, por observaciones de los buzos que realizaron la recolecta, el área se caracteriza por diversos organismos como esponjas y gorgonias. Entre las grietas y oquedades que se forman se pueden encontrar peces bentónicos, erizos de mar y otros invertebrados. La diversidad biológica de la zona aun es desconocida y diversos estudios científicos se desarrollan en la actualidad para dar a conocer la composición faunística de la zona.

Colecta de los erizos

Mediante buceo técnico con mezcla de gases Trimix, se recolectaron tres ejemplares del erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus* (Figura 1) a una profundidad de 50 m. Los organismos se depositaron en un cilindro de PVC con perforaciones para su transporte a la superficie. Una vez extraídos los organismos se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. La identidad taxonómica de los organismos se realizó

con los trabajos de Clark (1948), Mortensen (1951), Caso (1978) y la validación por expertos de la Colección Nacional de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Aislamiento de bacterias

En condiciones asépticas y de manera independiente se trabajó con los tres ejemplares. Los erizos se enjuagaron con agua de mar estéril, posteriormente se secaron en una campana de flujo laminar por 24 h. Una vez secos, se maceraron y se inocularon utilizando la técnica de estampado en placa, sobre dos medios de aislamiento M1 (0.2 g de peptona, 0.1g de almidón, 0.4 g de levadura, 0.1 de casaminoácidos, 18 g de agar, 1 l de agua de mar artificial), M2 (0.6 g de triptona, 0.1 g de casa aminoácidos, 0.3 g de glucosa, 18 g de agar, 1 l de agua de mar artificial). A los medios de aislamiento se les adicionó ciclohexamida (concentración de 100 µg ml⁻¹) para reducir la contaminación por hongos y se añadió un antibiótico gentamicina (Gen) o ampicilina (Amp) (concentración de 100 µg ml⁻¹) (Gontang *et al.*, 2007), dando un total de cuatro medios de aislamiento M1Amp, M1Gen, M2Amp y M2Gen. Una vez inoculadas, las placas de cultivo en medio sólido, se incubaron ocho semanas a 28 °C y se registró el número de colonias

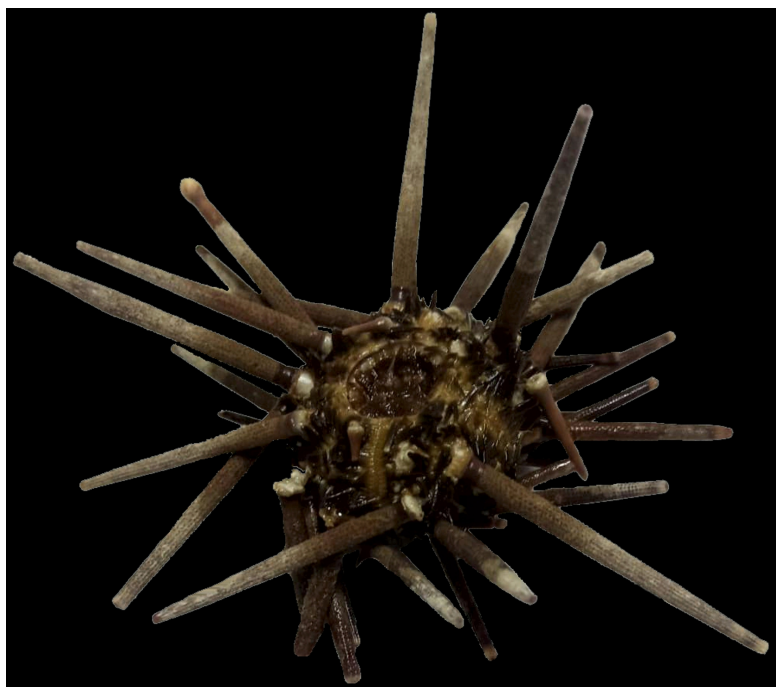


Figura 1. Erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus*.

observadas. Posteriormente, se aislaron todas las colonias bacterianas diferentes sobre medio de cultivo sólido A1 (2 g de peptona, 10 g de almidón, 4 g de levadura, 18 g de agar, 1 L de agua de mar natural) (Mincer et al., 2002). Para obtener cepas puras, los aislados se sembraron por estría cruzada por tres generaciones sobre medio de cultivo A1. Una vez puras, las cepas se codificaron con las letras CAE más un número consecutivo. Así mismo, se criopreservaron en glicerol al 15% a -70°C.

Atributos de las bacterias

Las cepas puras se cultivaron en medio de cultivo A1 por dos semanas a 28 °C. Posteriormente, se describió sus características morfológicas coloniales (color, presencia de hifas o de micelio, borde colonial, elevación, presencia de exudados, pigmentación del agar.) y microscópicas (bacilo, coco, hifa, otro). También se evaluaron algunas características bioquímicas de las cepas, tales como la reacción Gram con el método de KOH (Powers, 1995). Así mismo, se les determinó su actividad Catalasa y Oxidasa (MacFaddin, 2003). También se determinó su tolerancia a la salinidad a las concentraciones de 0% NaCl y 35% de NaCl.

Bioactividad de las bacterias

La bioactividad de las cepas aisladas de los erizos (CAE) se probó por la inhibición de crecimiento a tres cepas patógenas; dos Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y la

bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina. A partir del monocultivo de cada CAE se tomó una asada de una colonia bien definida y se cultivó en 50 mL de medio de cultivo líquido A1 a 210 rpm, 28 °C por 5 días. Las cepas patógenas se cultivaron en medio LB (10 g bactopectona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl) a 210 rpm y 28 °C por 24 hrs.

Se realizó el bioensayo en cajas petri con medio de cultivo sólido LB dividido en cuatro cuadrantes. Se tomó una alícuota de 100 µL de la cepa patógena y se inoculó de forma masiva con la ayuda de un rastrillo sobre medio de cultivo LB, en seguida en el centro de cada cuadrante se colocó 10 µL de la CAE a probar. Como control negativo se utilizó 10 µL de medio de cultivo LB. Las cajas se incubaron a 28°C por 48 hrs. Posteriormente, se midió el diámetro de la colonia de CAE y el diámetro del halo de inhibición. El valor de la inhibición real de crecimiento se calculó con la siguiente ecuación, donde A = diámetro de la colonia activa, E = diámetro del halo de inhibición e I = inhibición real.

$$I = \frac{(E - A)}{2}$$

Resultados

Abundancia de bacterias presentes en el erizo

Se observaron entre 50-160 colonias bacterianas diferentes en los medios de aislamiento. El medio con mayor número de colonias diferentes fue M2 con ampicilina, donde se observó tres veces más colonias que en el medio con gentamicina (Figura 2). Es importante resaltar que muchas de las colonias

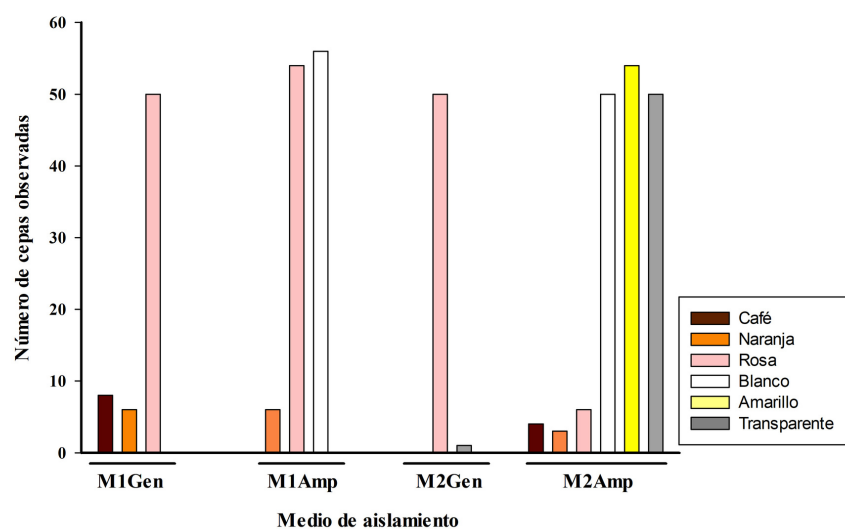


Figura 2. Número de colonias observadas por caja de medio de aislamiento. El color de la barra representa el color de la colonia observada sobre medio de cultivo A1.

que crecieron en el medio M2Amp fueron de color blanco, amarillo y transparente de rápido crecimiento. Estas bacterias invadieron las cajas de medio, lo que limitó el aislamiento de las colonias con menor abundancia y de lento crecimiento como fueron las colonias de color café, naranja y rosa. En este sentido, el medio M1 con gentamicina fue el más adecuado para aislar bacterias de lento crecimiento, debido a que presentó colonias separadas y delimitadas.

Atributos bacterianos

Se aislaron 29 cepas con morfología colonial diferente, se describieron sus atributos (Figura 3) y bioactividad (Tabla 1). Considerando su descripción morfológica colonial, el 83% de las cepas presentaron consistencia cremosa y diferentes colores. El 17% restante de las cepas presentaron una consistencia dura con tonalidades naranja o café. Considerando su pared celular, casi el doble de las cepas analizadas (1.9 veces, 19 cepas) estuvieron representadas por bacterias Gram positivas (Figura 3A). El 42 % de las cepas Gram positivas fueron oxidasa y catalasa negativo, y el 47% fueron oxidasa negativo y catalasa positivo (Figura 3B). Respecto a las bacterias Gram negativas, el 80% de las cepas fueron oxidasa negativo y catalasa positivo (Figura 3C). Según su morfología microscópica se observaron cocos, bacilos y otros (hifas, estreptobacilos), tanto en las bacterias Gram positivas como en las Gram negativas (Figura 3BC). Con rela-

ción a su capacidad de tolerancia a la salinidad, todas las cepas crecieron en ausencia y presencia de salinidad (0 y 33% de NaCl). Es interesante resaltar que dentro de las bacterias Gram positivas el 17 % (5 cepas) presentaron características morfológicas microscópicas de hifas con esporas y sus características macroscópicas fueron colonias duras con borde irregular, elevadas, con apreciable micelio sustrato, con tonalidades de color café, naranja y algunas pigmentaron el agar, características típicas de bacterias relacionadas a la familia *Micromonosporacea* (phylum Actinobacteria).

Actividad antibiótica

A las 29 cepas aisladas se les determinó su bioactividad contra tres bacterias patógenas, de estas el 31% (9 cepas) presentaron bioactividad contra al menos un patógeno. El 7% de las cepas (CAE14 y CAE46) produjeron inhibición de crecimiento a los tres patógenos probados. El 3% representado por la cepa CAE3, fue bioactiva contra dos patógenos *S. aureus* y *E. coli* (Cuadro 1).

Discusión

En este trabajo se logró el aislamiento de 29 cepas bacterianas puras a partir del erizo de mar *Hesperocidaris asteriscus* colectado a una profundidad de 50 m en Bahía Banderas, Jalisco.

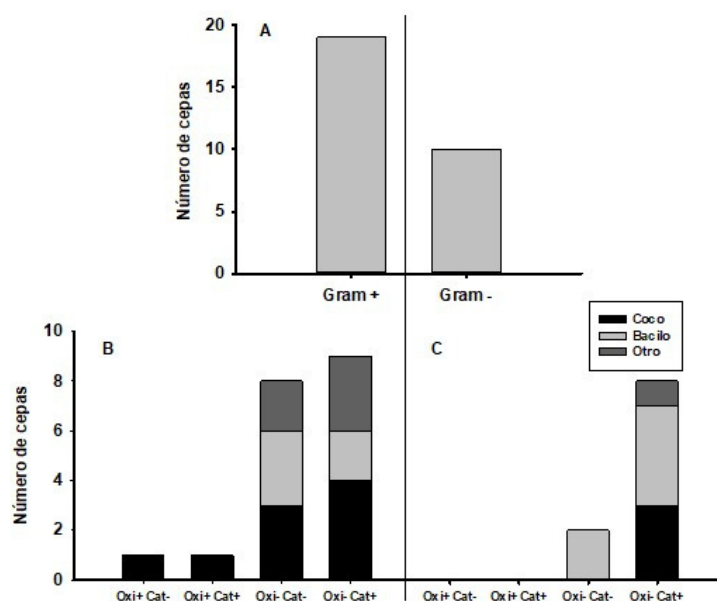


Figura 3. Atributos de CEA representativas. A) Se indica número de cepas Gram positivo y negativo; B y C) morfología microscópica (coco, bacilo, otro), oxidasa (Oxi), catalasa (Cat).

Estas bacterias fueron descritas por sus atributos morfológicos y bioquímicos. Así como su bioactividad contra bacterias patógenas multirresistentes a los antibióticos que actualmente están en uso farmacológico actual. Este primer esfuerzo de recuperación de las bacterias cultivables representa una línea base para continuar con la evaluación de otras características aprovechables biotecnológicamente, que son hoy en día una de las dianas de la bioprospección marina. Aunque no está de todo claro el papel de estos microorganismos en el erizo, el genoma de las bacterias contiene un gran potencial biosintético, que les permitiría tener un rol ecológico muy importante. Estas participan en la asimilación de nutrientes, pueden descomponer macromoléculas facilitando la digestión y asimilación de los alimentos del erizo, además de ayudar a la inmunidad, el desarrollo y el metabolismo de los erizos (Lawrence *et al.*, 2013). Mas aún, los microorganismos pueden formar simbiosis específicas con los erizos y modular o activar ciertas rutas biosintéticas para la biosíntesis de un compuesto determinado (Carrier *et al.*, 2021).

En este sentido, el haber descubierto que nueve de las 29 cepas aisladas en esta especie de erizo fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos un patógeno multirresistente de los probados, demuestra su potencial biotecnológico y para futuras investigaciones. Se puede hipotetizar que al menos estas nueve bacterias producen compuestos antibióticos o moduladores que le confieren un mecanismo de defensa contra patógenos. El papel ecológico de los microorganismos como defensa, se ha observado en la microbiota del erizo punta de

lápiz *Eucidaris* sp. de zonas someras, donde las bacterias aisladas con mayor abundancia como las *Pseudoalteromonas* sp. son productoras de compuestos con actividad antibacteriana (Atencio *et al.*, 2018; Fofied *et al.*, 2018). Otro ejemplo, es el erizo *Anthocidaris crassispina* del cual se han aislado actinobacterias formadoras de hifas y esporas relacionadas al género *Streptomyces* sp., que biosintetizan metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, que es uno de los mecanismos utilizados para el tratamiento de la degeneración neuronal en las enfermedades de Alzheimer o el Parkinsons (Guo *et al.*, 2018b).

Por otra parte, actualmente existe una necesidad mundial de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades provocadas por patógenos que ya han desarrollado resistencia a los antibióticos actuales. Con este enfoque, las bacterias simbiotes de organismos marinos se han convertido en blanco de muchos estudios de bioprospección ya que estas bacterias están adaptadas a vivir en condiciones de alta competencia por nutrientes y espacio dentro del erizo, además de condiciones ambientales extremas dentro y fuera del erizo, tales como la temperatura, el estrés salino y la presión hidrostática. En particular cuando se analizan ejemplares de esta especie de erizo provenientes de la zona mesofótica superior, que es un ambiente más extremo que la zona somera, ya que existen condiciones de poca luz y menor temperatura, por lo que podrían tener una microbiota simbiote distinta a las poblaciones de aguas someras. En este sentido en el erizo *H. asteriscus* se recuperaron cepas que presentaron atributos propios de Actinobacterias de la familia

Cuadro 1 Actividad antibiótica. Se indica el valor de la inhibición real de crecimiento en mm.

| Cepa | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|---------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| CAE 3* | 0.6 | 0.4 | 0 |
| CAE 4* | 0 | 0 | 1.5 |
| CAE 5 | 0 | 0 | 0.95 |
| CAE 8 | 0 | 0.7 | 0 |
| CAE 13 | 0 | 0 | 1.0 |
| CAE 14* | 0.9 | 0.4 | 1.0 |
| CAE 25 | 0.7 | 0 | 0 |
| CAE 46* | 0.6 | 0.7 | 0.5 |
| CAE 47* | 0 | 0.8 | 0 |

* pertenecen al phylum Actinobacteria

Micromonosporacea, y pueden estar relacionadas con los géneros *Micromonospora* o *Verrucosipora* (Becerril *et al.*, 2013). Estos géneros son reconocidos como productores de compuestos con actividad antibiótica, antifúngica y anticáncer (Cardoso *et al.*, 2015; Íñiguez-Martínez *et al.*, 2016).

Conclusión

Las bacterias aisladas y descritas en este trabajo representan una fuente inicial de estudio para su potencial aprovechamiento biotecnológico, principalmente relacionados a su bioactividad contra los patógenos probados. Además, esta gran bioactividad contra patógenos nos indica que estas bacterias podrían estar desempeñando en el erizo la función ecológica de defensa contra patógenos. Biotecnológicamente, estas cepas de bacterias son de gran valor, ya que fueron obtenidas de erizos a una profundidad de 50 m, lo cual es una zona de difícil acceso, con condiciones ambientales distintas a la zona somera (<20 m) y de donde se conoce poco de los procesos biológicos que ahí se desarrollan, por lo que los organismos que se encuentran en estas profundidades podrían ser fuente de variación en la producción de metabolitos con estructuras químicas sin precedentes. Estos metabolitos nuevos podrían contribuir al tratamiento de infecciones microbianas actuales, en donde los microbios están generando una resistencia a los antibióticos que se encuentran en el mercado actual.

Agradecimientos

Al programa Investigadoras e Investigadores por México del CONAHCyT 2196 otorgado a ABE. A la UdeG por los PROSNI-2023 a ABE y HOA. También a JL. Arreola, A. Sánchez y A. Otegui por el apoyo en la recolecta. AF. Solís Marin por su ayuda con la determinación de la especie de erizo.

Literatura citada

- Abdelmohsen, U.R., Bayer, K., y Hentschel, U. (2014). Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Natural Product Reports*, 31, 381-399. <https://doi.org/10.1039/C3NP70111E>
- Archana, A., y Babu, K.R. (2016). Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*. *Food chemistry*, 197, 597-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.003>
- Atencio, L.A., Dal Grande, F., Young, G.O., Gavilán, R., Guzmán, H.M., Schmitt, I., Mejía, L.C. y Gutiérrez, M. (2018). Antimicrobial-producing *Pseudoalteromonas* from the marine environment of Panama shows a high phylogenetic diversity and clonal structure. *Journal of Basic Microbiology*, 58, 747-769. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800087>
- Becerril-Espinosa, A., Freel, K.C., Jensen, P.R., y Soria-Mercado, I.E. (2013). Marine Actinobacteria from the gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 809-819. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9863-3>
- Cardoso-Martínez, F., Becerril-Espinosa, A., Barrila-Ortíz, C., Torres-Beltrán, M., Ocampo-Alvarez, H., Iñiguez-Martínez, A.M., y Soria-Mercado, I.E. (2015). Antibacterial and cytotoxic bioactivity of marine actinobacteria from Loreto Bay national park, México. *Hidrobiológica*, 25, 223-229.
- Carrier, T.J., Leigh, B.A., Deaker, D.J., Devens, H.R., Wray, G.A., Bordenstein, S.R., Byrne, M., y Reitzel, A.M. (2021). Microbiome reduction and endosymbiont gain from a switch in sea urchin life history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2022023118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022023118>
- Caso, M. E. (1978). Los Equinodermos del Pacífico de México. Parte Primera-Órdenes Cidaroida y Aulodonta. Parte segunda-Órdenes Stiridonta y Camarodonta. Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Publicaciones especiales 1: 1-244.
- Chen, Y.G., Zhang, Y.Q., He, J.W., Klenk, H.P., Xiao, J.Q., Zhu, H. Y., Tang S.K., y Li, W.J. (2011). *Bacillus hemicentroti* sp. nov., a moderate halophile isolated from a sea urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2950-2955. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026732-0>
- Clark, H. L. (1948). A report of the echini of the warmer eastern Pacific, based on the collection of the Velero III. *Allan Hancock Pacific Expeditions*. 8(ii-xii): 225-352.
- DOF 1975, Diario Oficial de la Federación, México, D. F., a 16 de julio de 1975.- ACUERDO que establece como zona de refugio para la protección de la flora y fauna marinas, las aguas comprendidas en "Los Arcos", Jalisco. El Secretaria de Industria y Comercio, José Campillo, Sáinz. -Rúbrica. Recuperado de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4785822&fecha=28/07/1975#gsc.tab=0
- Fofied, S.K.S., Sabdon, A., y Wijayanti, D.P. (2018). Potential bacterial symbiont of sea urchin as a multi-drug resistant (MDR) antibacterial agent against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 23, 131-136. <https://doi.org/10.14710/ik.ijms.23.3.131-136>
- Franco, P.O., Santafé-Patiño, G., y Angulo-Ortiz, A. (2015). Actividad antibacteriana y antifúngica de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* (Valvatida: Oreasteridae) y de los erizos de mar *Mellita quinquesperforata* (Clypeasteroidea: Mellitidae) y *Diadema antillarum* (Diadematoida: Diadematidae) del Caribe Colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 63, 329-337. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23167>
- Gontang, E.A., Fenical, W., y Jensen, P.R. (2007). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3272-3282. <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-06>
- Guo, Z.K., Wang, R., Chen, S.Q., Chen, F.X., Liu, T.M., y Yang, M.Q. (2018a). Anthocidin A-D, New 5-Hydroxyanthranilic Acid Related Metabolites from the Sea Urchin-Associated Actinobacterium, *Streptomyces* sp. HDa1. *Molecules*, 23, 5, 1032. <https://doi.org/10.3390/molecules23051032>

- Guo, Z.K., Wang, R., Chen, F.X., Liu, T.M., y Yang, M.Q. (2018b). Bioactive aromatic metabolites from the sea urchin-derived actinomycete *Streptomyces spectabilis* strain HDa1. *Phytochemistry Letters*, 25, 132-135. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.04.014>
- Hakim, J.A., Koo, H., Kumar, R., Lefkowitz, E.J., Morrow, C.D., Powell, M.L., Watts, S.A., Bej, A.K., (2016). The gut microbiome of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, from its natural habitat demonstrates selective attributes of microbial taxa and predictive metabolic profiles, *FEMS Microbiology Ecology*, 92, fiw146. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw146>
- Hakim, J.A., Schram, J.B., Galloway, A.W., Morrow, C.D., Crowley, M.R., Watts, S.A., y Bej, A.K. (2019). The purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* demonstrates a compartmentalization of gut bacterial microbiota, predictive functional attributes, and taxonomic co-occurrence. *Microorganisms*, 7, 35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020035>
- Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M., y Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 94-102. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00153-2)
- Íñiguez-Martínez, A.M., Cardoso-Martínez, F., De la Rosa, J., Cueto, M., Díaz-Marrero, A., Darías, J., Becerril-Espinosa, A., Plata-Rosas, L.J., y Soria-Mercado, I.E. (2016). Compuestos aislados de *Salinispora arenicola* del Golfo de California, México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 51, 161-170. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100015>
- Jiao, H., Shang, X., Dong, Q., Wang, S., Liu, X., Zheng, H., y Lu, X. (2015). Polysaccharide constituents of three types of sea urchin shells and their anti-inflammatory activities. *Marine Drugs*, 13, 5882-5900. <https://doi.org/10.3390/md13095882>
- Laport, M.S., Bauwens, M., Collard, M., y George, I. (2018). Phylogeny and antagonistic activities of culturable bacteria associated with the gut microbiota of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Current Microbiology*, 75, 359-367. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1389-5>
- Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., y Watts, S.A. (2013). Feeding, digestion and digestibility of sea urchins, p. 135-154. In *Developments in aquaculture and fisheries science*, v. 38. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00009-5>
- Liu, C., Ye, L., Lin, Q., Xi, T., Xing, Y., y Gao, Y. (2006). Studies on preparation and anti-tumor activity of the polysaccharide from the eggs of *Strongylocentrotus Nudus* (SEP). *Pharmaceutical Biotechnology - Beijing*, 13, 429.
- Liu, T., Wu, S., Zhang, R., Wang, D., Chen, J., y Zhao, J. (2019). Diversity and antimicrobial potential of Actinobacteria isolated from diverse marine sponges along the Beibu Gulf of the South China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 95, fiz089. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz089>
- Lombó, F., Velasco, A., Castro, A., De la Calle, F., Braña, A.F., Sánchez-Puelles, J.M., Méndez, C. y Salas, J.A. (2006). Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *ChemBioChem*, 7, 366-376. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500325>
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Medina, D.A., Suárez, R., y Godoy, M. (2019). Microbial diversity of the red sea urchin *Loxechinus albus* during controlled farming in Puerto Montt, Chile, using 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Microbiol Resour Announc*. 8, e00851-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00851-19>
- Mehub, M.F., Lei, J., Franco, C., y Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, 12, 4539-4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>

- Mincer, T., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., y Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5005–5011. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5005-5011.20>
- Moore, B.S., Trischman, J.A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P.R., y Fenical, W. (1999). Salinamides, antiinflammatory depsipeptides from a marine Streptomyces. *The Journal of Organic Chemistry*, 64, 1145–1150. <https://doi.org/10.1021/jo9814391>
- Moree, W.J., McConnell, O.J., Nguyen, D.D., Sanchez, L.M., Yang, Y.-L., Zhao, X., Liu, W.-T., Boudreau, P.D., Srinivasan J., Atencio L. Ballesteros, J., Gavilán, R.G., Torres-Mendoza, D., Guzmán H.M., Gerwick, W.H., Gutiérrez, M., Dorrestein, P.C., et al. (2014). Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent manner. *ACS Chemical Biology*, 9, 2300–2308. <https://doi.org/10.1021/cb500432j>
- Mortensen, T. (1951). A Monograph of the Echinoidea. V, 2. Spatangoida II. Amphisternata II. Spatangidae, Loveniidae, Pericosmidae, Schizasteridae, Brissidae, 593 pp., C. A. Reitzel, Copenhagen.
- Nadiarti, N., La Nafie, Y.A., Priosambodo, D., Umar, M.T., Rahim, S.W., Inaku, D.F., Musfirah, N.H., Paberu, D.A., y Moore, A.M. (2021). Restored seagrass beds support Macroalgae and Sea Urchin communities. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 860, 1, 012014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/860/1/012014>
- Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Kwak, J., Mikhailov, V.V., y Bae, K.S. (2006). *Mariniflexile gromovii* gen. nov., sp. nov., a gliding bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1635–1638. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64293-0>
- Nedashkovskaya, O.I., Stenkova, A.M., Zhukova, N.V., Van Trappen, S., Lee, J.S., y Kim, S.B. (2013). *Echinimonas agarilytica* gen. nov., sp. nov., a new gamma proteobacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 69–77. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9787-y>
- Nedashkovskaya, O.I., Van Trappen, S., Frolova, G.M., y De Vos, P. (2012). *Bacillus berkeleyi* sp. nov., isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Archives of Microbiology*, 194, 215–221. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0771-0>
- Nozawa, Y., Lin, C. H., y Meng, P. J. (2020). Sea urchins (diadematids) promote coral recovery via recruitment on Taiwanese reefs. *Coral Reefs*, 39, 1199–1207. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-01955-1>
- Powers, E.M. (1995). Efficacy of the Ryu non-staining KOH technique for rapidly determining gram reactions of foodborne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3756–3758. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3756-3758.1995>
- Sadek, S.A., Hassanein, S.S., Mohamed, A.S., Soliman, A.M., y Fahmy, S.R. (2022). Echinochrome pigment extracted from sea urchin suppress the bacterial activity, inflammation, nociception, and oxidative stress resulted in the inhibition of renal injury in septic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 46, e13729. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13729>
- Sidiqi, F.M., Pringgenies, D., y Setyati, W.A. (2019). Antibacterial activity of gonad methanol extract of the sea urchin *Diadema setosum* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 246, p. 012040. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012040>
- Spysma, A.J., Miller, K.I., y Shears, N.T. (2022). Diver-generated photomosaics as a tool for monitoring temperate rocky reef ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1314. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.953191>
- Stevenson, A., y Kroh, A. (2020). Deep-sea sea urchins. In *Developments in aquaculture and fisheries science*, 43, 237–254. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00014-7>
- Williams, J.P., Claisse, J.T., Pondella II, D.J., Williams, C.M., Robart, M.J., Scholz, Z., Jaco, E.M., Ford, T., Burdick, H., y Witting, D. (2021). Sea urchin mass mortality rapidly restores kelp forest communities. *Marine Ecology Progress Series*, 664, 117–131. <https://doi.org/10.3354/meps13680>
- Yonezawa, K., Yamada, K., y Kouno, I. (2011). New Diketopiperazine Derivatives Isolated from Sea Urchin-Derived *Bacillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59, 106–108. Doi: 10.1248/cpb.59.106