

Actividad antagónica en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Luzmila Albarado Ysasis, Evelin Flores, Militza Guzmán y Elsa Salazar

Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente,
Núcleo de Sucre. Venezuela.

luzalv@gmail.com, eve_linff@yahoo.com, miltzaguz@cantv.net, elsazul2003@yahoo.es

Resumen

Se evaluó la actividad antagónica en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones intrahospitalarias, procedentes de pacientes del servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", Cumaná-Venezuela. Se identificaron 55 aislamientos de *P. aeruginosa* mediante métodos convencionales. El antagonismo se determinó por la técnica de la doble capa usando como cepas indicadoras *Staphylococcus aureus* CVCM 636, *Bacillus subtilis* CVCM 591 *Escherichia coli* K12 CVCM 178 y *P. aeruginosa* CVCM 787. Los aislamientos produjeron sustancias antibacterianas *in vitro*, mayormente efectivas contra cepas indicadoras grampositivas, en este sentido, 70,91% (39/55) de los aislamientos logró inhibir a *S. aureus* CVCM 636 y 67,27% (37/55) a *B. subtilis* CVCM 591. Mientras que, *P. aeruginosa* CVCM 787 fue inhibida por 47,27% (26/55) y *E. coli* K12 CVCM 178 por 52,72% (29/55). Este estudio permitió demostrar la actividad antagónica en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* contra cepas bacterianas indicadoras grampositivas y gramnegativas.

Palabras clave: actividad antagónica, *Pseudomonas aeruginosa*, aislamientos clínicos.

Antagonistic Activity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Antagonistic activity was evaluated for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infections in patients of internal medicine at the University Hospital "Antonio Patricio de Alcala," Cumana, Venezuela. Fifty-five isolates of *P. aeruginosa* were identified using conventional methods. Antagonism was determined by the double-layer technique using the indicator strains *Staphylococcus aureus* CVCM 636, *Bacillus subtilis* CVCM 591, *Escherichia coli* K12 CVCM 178 and *P. aeruginosa* CVCM 787. The isolates produced antibacterial substances *in vitro*, primarily effective against grampositive indicator strains. In this sense, 70.91% (39/55) of the isolates inhibited *S. aureus* CVCM 636 and 67.27% (37/55) inhibited *B. subtilis* CVCM 591. Whereas, *P. aeruginosa* CVCM 787 was inhibited by 26/55 (47.27%) and *E. coli* K12 CVCM 178 by 29/55 (52.72%). This study demonstrated the antagonistic activity in clinical isolates of *P. aeruginosa* against grampositive and gramnegative bacterial indicator strains.

Keywords: antagonistic activity, *Pseudomonas aeruginosa*, clinical isolates,

Introducción

Las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación que les permiten tener éxito en la competencia por nutrientes y espacio en su hábitat; estos mecanismos incluyen el mejoramiento de sistemas de quimiotaxis y la adquisición de sistemas de defensa, como la producción de péptidos antimicrobianos biológicamente activos, que inhiben el crecimiento de miembros de la misma especie productora o de distintos géneros bacterianos; además, han sido utilizados como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos, con importantes aplicaciones biomédicas potenciales y en la bioconservación de los alimentos [1].

Las sustancias antagonicas que producen los microorganismos para dominar su hábitat son diversas, entre ellas: antibióticos de amplio espectro, productos del metabolismo como ácidos orgánicos, moléculas quelantes de hierro (sideróforos) y las bacteriocinas. Muchas bacterias producen moléculas polipeptídicas con actividad bactericida, conocidas como bacteriocinas, son variables en su peso molecular y se han dividido en tres tipos: moléculas pequeñas termoestables, donde se incluye colicina V (específicas para bacterias coliformes); el segundo tipo, piocinas tipo S producidas por *P. aeruginosa*, moléculas proteicas de peso

molecular superior y el tercer tipo son bacteriocinas semejantes genética y morfológicamente a la cola de bacteriófagos, como las piocinas de tipo F y R de *P. aeruginosa* [2-4]. Las piocinas producidas por *P. aeruginosa*, han sido localizadas exclusivamente en el cromosoma y muestran similitud de secuencia a colicinas y otras bacteriocinas, aún no caracterizadas [3, 4].

P. aeruginosa constituye uno de los patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos. El género *Pseudomonas* pertenece a la familia Pseudomonaceae, está constituido por bacterias gramnegativas, ampliamente difundidas en la naturaleza, cuyas especies con mayor importancia en patología médica son *P. aeruginosa*, *P. mallei* y *P. pseudomallei*. La especie más aislada es *P. aeruginosa*; se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por su alto grado de adaptabilidad fisiológica y los elevados niveles de resistencia que manifiesta frente a numerosos agentes antimicrobianos, razones que lo convierten en uno de los patógenos intrahospitalario más frecuente y reconocido como un gran problema de salud a nivel mundial [5].

La resistencia microbiana frente a los antibióticos, así como la toxicidad que algunos de ellos tiene, constituye nuevamente una amenaza sanitaria, razón por la que urge reforzar las redes de vigilancia para su detección, desarro-

llar nuevas estrategias terapéuticas y aumentar los esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Sobre la base de este aspecto, el estudio de la actividad antagónica bacteriana contra diversos microorganismos ha sido objeto de estudio en diferentes investigaciones [6-9]. Araque *et al.* [10] evaluaron la actividad inhibitoria en cuatro cepas de *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos, obteniendo que todas las cepas bacterianas ocasionaron inhibición total y parcial sobre los hongos, obteniendo halos de inhibición con un diámetro promedio de 9,9 mm. También, Musumeci *et al.* [11] aislaron cepas de *P. aeruginosa* de distintos procesos infecciosos para evaluar la capacidad de producir sustancias con actividad inhibitoria, los resultados obtenidos indicaron una alta incidencia de cepas productoras (85,7%). Por su parte, Díaz [12] determinó la actividad bacteriocinogénica en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de distintos tipos de muestras clínicas y demostró que el 100% (40) de las cepas resultó productor de sustancias antibacterianas, demostrando que las bacteriocinas tuvieron amplio espectro de acción bactericida, además de actividad antifúngica.

La aparición cada vez mayor de bacterias patógenas antibiótico-resistentes, ha generado la necesidad de evaluar diversos microorganismos productores de sustancias con actividad antimicrobiana que, a futuro, representen una alternativa en el tratamiento de enfermedades infectocontagiosas y, de esta manera, contrarrestar algunos de estos problemas de salud pública y veterinaria; por otra parte, la carencia de publicaciones de esta índole en el estado Sucre, representa un motivo adicional para su investigación. Por lo que, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad antagónica en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* productores de infecciones intrahospitalarias (IIH), aisladas en pacientes del servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná-Venezuela.

Metodología

Aislamientos bacterianos: en el estudio se incluyeron 55 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de IIH, obtenidos de muestras de pacientes reclusos en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Se identificaron empleando protocolos de pruebas bioquímicas convencionales, establecidos por Forbes *et al.* [13] y Koneman *et al.* [14] para la identificación de especies de *Pseudomonas*. Las evaluaciones se realizaron en el laboratorio de Microbiología General y Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo Sucre.

Determinación de la actividad antagónica: se determinó empleando la técnica de la doble capa [15]; el ensayo se realizó por triplicado, usando las cepas bacterianas indicadoras procedentes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM): *Bacillus subtilis* CVCM 591, *Staphylococcus aureus* CVCM 636, *Escherichia coli* K12 CVCM 178 y *P. aeruginosa* CVCM 787. Para el control del método se empleó la cepa *E. coli* CVCM 35 y *E. coli* CVCM 178.

Los aislamientos de *Pseudomonas* spp. se cultivaron en caldo Luria Bertani, LB, (Difco Laboratories, USA) y se incubaron a 37°C en ambiente de aerobiosis por 24 h. Luego, se preparó una suspensión en 2 mL de caldo LB, equivalente a 60 UK (Unidades Klett) y fueron sembrados en agar LB, por punción en 6 puntos equidistantes de la placa. Después de la incubación a 37°C durante toda la noche, las colonias desarrolladas en las placas se expusieron a vapores de cloroformo (CHCl₃) durante 10 min; luego, a las placas se les añadieron 6 mL de agar fundido, previamente inoculado con 0,1 mL de un cultivo fresco de las cepas utilizadas como indicadoras de antagonismo.

Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 h, luego, se procedió a observar la presencia o no de los halos de inhibición alrededor de la cepa antagónica; se midió el diámetro de los halos en el medio de cultivo, estableciéndose como positivo la producción de cualquier inhibición evidente. Los resultados se expresaron a través de tablas y figuras, empleando un análisis porcentual [16].

Resultados

Los resultados del ensayo para determinar la actividad antagónica, indicaron que 70,91% (39/55) de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* produjeron sustancias con actividad inhibitoria *in vitro* contra las cepas bacterianas indicadoras (Figura 1), específicamente, 70,91% (39/55) inhibieron las cepas bacterianas indicadoras grampositivas y 29,09% (16/55) a las gramnegativas.

De las cuatro especies bacterianas indicadoras, las bacterias grampositivas expresaron la máxima actividad antibacteriana (Tabla 1), obteniéndose halos de inhibición con diámetros entre 10 y 40 mm en el 70,91% (39/55) de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. *B. subtilis* CVCM 591 fue inhibido por el 67,27% (37/55) de los aislamientos, produciendo halos de inhibición con diámetros entre 10 y 29 mm en 30 de los 37 productores, lo que representa un 54,55%. En relación a la cepa indicadora *S. aureus* CVCM 636, fue inhibida por el 70,91% (39/55) de los aislamientos, de los cuales 26 produjeron halos de inhibición entre 10 y 29 mm, lo que representa un 47,27%, obteniéndose los ha-

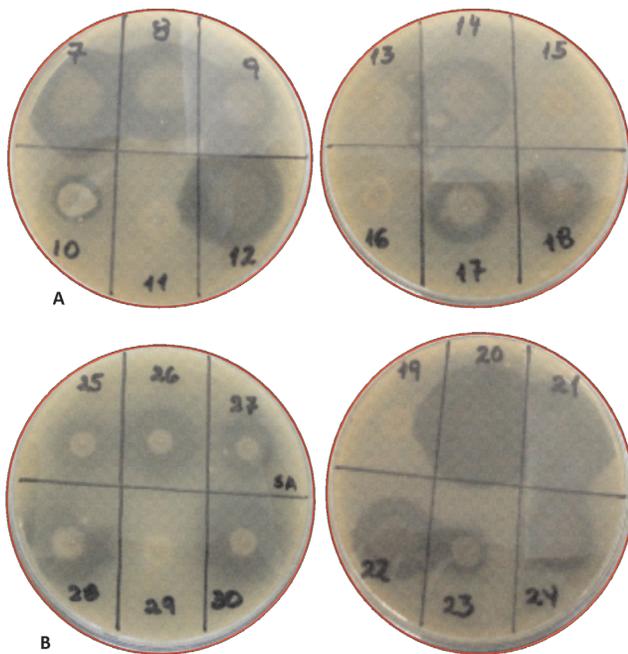


Figura 1. Efecto inhibitorio de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* contra cepas bacterianas indicadoras. A: *Bacillus subtilis* CVCM 591; B: *Staphylococcus aureus* CVCM 636.

los de mayor tamaño (30 a 40 mm) en 13 de los 39 (23,64%) aislamientos productores.

El grupo de bacterias gramnegativas expresó menores tamaños de halos de inhibición, en comparación con las grampositivas, con medidas entre 12 y 30 mm de diámetro (Tabla 2). *P. aeruginosa* CVCM 787 fue inhibida en el 47,27% (26/55) por los aislamientos clínicos, de los cuales, 13 de los 26 (23,63%) produjeron halos ≥ 20 mm; *E. coli* K12 CVCM 178 fue inhibida por el 52,72% (29/55), expresando tamaños de halos entre 12 y 19 mm en 21 de los 29 (38,18%) aislamientos productores.

Discusión

La prueba para la detección de efecto antagónico *in vitro* fue positiva en 39 de los 55 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* evaluados, observándose diámetros variables en los halos de inhibición frente a las cepas bacterianas indicadoras empleadas en el ensayo. Estos resultados encuentran apoyo en publicaciones sobre aislamientos clínicos, como la realizada por Fontoura *et al.* [17], en cuyo estudio determinaron sustancias con efectiva actividad antimicrobiana a una variedad de cepas bacterianas indicadoras, tales como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*,

Tabla 1. Efecto antagónico en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes reclusos en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná-estado Sucre, Venezuela, contra cepas bacterianas indicadoras grampositivas.

Cepas bacterianas grampositivas indicadoras de la actividad antagónica	Aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
	Efecto positivo: diámetro halo de inhibición ≥ 10 mm					
	≥ 10 a 29 mm		30 a 40 mm		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Bacillus subtilis</i> CVCM 591	30/55	54,55	7/55	12,72	37/55	67,27
<i>Staphylococcus aureus</i> CVCM 636	26/55	47,27	13/55	23,64	39/55	70,91

Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. N: número de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. %: porcentaje.

Tabla 2. Efecto antagónico en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes reclusos en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná-estado Sucre, Venezuela, contra cepas bacterianas indicadoras gramnegativas.

Cepas bacterianas gramnegativas indicadoras de la actividad antagónica	Aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
	Efecto positivo: diámetro halo de inhibición ≥ 12 mm					
	≥ 12 a 19 mm		20 a 30 mm		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CVCM 787	13/55	23,63	13/26	23,63	26/55	47,27
<i>Escherichia coli</i> K12 CVCM 178	21/55	38,18	8/55	14,54	29/55	52,72

Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. N: número de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. %: porcentaje.

Staphylococcus aureus, entre otros, producidas por *Pseudomonas* sp. Asimismo, Padilla *et al.* [18] evaluaron la producción de sustancias antimicrobianas por bacterias aisladas de pacientes con VIH, obteniendo que *Pseudomonas aeruginosa* fue la especie con mayor producción, con productos de alta potencia y de amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Por su parte, Cardozo *et al.* [19] evaluaron compuestos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, sus resultados demostraron que éstos tienen efectos inhibidores contra *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, sugiriendo que pudieran representar una buena alternativa de tratamiento para controlar las infecciones causadas por estas bacterias.

Motivado a que son numerosas las investigaciones sobre el efecto antagonista a partir de bacterias aisladas de muestras ambientales y escasas en bacterias clínicas, los resultados de este trabajo han sido discutidos con publicaciones que tienen como objetivo principal la evaluación de sustancias con actividad antagónica, independientemente de su procedencia. Tal es el caso del trabajo realizado por Cruz-Martín *et al.* [20] quienes lograron determinar, empleando bacterias ambientales, que la inhibición de microorganismos patógenos es ocasionada por la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana que tienen la capacidad de difundir en el medio de cultivo donde se desarrollan, teniendo una elevada efectividad. También, Santoyo *et al.* [21] comprobaron la producción de compuestos con actividad antagónica por bacterias del género *Pseudomonas*, sintetizadas, principalmente, en etapas exponenciales de crecimiento bacteriano.

En la prueba de detección de efecto antagónico *in vitro*, los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fueron expuestos a vapores de cloroformo, con el fin de matar las células bacterianas, y de esta forma, liberar su contenido, para luego evaluar si existía algún efecto antagonista sobre las cepas indicadoras, efecto que se observó, 24 horas después, en todas las bacterias indicadoras. Según Vidaver [22], ésta es una manera sencilla de comprobar la presencia de bacteriocinas en organismos productores, sobre la base de esta investigación, se infiere, que el efecto antagonista observado podría deberse a este tipo de péptidos producidos por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* durante su actividad metabólica.

Por su parte, Cotter *et al.* [23] refieren que las bacteriocinas, son consideradas como una alternativa a los antibióticos tradicionales; sin embargo, reseñan que aunque la aplicación de bacteriocinas específicas puede ser limitada por el desarrollo de la resistencia, comprender los mecanismos por los que podría surgir esa resistencia, permitirá

a los investigadores desarrollar estrategias para minimizar ese problema potencial.

Dentro de las bacteriocinas producidas por bacterias del género *Pseudomonas*, la piocianina es un metabolito activo electroquímicamente, producido por distintas especies de este género que participa en actividades biológicas significativas como expresión genética, formación de biopelículas y, como agente antibacteriano y antifúngico, actualmente, la producción de piocianina por *P. aeruginosa* está relacionada efectivamente con la propiedad antagónica de la bacteria y actividad de control biológico [24].

En este estudio, además de demostrarse la producción de sustancias con actividad antagónica en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, se comprobó que en relación a su espectro de acción, resultaron más efectivas contra bacterias grampositivas, lo que constituye un elemento significativo en la colonización de ambientes hospitalarios, comprometiéndose procesos infecciosos en pacientes a riesgo.

Una posible explicación a la mayor actividad antagónica sobre las cepas indicadoras grampositivas y menor sobre las cepas indicadoras gramnegativas, se relaciona a la estructura de la membrana externa. Las bacterias gramnegativas contienen en su membrana externa lipopolisacáridos y no fosfolípidos, que forman una capa protectora hidrófila en torno a la célula, que no es atravesada por moléculas lipófilas, actuando como una barrera contra las bacteriocinas haciéndolas más resistentes, por lo tanto, ejerciendo su mejor acción sobre bacterias grampositivas [25, 26].

Según publicación de Araque *et al.* [10], el antagonismo presente en aislados hospitalarios pudiera contribuir con la virulencia bacteriana, a través de la colonización de ambientes hospitalarios, facilitando de este modo su diseminación y la transferencia de elementos genéticos mediadores de resistencia como plásmidos, entre el mismo género y otros relacionados, incrementándose así la producción de cuadros infecciosos en pacientes inmunosuprimidos. No obstante, la producción bacteriana de péptidos con actividad antimicrobiana representa una estrategia terapéutica ante el aumento de organismos patógenos resistentes a antibióticos convencionales, cuando se requiere del uso de terapias antimicrobianas alternativas, en donde estos péptidos pueden proveer parte de la solución. Adicionalmente, han mostrado propiedades distintas a la actividad antimicrobiana, lo que las posiciona como posibles agentes para terapias biomédicas independientes de la actividad antimicrobiana. De manera que, los beneficios potenciales en el área clínica son notorios, por lo que su búsqueda debe hacerse en diversos grupos bacterianos, así como investigar sus características y mecanismos de acción. De

igual manera, conocer los sistemas que regulan la expresión de los genes involucrados en la producción de estas moléculas [1].

Conclusión

Este estudio permitió demostrar la actividad antagonica en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* contra cepas bacterianas indicadoras grampositivas y gramnegativas, este hecho se argumenta al evidenciarse la producción de sustancias con efecto inhibitorio difundidas en el medio de cultivo.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por el apoyo financiero en el Proyecto "Actividad antagonica y susceptibilidad antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas* spp." identificado con el código Nº CI-02-040102-1703-11.

Referencias

- [1] LÓPEZ, J.; OCHOA, A.; SANTOYO, G.; ANAYA, J.; MEDINA, E.; MARTÍNEZ, M.; LOEZA, P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, 39(3): 49-57.
- [2] SHINOMIYA, T.; SHIGA, S.; KAGEYAMA, M. (1983). Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the pyocin R2 gene cluster between the trpCD and trpE genes. **Molecular and General Genetics**, 189:375-380.
- [3] PUGSLEY, A. (1984). The ins and outs of colicins. **Microbiological Sciences**, 1:168-175.
- [4] SANO, Y.; KOBAYASHI, M.; KAGEYAMA, M. (1993). Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. **Journal of Bacteriology**, 175: 6179-6185.
- [5] LEBEQUE, Yamila; MORRIS, Humberto J.; CALAS, Nerys (2006). Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Cubana de Medicina** [online]. 2006, vol. 45, n.1 [citado 2013-08-09], pp. 0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232006000100005&lng=es&nrm=iso. ISSN 1561-302X.
- [6] HUBERT, E.; LOBOS, O.; BREVIS, P.; PADILLA, C. (1998). Purification and characterization of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp. **Journal of Applied Microbiology**, 84: 910-913.
- [7] CASTILLO, I.; LODEIROS, C.; NÚÑEZ, M.; CAMPOS, I. (2001). Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. **Revista Biología Tropical**, 49:1213-1221.
- [8] MICHEL, Y.; BAYSSE, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimie**, 84: 499-510.
- [9] NIELSEN, T.; SORENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORENSEN, J. (2002). Antibiotic and Biosurfactant Properties of Cyclic Lipopeptides Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. from the Sugar Beet Rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 3416-3423.
- [10] ARAQUE, Y.; ALBARADO, L.; CENTENO, S.; RODRÍGUEZ-LEMOINE, V.; VITELLI-FLORES, J. (2007). Actividad antibiótica y antifúngica de *B. cepacia* provenientes de ambientes nosocomiales. Servicio Autónomo Hospital universitario "Antonio Patricio Alcalá". Cumaná, Venezuela. **Kasmera**, 35 (2):107-117.
- [11] MUSUMECI, F.; BARNES, A.; ALBESA, I. (1997). Producción y sensibilidad a microcinas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, 31(2):189-194.
- [12] DÍAZ, J. (2011). Determinación de actividad bacteriocinogénica en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas del Hospital de Talca. (Documento en línea). Disponible: <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/8334> (consulta: 2013, agosto 10).
- [13] FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A. (2004). Bailey & Scott. **Diagnóstico microbiológico**. Décimo primera edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- [14] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. (2008). **Diagnóstico Microbiológico**. Texto y atlas color. Sexta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- [15] FREDERICG, P. (1957). Colicims. **Annual Review of Microbiology**, 11: 7-22.
- [16] SOKAL, R.; ROHLF, F. (1979). **Biometría principios y métodos estadísticos en investigación biológica**. Ed. H. Blume. Barcelona.
- [17] FONTOURA, R.; CORRALO, J.; TERRA, S.; MUI, S.; BRANDELLI, A. (2009). Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, 25: 205-213.
- [18] PADILLA, C.; BREVIS, P.; LOBOS, O.; HUBERT, E.; ZAMORANO, A. (2001). Production of antimicrobial substances, by hospital bacteria, active against other microorganisms. **Journal of Hospital Infection**, 49 (1):43-47.
- [19] CARDOZO, V.; OLIVEIRA, A.; NISHIO, E.; PERUGINI, M.; ANDRADE, C.; SILVEIRA, W.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R.; NAKAZATO, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 12: 12-17.
- [20] CRUZ-MARTÍN, M.; ACOSTA-SUÁREZ, M.; POVEDA, I.; LEIVA-MORA, M.; ROQUE, B.; ALVARADO-CAPÓ, Y. (2012). Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* por metabolitos difundidos y volátiles. **Biotecnología vegetal**, 12(3):179-181.

- [21] SANTOYO, G.; CANTERO, E.; MOSQUEDA, M.; CABRIALES, J.; RODRÍGUEZ, A. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. **Terralatinoamericana**, 1(28):55
- [22] VIDAVER, A. (1983). Bacteriocins: the lure and the reality. **Plant Disease**, 57 (5): 471-475.
- [23] COTTER, P.; ROSS, R.; HILL, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?. **Nature Reviews Microbiology**, 11(2):95-105.
- [24] JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(4):1159-1168.
- [25] ROJAS VARGAS, P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. **Tecnología en Marcha**, Vol. 21-2: 9-16.
- [26] GRANDE, M.J.; LUCAS, R.; ABRIQUEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN, O.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ BUEÑO, M.; MARTÍNEZ CAÑAMERO, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, 106: 185-194.
-