

Urgencia y mecanismo de biosíntesis de metabolitos secundarios microbianos marinos

Kindly Shmuel

Universidad Tecnológica De Panama

Email: kindly3@gmail.com

Resumen

El microorganismo marino es uno de los recursos potenciales biológicamente activos de metabolitos secundarios. Su potencia es tan prometedora que el conocimiento de cómo se produjo su metabolito secundario debe estudiarse y recopilarse. Esos conocimientos permitirán seguir estudiando la mejora de la producción de metabolitos secundarios en el laboratorio. En la naturaleza, la síntesis de metabolitos secundarios ocurre cuando hay un efecto de factores bióticos y abióticos, como el agua de mar y la simbiosis de microbios con otros materiales vivos. Cuando esto se explica en las vías metabólicas, la síntesis de metabolitos secundarios se ve afectada por los nutrientes disponibles y regulada por moléculas autoinductoras a través del mecanismo de detección de quórum.

Palabras clave: autoinductor, microorganismo marino, quorum-sensing, metabolito secundario, simbiótico



A. INTRODUCCIÓN

El mar es una de las fuentes de riqueza biológica y química. Una de las fuentes de riqueza biológica y química se puede obtener de las bacterias marinas. Aunque las bacterias marinas constituyen una pequeña porción de la vida marina, una célula de bacterias marinas contiene miles de compuestos químicos potenciales para medicamentos, suplementos nutricionales, cosméticos, agroquímicos, sondas químicas y enzimas. Generalmente estos compuestos químicos potenciales provienen de metabolitos secundarios microbianos.

Los metabolitos se clasifican en dos, a saber, metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios formados en cantidades limitadas son esenciales para el crecimiento y la vida de los seres vivos. Los metabolitos secundarios no se utilizan para el crecimiento y se forman a partir de metabolitos primarios en condiciones de estrés. Ejemplos de metabolitos secundarios son antibióticos, pigmentos, toxinas, efectores de competencia ecológicos y de simbiosis, feromonas, inhibidores de enzimas, agentes inmunomoduladores, receptores antagonistas y agonistas, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento animal y vegetal.

Hay varias hipótesis sobre la función de los metabolitos secundarios para los productores de metabolitos secundarios, como la supervivencia de bacterias, hongos, insectos y animales a través de la producción de antibióticos y antiincrustantes (Gudbjarnason 1999). Además, los metabolitos secundarios también desempeñan un papel en la mejora de la vida microbiana de los productores de metabolitos secundarios

cuando compiten con otras especies (Tabarez 2005). Hay 5 razones para fortalecer esto (Tabarez 2005). Primero, los metabolitos secundarios actúan como mecanismos de defensa alternativos para que los organismos deficientes en el sistema inmunológico produzcan abundantes y variados metabolitos secundarios. En segundo lugar, los metabolitos secundarios tienen una estructura y un mecanismo de trabajo sofisticados y sus vías metabólicas son complejas y energéticamente costosas. Tercero, los metabolitos secundarios actúan cuando hay competencia con microbios, plantas o animales. Cuarto, los metabolitos secundarios son producidos por un grupo de genes biosintéticos. En quinto lugar, la producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica suele ir acompañada de esporulación y se produce en células microbianas que son sensibles a microbios, plantas o animales. Generalmente, estos microbios sensibles necesitan una protección especial cuando sus nutrientes comienzan a agotarse.

La formación de metabolitos secundarios está regulada por la nutrición, la disminución de la tasa de crecimiento, el control de retroalimentación, la inactivación de enzimas y la inducción de enzimas. Las limitaciones nutricionales y la disminución de la tasa de crecimiento producirán señales que tienen un efecto regulador que da como resultado la diferenciación química (metabolitos secundarios) y la diferenciación morfológica (morfogénesis) (Demain 1998). Esta señal es un inductor de bajo peso molecular que actúa como control negativo por lo que en condiciones normales (crecimiento rápido y nutrición adecuada) impide la formación de metabolitos secundarios y la morfogénesis. A diferencia de los metabolitos primarios, las vías de los metabolitos secundarios no se comprenden ampliamente. Por lo tanto, en este artículo de revisión intentaremos discutir la aparición de metabolitos secundarios en la naturaleza y los factores que influyen en el mecanismo de biosíntesis de metabolitos secundarios de microbios marinos.

B. MÉTODO

Este estudio utilizó un enfoque cualitativo mediante la recopilación de datos con un estudio de la literatura sobre urgencia y mecanismo de biosíntesis de metabolitos secundarios microbianos marinos. Luego, los datos se analizan y analizan para producir un marco de investigación.

C. RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los resultados de la exploración de metabolitos secundarios han demostrado que las bacterias marinas son una de las fuentes potenciales de metabolitos secundarios. Según su forma de vida, las bacterias productoras de metabolitos secundarios pueden derivar de bacterias de vida libre, bacterias sedimentarias que se encuentran en sedimentos, bacterias asociadas con superficies de algas o bacterias asociadas con invertebrados (Burgess et al, 1999). Con base en los resultados de investigaciones previas, generalmente las bacterias que viven de forma asociada con la vida marina muestran un

gran potencial en la secreción de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas (Burgess et al, 1999; Armstrong et al, 2001; Yan et al, 2003) . Las bacterias que viven en contacto con ciertas partículas producen metabolitos secundarios de 5 a 10 veces más que las bacterias de vida libre (Long 2001). Un ejemplo de una bacteria que produce un metabolito secundario del mar es la especie AH1 de *Actinopolyspora* obtenida de sedimentos marinos y que muestra actividad antimicrobiana (Kokare et al, 2003). Las bacterias epibióticas extraídas de *Petrosia ficiformis* pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias marinas in vitro (Chelossi et al, 2004). *Pseudoalteromonas piscicida* asociada con la esponja *Hymeniacidon perleve* produce el compuesto norharman (un alcaloide betacabolin) que tiene actividad antimicrobiana (Zheng et al, 2005).

En general, la estructura química de los productos marinos suele ser diferente de la de los metabolitos secundarios terrestres, especialmente en la halogenación con bromo o cloro (Gudbjarnason 1999). Estas diferencias están influenciadas por el entorno marino único. Según Okami (1982), existen 3 hechos que prueban que el medio marino es único. Primero, el agua de mar contiene una variedad de sustancias biológicamente activas, como vitaminas, y muchos microorganismos marinos son capaces de producir vitaminas. En segundo lugar, el agua de mar contiene agentes inhibidores activos para el organismo. Algunos factores que ilustran este hecho son que el agua de mar tiene la capacidad de inhibir las bacterias grampositivas, el agua de mar natural es más inhibidora que el agua de mar artificial, el agua de mar que ha recibido un tratamiento térmico muestra una reducción en la actividad inhibidora en comparación con el agua de mar dulce, la actividad inhibidora del agua de mar es no se debe a la faga ni a la salinidad sino a que existen agentes antibacterianos en el agua de mar. En tercer lugar, algunos microorganismos aislados del agua de mar muestran actividad antibacteriana.

La simbiosis entre microbios e invertebrados es una regla utilizada por los microbios para producir qué tipo de metabolitos secundarios se producirán (Thakur et al, 2003). Generalmente, los invertebrados marinos utilizan los metabolitos secundarios producidos por microbios para combatir otros organismos. Con base en lo anterior se obtuvo un nuevo concepto que establece que la simbiosis que produce metabolitos secundarios puede desencadenarse debido a barreras ambientales bióticas. El modelo utilizado para explicar este concepto es una simbiosis bacteriana con una esponja.

Al principio, el metabolito secundario de las células completa la protección contra el ataque microbiano o eucariota (primera protección directa), por ejemplo, los compuestos acetilénicos. Además, las esponjas también pueden producir metabolitos secundarios en forma de proteínas que pueden resistir el crecimiento bacteriano (protección con el sistema inmunitario), por ejemplo, perforina (Thakur et al, 2003) y taquilectina (Schroder et al, 2003). Funcionalmente, estos compuestos actúan como moléculas de defensa. Debido a la interacción de los metabolitos secundarios producidos con las bacterias asociadas a las esponjas, es posible que las bacterias sean inducidas a

producir un metabolito secundario. Los metabolitos secundarios resultantes tienen varias funciones, por ejemplo, funcionan en el sistema de defensa y activan vías importantes para la autodefensa (activadores de metabolitos). Un ejemplo de un metabolito secundario bacteriano es el ácido okadaico (ácido okadaico) que es producido por bacterias en la esponja *Suberites domuncula*. El ácido okadaico actúa como una molécula de defensa contra el ataque de metazoos extraños y, al mismo tiempo, es una modulación positiva de esta vía para mejorar la respuesta inmune de las células huésped (Wiens et al, 2003). Las bacterias que viven en la superficie de las células huésped esponjosas producen metabolitos secundarios específicos para combatir ciertas bacterias (protección indirecta), por ejemplo, compuestos antiincrustantes (Thakur et al, 2003) y compuestos de tribromofenol (Clare et al, 1999). Ejemplos de metabolitos secundarios producidos como resultado de la simbiosis entre esponjas y bacterias u hongos, bacterias u hongos también son inducidos a producir metabolitos secundarios tales como cribrostatina o sorbicilactona.

Además de microbios de simbiosis esponjosa, también simbiosis con algas como el alga verde *Enteromorpha linza* simbiosis con la bacteria *Flavobacterium* spp. y *Cytophaga* spp. (Shiba y Taga 1980). *E. linza* produce productos extracelulares que son absorbidos por *Flavobacterium* spp. y *Cytophaga* spp. que componen biopelículas sobre las algas. La bacteria del pigmento verde *Pseudoalteromonas tunicata*, que también forma biopelículas, puede producir compuestos inhibidores específicos contra bacterias, algas, hongos, y larvas de invertebrados (Prochnow et al, 2004).

Los metabolitos primarios pueden aumentar la producción de metabolitos secundarios. En los microbios marinos, las condiciones ambientales con nutrición limitada significan que el uso de carbono por parte de los microbios marinos en el metabolismo celular no se usa para el crecimiento celular, sino que el carbono disponible se usará para la producción de metabolitos secundarios. Los experimentos de Barry y Wainwright (1997) demostraron que la adición de precursores de metabolitos primarios puede aumentar los metabolitos secundarios. Los precursores de metabolitos primarios utilizados fueron \pm -cetoglutarato, ²-cetoglutarato, glucosa y oxaloacetato. Se inocularon bacterias marinas J292/97 en varios medios, a saber, caldo marino Difco (MB), MB diluido 10X (MB 1: 9), MB 1: 9 suplementado con 0,1 % \pm -cetoglutarato, MB 1: 9 suplementado con 0,1 %² -cetoglutarato, MB 1:9 suplementado con glucosa al 0,1%, MB 1:9 suplementado con oxaloacetato al 0,1%. Los medios de crecimiento complementados con precursores del ciclo TCA (ácido tricarbóxico), a saber, \pm -cetoglutarato y oxaloacetato, inducirán compuestos que tienen actividad antimicrobiana. *Pseudomonas fluorescens* HV37a sintetiza antibióticos en presencia de glucosa (Gutterson et al, 1988). Además, los medios MB diluidos 10x (MB 1: 9) suplementados con glucosa al 0,1 % también pueden inducir compuestos antibacterianos de *Alteromonas* sp. K10 y *Bacillus* sp. K11.

El nitrógeno también juega un papel en la producción de metabolitos secundarios microbianos. En condiciones limitadas de nitrógeno, se requiere ppGpp sintetasa (RelA)

asociada con los ribosomas para la producción de antibióticos por *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (Chakraborty & Bibb 1997). Esta condición también es necesaria para la producción de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* (Jin et al, 2004). Sin embargo, el mecanismo de producción de antibióticos impulsado por ppGpp aún no está claro.

La biosíntesis de metabolitos secundarios como los antibióticos también está influenciada por la disponibilidad de fosfato (Martin 2004). Generalmente, la producción de metabolitos secundarios ocurre en condiciones limitadas de fosfato. Los componentes que juegan un papel son el sistema PhoR-PhoP. PhoR es el sensor de proteína quinasa de membrana estándar. PhoP es una proteína miembro reguladora de respuesta unida al ADN. PhoP también juega un papel en el control del gen de la fosfatasa alcalina (PhoP). Si hay una inactivación del regulador de respuesta PhoP o una delección del sistema PhoR-PhoP, provoca una alta expresión de actinohordina y undesilprodigosina en *S. coelicolor* y *S. lividans*. El mecanismo de cascada propuesto relacionado con el efecto negativo de la fosforilación de PhoP en la expresión de AfsS se muestra en la Figura 2 (Martin 2004). La expresión de los genes *act* (actinorhodin) y *red* (undesilprodigosin) fue regulada positivamente por activadores de transcripción específicos, ActII-ORF4 y RedD. AfsS indujo la producción de ActII-ORF4 y RedD. La alta expresión de AfsS provocará una alta expresión de ActII-ORF4 y RedD, de modo que también habrá una alta expresión de Act y Red. AfsS está regulado por el sistema PhoR-PhoP. AfsS es reprimido por el sistema PhoR-PhoP cuando PhoP está en un estado fosforilado (PhoP ~ P).

S. coelicolor y *S. lividans*. El mecanismo de cascada propuesto está relacionado con el efecto negativo de la fosforilación de PhoP en la expresión de AfsS. La expresión de los genes *act* (actinorhodin) y *red* (undesilprodigosin) fue regulada positivamente por activadores de transcripción específicos, ActII-ORF4 y RedD. AfsS indujo la producción de ActII-ORF4 y RedD. La alta expresión de AfsS provocará una alta expresión de ActII-ORF4 y RedD, de modo que también habrá una alta expresión de Act y Red. AfsS está regulado por el sistema PhoR-PhoP. AfsS es reprimido por el sistema PhoR-PhoP cuando PhoP está en un estado fosforilado (PhoP ~ P).

La regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios con un sistema de detección de quórum. La detección de quórum es la regulación de la expresión génica que depende de la densidad celular. En general, las bacterias gramnegativas utilizan el mecanismo de detección de quórum. Las bacterias producen moléculas de señal que pueden difundirse hacia fuera y hacia el interior de las células. Esta molécula se conoce generalmente como autoindusora. El autoinductor que se encuentra en las bacterias gramnegativas es la acilación de homoserina de lactona (AHL). El modelo de detección de quórum se muestra mediante la simbiosis de bacterias marinas, *Photobacterium fischeri*, con peces o calamares (Gonzalez & Marketon 2003). AHL se forma a partir de acil-ACP y SAM (S-adenosilmetionina) con la ayuda de la enzima AHL sintasa codificada por el gen LuxI. El aumento de la densidad celular provoca la acumulación de AHL, lo

que a su vez hace que LuxR se active porque AHL se unirá a LuxR. Este LuxR activo activará la expresión del operón lux pero inhibirá la expresión del gen luxR.

Pseudomonas fluorescens NCIMB 10586 produce compuesto de mupirocina. La expresión del gen de la mupirocina de *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 se basa en un sistema regulador de detección de quórum (El-Sayed et al, 2001). El gen que codifica la mupirocina es el operón Mup. Los aminoácidos MupR y MupI muestran similitudes con los sistemas reguladores LasR/LasI y LuxR/LuxI. MupR es importante para activar mupI y m operones arriba. Además de la síntesis de mupirocina que sigue el sistema regulador de detección de quórum, la producción de compuestos antibacterianos de la bacteria *Roseobacter* 27-4 también sigue la regulación de detección de quórum (Buhn et al, 2005). Esto se debe a que estos compuestos se forman cuando la densidad celular es alta.

Además de AHL, otro autoinductor es la butirolactona (butanolida). Un ejemplo de butanolida es el factor A (2-isocaprilolil-3R-hidroximetil- \otimes -butirolactona) *Streptomyces griseus*. El factor A *S. griseus* se produce antes que la producción de estreptomicina y se detendrá cuando la producción de estreptomicina alcance su nivel máximo (Horinouchi & Beppu 1992). El factor A induce al menos 10 proteínas a nivel de transcripción. Uno de ellos es la estreptomicina 6-fosfotransferasa, una enzima que actúa en la biosíntesis de la estreptomicina y en su resistencia a la estreptomicina.

Inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios microbianos en el laboratorio. Hay varios obstáculos encontrados en la síntesis de metabolitos secundarios en el laboratorio. Algunos microbios que viven en simbiosis con la vida marina son difíciles de cultivar en el laboratorio. Algunos de los microbios que producen metabolitos secundarios también pueden perder la capacidad de producir metabolitos secundarios después de un breve almacenamiento (Tabarez 2005). La causa de esto es que los requerimientos nutricionales no se cumplen o las cepas que producen metabolitos secundarios no están bajo estrés y también pueden ser causados por el ambiente abiótico. Los esfuerzos realizados para superar el entorno abiótico consisten en hacer que las condiciones durante el cultivo sean similares al entorno original, por ejemplo, modificando los métodos de cultivo convencionales. *Bacillus licheniformis* EI-34-6 produce metabolitos secundarios cuando se cultiva en un biorreactor utilizando una membrana semipermeable. *B. licheniformis* EI-34-6 pero no produjo metabolitos secundarios cuando creció en cultivo líquido agitado (Yan et al, 2003). Los diferentes tipos de membranas semipermeables no mostraron resultados diferentes, por lo que se pudo concluir que la composición química de las membranas no afectó la producción de compuestos antimicrobianos. *Bacilo* sp. que se aisló del alga *Palmaria palmate* produjo compuestos antimicrobianos con espectros variables en el método de cultivo en botella giratoria modificado en comparación con el cultivo líquido agitado o el cultivo líquido en una botella giratoria (Yan et al, 2002).

La producción de compuestos antimicrobianos por bacterias marinas también puede ser inducida por la presencia de bacterias terrestres vivas o muertas (Mearns-Spragg et al, 1998). Doce de las 16 bacterias epibióticas de algas e invertebrados mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* después de la exposición a bacterias terrestres vivas.

D. CONCLUSIÓN

Los microbios marinos son uno de los prometedores productores de metabolitos secundarios. Algunos de los obstáculos experimentados en el proceso de cultivo en el laboratorio son la ausencia de metabolitos secundarios. Hay varios esfuerzos que se pueden hacer. En primer lugar, los medios utilizados en el proceso de cultivo variaban tanto en tipo como en concentración. En segundo lugar, al medio utilizado se le añaden precursores de metabolitos secundarios como aminoácidos y carbohidratos. En tercer lugar, se intenta que el proceso de cultivo sea similar a las condiciones de la naturaleza, por ejemplo, en el proceso de cultivo no hay agitación ni modificación del biorreactor utilizando una membrana semipermeable.

REFERENCIAS

1. Amstrong, E., Yan, L., Boud, K.G., Wright, P.C., & Burgess, J.G. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461:37-40.
2. Barry, K.J. & Wainwright, N.R. 1997. Biosynthetic induction of a secondary metabolites by a marine bacterium under nutritional stress: potential role of the incomplete oxidation of an organic acid. *Bioll Bull* 193:274-275.
3. Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8: 208-215.
4. Bruhn, J.B., Nielsen, K.F., Hjelm, M., Hansen, M., Bresciani, J., Schulz, S. & Gram, L. 2005. Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the roseobacter clade. *Appl Microbiol Environ* 71: 7263-7270.
5. Burgess, J.G. Jordan, E.M. Bregu, M. Mearns-Spragg, A. & Boyd, K.G. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural product research. *J Biotechnol* 70:27-32.
6. Chakraborty, R. & Bibb, M.J. 1997. The ppGpp Synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* 179: 5854-5861.
7. Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R. & Riccardi, G. 2004, Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (porifera, demospongiae). *J Exp Mar Biol Ecol* 309: 21-33.

8. Claire, A.S. Rittschof, D. Gerhart, D.J. Hooper, I.R. & Bonaventura, J. 1999. Anti-settlement and narcotic action of analogues of diterpene marine natural product antifoulant from octocarals. *Mar Biotechnol* 1: 427-436.
9. El-Sayed, A.K., Hothersall, J. & Thomas, C.M. 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol* 147: 2127-2139.
10. Gonzalez, J.E & Marketon, M.M. 2003. Quorum sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 574-592.
11. Gudbjarnason, S. 1999. Bioactive Marine Natural Product. *Rit Fiskideilar* 16:107-110.
12. Gutterson, N. Ziegler, J.S., Warren, G.W. & Layton, T.J. 1988. Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J Bacteriol* 170: 380-385.
13. Horinouchi, S., & Beppu, T. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 46: 377-398.
14. Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. & Chopade, B.S.
15. 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Curr Sci* 86:593-597.
16. Long, R.A. & Azam, F. 2001. Antagonistic Interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67: 4975-4983.
17. Martin, J.F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *J. Bacteriol*
18. (16): 5197-5201.
19. Muller, W.E.G., Schroder, H.J. & Wiens, M. 2004. Approaches for a sustainable exploitation of biodiversity (secondary metabolites and biomaterials from sponges) in traditional and modern biomedical prospecting: part ii-the benefits. *eCAM* 1:133-144.
20. Okami, Y. 1982. Potential use of marine microorganisms for antibiotics and enzyme production. *Pure & Appl Chem* 54:1951-1962.
21. Prochnow, A.M., Evans, F., Saludes, D.D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J.S. & Kjelleberg, S. 2004. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3232-3238.
22. Schroder, H.C., Ushijima, H., Krasko, A., Gamulin, V., Shutze, J. & Muller, I.M. 2003. Emergence and disappearance of an immun molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: the achylectin family. *J Biol Chem* 278: 32810-32817.
23. Shiba, T. & Taga, N. 1980. Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 47:251-258.

24. Tabarez, M.R. 2005. Discovery of the new antimicrobial compound 7-o- malonyl macrolactin a. *Dissertation Van Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultat*. Jerman: Universitat Carolo-Wilhelmina.
25. Thakur, N.L., Hensschel, U., Krasko, A., Anil, A.C. & Muller, W.E.G. 2003. Antibacterial activity of the sponge *suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for chemical defense. *Aquatic Microbiol Ecol* 31: 77-83.
26. Wiens, M., Luckas, B., Brummer, F., Ammar, M.S.A., Steffen, R. & Batel, R. 2003. Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*. *Mar Biol* 142: 213-223.
27. Yan, L., Boyd, K.G. & Burgess, J.G. 2002. Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Mar Biotechnol* 4: 356-366.
28. Yan, L., Boyd, K.G., Adams, D.R. & Burgess, J.G. 2003. Biofilm-specific cross species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Appl Environ Microbiol* 69: 3719-3727.
29. Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W. & Yan, X. 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *World journal of Microbiology & Biotechnology* 21:201-206.

