

## CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE SUBSTANCIAS INHIBITORIAS PRODUCIDAS POR *Alteromonas* MARINAS

### PARTIAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL SPECTRUM OF INHIBITORY SUBSTANCES FROM MARINE *Alteromonas*

Jorge León<sup>1</sup> y Guillermina Tapia<sup>2</sup>

---

#### RESUMEN

Se caracterizan parcialmente sustancias inhibitorias producidas por cepas marinas del género *Alteromonas* spp. Pruebas de precipitación de extractos crudos de sobrenadantes de las cepas N22.C y N11.6 con concentraciones saturantes de sulfato de amonio y filtrados en columnas de *Sephadex* G-25 muestran la producción de sustancias inhibitorias (SI) de naturaleza proteinácea.

Otros ensayos de caracterización revelan que dichas sustancias tienen un amplio espectro de actividad antibiótica frente a cepas de colección patógenas de peces, moluscos y crustáceos. Asimismo, muestran a las SI como termosensibles a 90 °C en 45 min y con capacidad de mantener estabilidad inhibitoria dentro del rango de pH de 3,0 a 9,0 hasta por 15 min. La actividad antibiótica de las sustancias frente a *Vibrio anguillarum* NCMB 2133, *V. anguillarum* ATCC 19264 y *Aeromonas salmonicida* 67,79 fueron comparativamente equivalentes a 30 ppm del antibiótico oxitetraciclina (OTC).

**Palabras claves:** bacterias marinas, actividad inhibitoria, sustancia extracelular, *Alteromonas*, antibiosis.

#### ABSTRACT

Inhibitory substances produced by marine strains belonging to the genus *Alteromonas* spp. are partially characterized. Precipitation of raw extracts supernatans from strains N22.C and N11.6 with concentration saturants of ammonium sulfate and filtrates in columns *Sephadex* G-25 show the production of inhibitory substances (SI) of proteinacea nature. Other assays revealed that these substances have a wide spectrum of antibiotic activity against collection strains pathogens of fish, mollusks and crustaceans. Also, it shows those SI to be thermosensitive at 90 °C for 45 min and stable within the pH range of 3,0 at 9,0 for 15 min. Antibiotic activity of the substances against *Vibrio anguillarum* NCMB 2133, *V. anguillarum* ATCC 19264 and *Aeromonas salmonicida* 76,79 was comparatively equivalent to 30 ppm of the antibiotic oxitetraciclina (OTC).

**Key words:** marine bacteria, inhibitory substances, extracellular substance, *Alteromonas*, antibiosis.

---

#### INTRODUCCIÓN

Los microorganismos y, en particular, las bacterias han tenido un profundo efecto en el

desarrollo de la química y las ciencias médicas. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929, estudios intensos principalmente de bacterias y hongos terrestres han revelado que los microorganismos constituyen una rica fuente de sustancias bioactivas. A la fecha, se conocen entre 30 000 a 50 000 nuevos metabolitos provenientes de microorganismos, de los cuales más de 10 000 son compuestos biológicamente activos, y cerca de 8 000 tie-

---

<sup>1</sup> Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Lab. Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas, Carrera de Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

nen actividades antibióticas y antitumorales. Actualmente, más de 100 productos microbianos tienen uso clínico continuado como antibióticos, antitumorales y agentes agroquímicos (Fenical, 1993).

El estudio de anibiosis en bacterias marinas ha estado dirigido hacia la visualización del ambiente marino en su efecto autodepurador y al entendimiento de interrelaciones ecológicas de microorganismos en ambientes epífitos de macroalgas marinas (Gauthier, 1969; Andersen *et al.* 1974; Lemos *et al.* 1985). No obstante, Dopazo *et al.* (1988), León (1996) y León *et al.* (1997), frente a la gran capacidad antagónica de algunas cepas marinas sobre las bacterias patógenas de peces, encontradas en estudios, sugieren el uso potencial de las mismas en el biocontrol de epizootias en cultivos masivos de peces, moluscos y crustáceos. Por otra parte, Lodeiros *et al.* (1988) realizaron un estudio del potencial de producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a 13 monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura, sugiriendo el posible uso profiláctico de ciertos monocultivos en sistemas de cultivo masivo de organismos marinos.

El mundo marino es una enorme fuente de recursos, y entre ellos los antibióticos producidos en forma natural podrían ser de gran utilidad en el control de enfermedades tanto en acuicultura como en patología humana. En este sentido, a través del presente trabajo se llevaron a cabo estudios básicos de extracción, caracterización bioquímica parcial y capacidades antibióticas de metabolitos inhibitorios producidos por bacterias marinas del género *Alteromonas*, seleccionadas por su alta capacidad antagónica frente a ictiopatógenos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la caracterización preliminar de sustancias inhibitorias, se consideraron las cepas marinas signadas como N22.C y N11.6, pertenecientes al género *Alteromonas*, seleccio-

nadas previamente por su amplio espectro antibacteriano frente a cepas testigo de laboratorio e ictiopatógenas.

### Condiciones de cultivo

El medio de cultivo para esta experiencia se preparó según la formulación de Gauthier (1976), y modificada por el autor con la adición de 0,1% de glucosa en lugar de 5% de almidón.

Se utilizaron como base 200 ml de Caldo Marino de ZoBell (CMZ) distribuidos en matraces de 500 ml, los cuales fueron inoculados con 1,0 ml de precultivos de 24 h de las cepas en prueba ( $10^8$  células/ml). Los cultivos fueron incubados a la temperatura de 20 °C con agitación constante de 60 pulsos por min, hasta alcanzar la fase estacionaria a los 4 d.

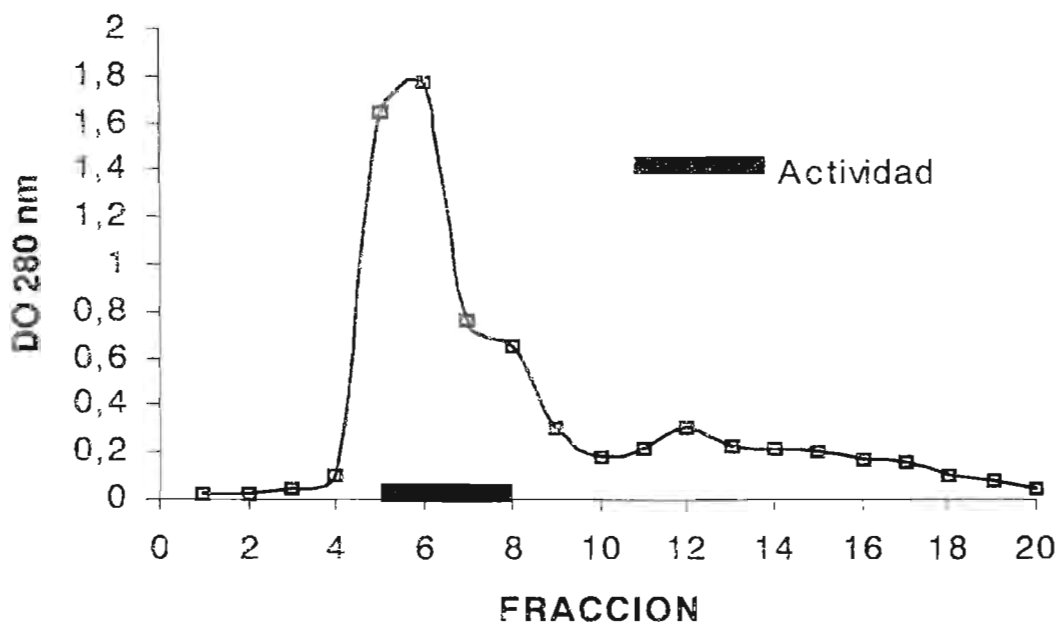
### Extracción de la sustancia inhibitoria

Para la extracción de productos antimicrobianos se utilizó básicamente el método descrito por Barja *et al.* (1989), con algunas modificaciones. La cepa marina cultivada en el medio CMZ en las condiciones indicadas fue centrifugada a 5 000 x g por 30 min. El pellet celular fue resuspendido en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,1 para su posterior análisis.

Los sobrenadantes colectados fueron sometidos a precipitación fraccionada de proteínas con sulfato de amonio (Merck) hasta alcanzar 70% de saturación (Keen, 1966). Después de 14-16 h de mantenerlas a 4 °C, las muestras se centrifugaron a 5 000 x g por 30 min. El precipitado fue disuelto en agua destilada estéril. Esta muestra fue considerada «extracto crudo del sobrenadante» (ECS). En todos los casos, los «extractos crudos» fueron probados para determinar su actividad inhibitoria frente a la cepa testigo *Staphylococcus aureus* ATCC 11632.

### Filtración en columnas de gel de sephadex

La filtración en gel se realizó en columnas de Sephadex G-25 equilibrada con tampón



**Figura 1** Perfil de elución y actividad inhibitoria en *S. aureus* ATCC 11632 de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio (0-70% saturación) en columnas de Sephadex G-25 del ECS de *Alteromonas* cepa N22.C. Cada fracción corresponde a 1 ml del eluido.

Tris-HCl 50 mM (pH 8,1) y 0,1M de NaCl, con un flujo de 60 ml/h (Barja *et al.* 1989). Para el proceso, se disolvió 0,5 g de ECS liofilizado en 2 ml de agua destilada para luego aplicar 1 ml a la columna. Las fracciones fueron recolectadas en volúmenes de 1 ml y luego determinadas las absorbancias para proteínas a 280 nm y su actividad inhibitoria frente a *S. aureus* ATCC 11632. Las fracciones activas de los eluidos fueron juntadas (5,0 ml), luego liofilizadas y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras fueron consideradas "semipurificadas" (SP).

#### Ensayos de actividad inhibitoria

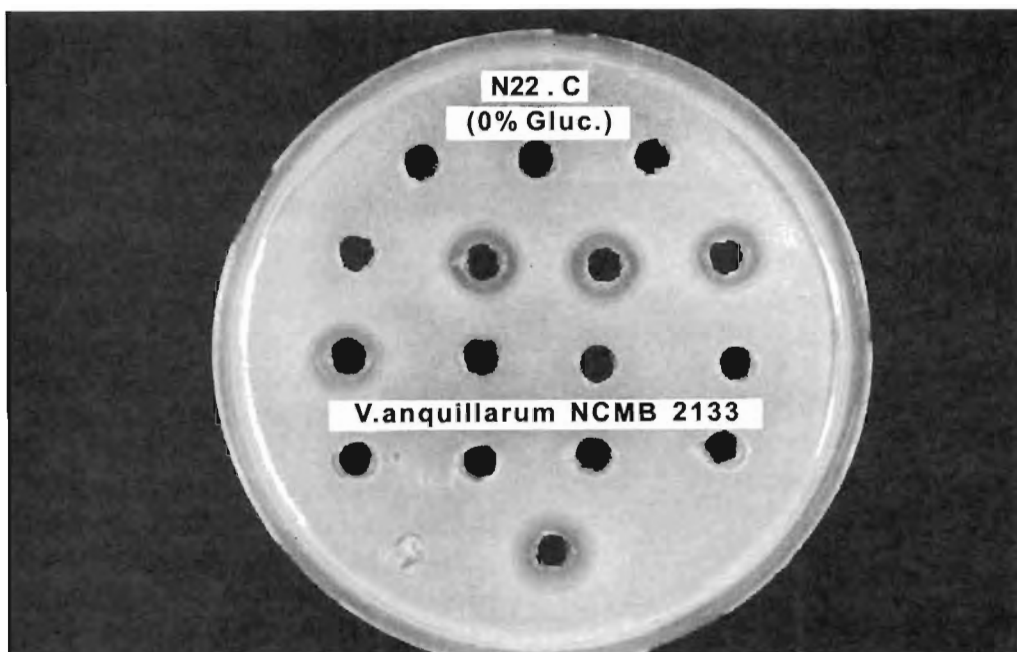
La actividad inhibitoria de las fracciones fue ensayada por dos métodos: el método de difusión en «pocillos» (Vignolo *et al.* 1993) y el método de difusión directa en placas (Naclerio *et al.* 1993). En ambos casos los métodos fueron adaptados para bacterias marinas. *S. aureus* ATCC 11632 y *V. anguillarum* NCMB 2133 fueron usados como cepas testigo, y Agar Tripticosa Soya

(TSA) como medio de siembra.

Placas con medio TSA fueron cubiertas con 3 ml de una segunda capa de TSA semisólido (0,6% de agar) e inoculadas con 10  $\mu\text{l}$  del cultivo testigo de 18 h de incubación. Luego de 30 min de difusión se crearon pocillos de 5 mm de diámetro e inoculados con 30  $\mu\text{l}$  de la muestra en estudio. En el caso del segundo método se inocularon 10  $\mu\text{l}$  de la muestra directamente sobre el cultivo. En ambos casos las placas fueron incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  para el caso de *V. anguillarum* NCMB 2133 y a  $35^{\circ}\text{C}$  para *S. aureus* ATCC 11632. Los resultados fueron observados a las 24 y 30 h mediante la formación de halos de inhibición.

#### Efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de la sustancia inhibitoria

Para la prueba de termoestabilidad, la muestra "semipurificada" de la cepa N22C (50 mg) fue reconstituida en 400 ml de agua destilada, luego distribuida en tubos eppendorf (75 ml) y sometida a temperaturas crecientes



**Fig 2.** Actividad inhibitoria sobre *V. anguillarum* NCMB 2133 de las fracciones 5-8 del extracto crudo del sobrenadante (ECS) de *Alteromonas* N22.C, filtradas por columnas de Sephadex G-25.

(Baño María Memmert) de 50, 60, 70, 80 y 90 °C por 10, 15, 30 y 45 min cada una. Luego del descenso de la temperatura a la ambiental, se inocularon 15 ml en el medio TSA, previamente sembrado con *S. aureus* ATCC 11632 como cepa testigo. Para la lectura se consideró el diámetro de los halos de inhibición.

Para el ensayo del efecto de pH se empleó el Método de Bhunia *et al.* (1988). Las muestras semipurificadas de las cepas en estudio (N11.6 y N22.C) fueron disueltas en agua desionizada estéril (50 mg/ml), luego distribuidas en tubos eppendorf (100 ml) y ajustadas a pH distintos (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; y 12,0) con soluciones de HCl y NaOH 10 mM. Después de 1,5 h de exposición las muestras tratadas fueron ajustadas a 7,0 de pH con una solución estéril de tampón fosfato 4 mM e inoculadas en placas conteniendo TSA sembradas con la cepa testigo.

#### **Antibiosis comparativa de una sustancia inhibitoria**

La actividad antimicrobiana de la sustancia SP de la cepa N22.C se determinó mediante ensayos comparativos por el método de difusión en placas según Baarn *et al.* (1966), con modificaciones del autor. Para el ensayo se utilizaron placas de TSA y cultivos de 18 h. Eluidos activos (10 ml) fueron comparados con la actividad de cinco antibióticos de concentraciones conocidas (Sensidiscos, Merck). Como testigos se utilizaron cepas de *S. aureus* ATCC 11632, *V. anguillarum* ATCC 19264, *V. anguillarum* NCMB 2133 y *A. salmonicida* 67.79.

## **RESULTADOS**

### **Procesos de extracción de las sustancias inhibitorias**

Trabajos previos y ensayos preliminares con las cepas marinas en estudio mostraron evidencias de que las sustancias inhibitorias son de naturaleza proteica. Asimismo, los ensayos preliminares sobre antibiosis mostraron que

**Tabla 1.** Espectro de actividad inhibitoria de los "extractos crudos" de las cepas N11.6 y N22.C del género *Alteromonas* frente a bacterias ictiopatógenas.

CEPAS PATÓGENAS	SUBSTANCIAS DE:	
	N11.6	N22.C
<i>Vibrio tubiashii</i> FX1	++(a)	+
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133	+	++
<i>Vibrio anguillarum</i> RP-13	+++	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	++	+
<i>Vibrio ordalii</i> NCMB 2167	++++	++++
<i>Vibrio ordalii</i> 84/2559	+++	++
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> A32	++	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i> B-35	++	+++
<i>Aeromonas salmonicida</i> 67.79	++	++
<i>Aeromonas sobria</i> P-281	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	++	+++
<i>Yersinia ruckeri</i> PP-31	++	

(a) +, < 8 mm zona de inhibición; ++, 8-12 mm zona de inhibición; +++, 12-16 mm zona de inhibición; +++++, > 16 mm zona de inhibición.

(b) cepa control.

las sustancias inhibitorias eran secretadas hacia el medio extracelular. Por lo tanto, los sobrenadantes de los cultivos se procesaron precipitando con concentraciones crecientes de sulfato de amonio, hasta una saturación de 70%.

Según el perfil de eluciones de la cepa N22.C, existe cierta correlación entre la

absorbancia de los eluidos a 280 nm y la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC 11632 (Fig. 1). Pruebas de actividad frente a *V. anguillarum* NCMB 2133 mostraron también fuerte inhibición en las fracciones 5, 6, 7, y 8 de los eluidos (Fig. 2).

**Actividad inhibitoria de "extractos crudos del sobrenadante"**

**Tabla 2.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de la sustancia SP de *Alteromonas* cepa N22.C.

Tiempo (min)	Temperaturas (°C)					Control(a)
	50	60	70	80	90	
10	15(b)	14	14	13	13	15
15	14	14	13	12	12	15
30	14	14	12	8	5	15
45	14	13	10	5	-	15

(a) *S. aureus* ATCC 11632; (b) halos de inhibición en mm.

**Tabla 3.** Efecto de pH en la estabilidad de la sustancia SP de *Alteromonas* cepas N11.6 y N22.C

Muestra	pH										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
N11.6	-	-	+	÷	++	++	++	++	(+)	-	-
N22.C	-	(+)	+	+	++	++	++	++	(+)	-	-

(+): actividad aparente; +: actividad débil; ++: actividad definida.

Los extractos crudos del sobrenadante (ECS) cepas en estudio presentan un amplio rango de actividad inhibitoria contra bacterias patógenas de peces y moluscos (Tabla 1). Todos los patógenos ensayados fueron inhibidos por las sustancias crudas. El patógeno de mayor sensibilidad resultó ser *Vibrio ordalii* NCMB 2167 (halo de inhibición de 18 mm de diámetro), seguida por *V. anguillarum* RP-13 (14 mm), *Vibrio alginolyticus* A32 (13 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (14 mm) y *Aeromonas hydrophila* B-35 (13 mm).

#### Estabilidad de la sustancia semipurificada frente a la temperatura y pH

Pruebas de termosensibilidad (pérdida de actividad inhibitoria) entre 50 y 60 °C hasta por 45 min no alteraron la actividad de la sustancia en estudio. A 70 °C por 45 min se ob-

serva una ligera sensibilidad de la muestra; a 80 °C por 30 min la sensibilidad es mayor y a los 45 min se produce pérdida de actividad. Finalmente a 90 °C a diferentes tiempos se observó mayor sensibilidad, aunque la pérdida total de actividad fue a los 45 min (Tabla 2), (Fig. 3).

Respecto a la acción de diferentes niveles de pH, la sustancia inhibitoria de la muestra SP permanece estable dentro del rango de 5,0 -9,0 y parcialmente sensible a pH 4,0 y 10,0; pero pierde actividad a valores extremos de pH 2,0 y 11,0 (Tabla 3).

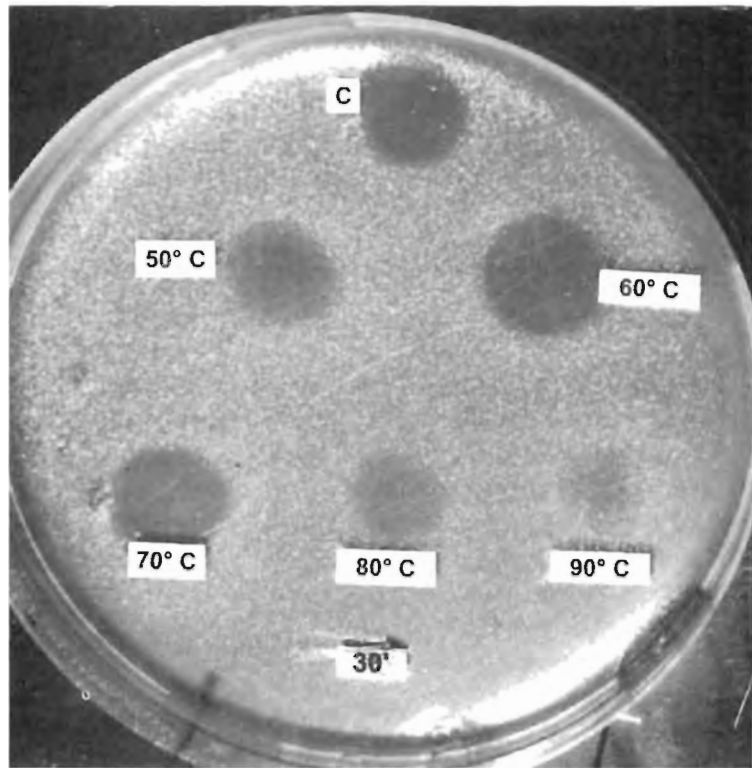
#### Actividad antibiótica comparativa de la sustancia semipurificada

En la Fig. 4 se muestran ensayos comparativos del efecto inhibitorio de la sustancia SP (cepa N22.C) y antibióticos con concentraciones conocidas frente a *V. anguillarum*

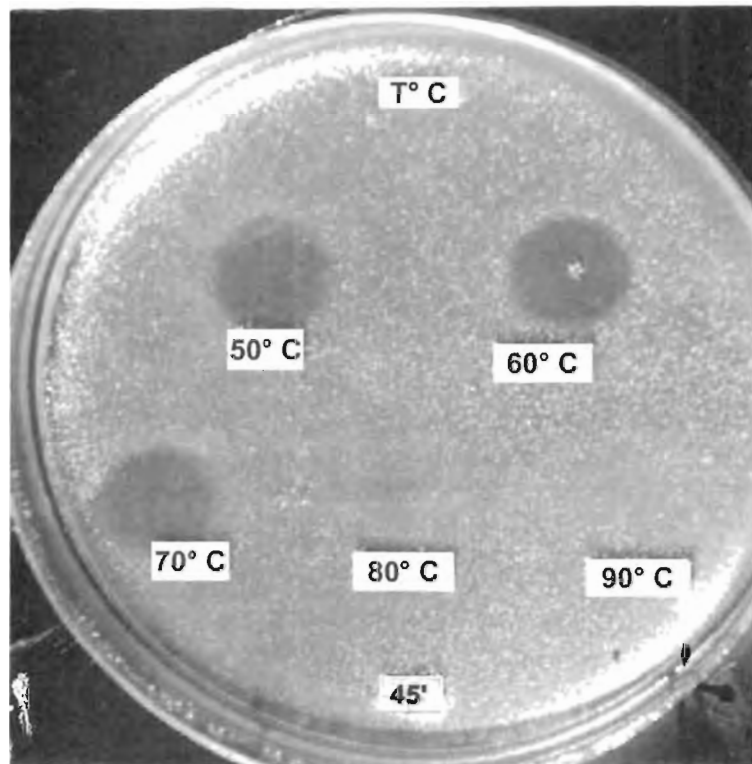
**Tabla 4.** Actividad antibiótica comparativa de la sustancia SP de *Alteromonas* cepa N22.C

Antibióticos	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
	NCMB 2133	ATCC 19264	67.79
Lincomicina (2 mg)	-	-	NP
Vibramicina (30 mg)	35 (a)	16	NP
Neomicina (30 mg)	16	18	NP
Ac. Pipemidico (20 mg)	22	20	NP
Subst. SP de N22.C (10 ml)	10	12	12
Oxitetraciclina (30 ppm)	10	13	12

(a): halo de inhibición en mm; NP, no probado; -, negativo.

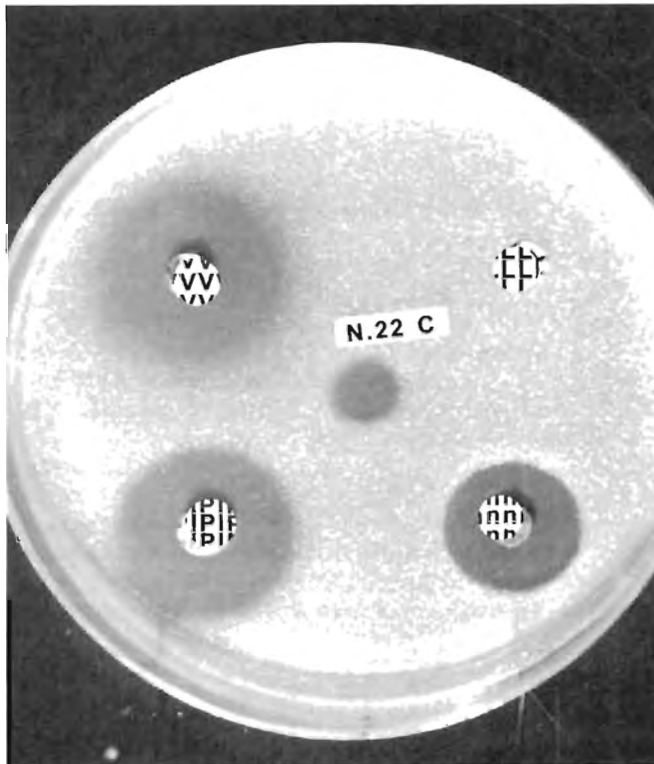


**A**



**B**

**Figura 3.** Pruebas de termosensibilidad de la sustancia SP de *Alteromonas* N22.C frente a *S. aureus* ATCC 11632; en **A**, por 30 min y en **B**, por 45 min.



**Fig. 4.** Actividad antibiótica comparativa de la sustancia SP de *Alteromonas* N22.C frente a *Vibrio anguillarum* NCMB 2133. **V**, vibramicina (30 mg); **L**, lincomicina (2 mg); **PIP**, ácido pipemídico (20 mg); **n** neomicina (30 mg); N22.C, (10 ml).

NCMB 2133\*\*. El efecto inhibitorio de la cepa N22.C (10 ml) es medianamente considerable si se compara con los antibióticos comerciales. La concentración de proteínas en los 10 ml de la muestra SP con actividad inhibitoria fue estimada, según Brown *et al.* (1989), en 36 mg. Los ensayos comparativos de la sustancia SP con soluciones de oxitetraciclina (OTC), frente a *V. anguillarum* NCMB 2133, *V. anguillarum* ATCC 19264 y *A. salmonicida* 67,79, revelaron resultados similares en actividad inhibitoria (Tabla 4). La efectividad de la sustancia SP (10 ml) fue similar a la solución de OTC de 30 ppm en los tres casos.

## DISCUSIÓN

Estudios de purificación y caracterización de las sustancias inhibitorias producidas por bacterias marinas demuestran que pueden ser variables en cuanto a su naturaleza molecular. Burkholder *et al.* (1966) determinaron la na-

turalidad química de sustancias antibacterianas producidas por cepas bacterianas marinas como compuestos bromopirrólicos, mientras que Gauthier (1976) y Gauthier & Flatau (1976) aislaron compuestos macromoleculares polianiónicos extracelulares de *Alteromonas citrea*, *A. rubra* y *A. luteo-violaceus*. Lemos *et al.* (1985) y Dopazo *et al.* (1988) aislaron compuestos inhibitorios polianiónicos extracelulares de *Alteromonas*. Ballester *et al.* (1977) aislaron y caracterizaron sustancias antibióticas de alto peso molecular, en tanto que Barja *et al.* (1989) purificaron y caracterizaron sustancias antibacterianas producidas por *Alteromonas* cepa P-31; ésta fue una macromolécula glicoproteica termolábil de 90 000 Da, con amplio espectro de actividad antimicrobiana. Así también, Riquelme *et al.* (1996) aislaron una cepa de *Alteromonas haloplanktis* con actividad inhibitoria contra vibrios patógenos de moluscos, cuya naturaleza se sugiere como un compuesto proteináceo.



En el presente trabajo se ha caracterizado parcialmente la substancia inhibitoria semipurificada encontrada en el extracto crudo extracelular (sobrenadante) de cultivos de *Alteromonas spp* cepa N22.C. Los resultados obtenidos son concordantes con los mostrados por Barja *et al.* (1989) y Riquelme *et al.* (1996). La(s) substancia(s) inhibidora(s) sólo fue(ron) parcialmente fraccionada(s) con concentraciones crecientes de sulfato de amonio hasta una saturación de 0-70%, por lo que se asume que tiene naturaleza proteínica. Otros ensayos de caracterización revelaron que la substancia inhibitoria producida por la cepa N22.C es termosensible a 90 °C en 45 min y se mantiene estable dentro de un amplio rango de pH (3,0 a 9,0). Asimismo, la actividad antibiótica de la substancia semipurificada es comparativamente equivalente a 30 ppm de oxitetraciclina en pruebas de antibiosis frente a *Vibrio anguillarum* NCMB 2133.

La substancia inhibitoria secretada por *Alteromonas sp* cepa N22.C mostró su mayor actividad antagónica en la fase estacionaria (datos no presentados), y con ello adopta el comportamiento de un metabolito secundario. Esta característica junto con la naturaleza proteínica y actividad antibacteriana de amplio espectro son concordantes con los resultados obtenidos por Lemos *et al.* (1985), Dopazo *et al.* (1988) y Riquelme *et al.* (1996) en otros aislados marinos del género *Alteromonas*.

## LITERATURA CITADA

- Andersen, R. J.; M.S. Wolfe y D.J. Faulker. 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. Mar. Biol. **27**:281-85.
- Baarn, R. B.; N.M. Gandhi y Y. M. Freitas. 1966. Antibiotic activity of marine microorganism: The antibacterial spectrum. Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuch **13**:88-91
- Ballester, M.; J. M. Ballester y J. P. Belaich. 1977. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by a marine bacterium. Microb. Ecol. **3**:289-303.
- Barja, J. L.; M. Lemos y A.E. Toranzo. 1989. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. Antimicrob. Agent and Chemoter. **33**:1673-1679.
- Bhunia, A. K.; M.C. Johnson y B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. **65**:261-268.
- Burkholder, P. R.; R.M. Pfister y F.P. Leitz. 1966. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. Appl. Microbiol. **14**:649-53.
- Brown, R. E.; K.L. Jarvis y K.J. Hyland. 1989. Protein measurement using bisinchoninic acid: elimination of interfering substance. Anal. Biochem. **180**:136-39.
- Dopazo, C. P.; M.L. Lemos; C. Lodeiros; J.J. Bolinches; J.L. Barja y A.E. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. J. Appl. Bacteriol. **65**:97-101.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. Chem. Rev. **93**:1673-83.
- Gauthier, M. J. 1969. Substances antibacteriennes produits par les bacteries marines. I, étude systématique de l'activité antagoniste de souches bactériennes marines, vis-à-vis de germes telluriques aerobios. Rev. Int. Ocean. Méd. **15-16**:41-61.
- Gauthier, M. J. 1976. *Alteromonas rubra sp. nov.* a new marine antibiotic-producing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **26**:459-66.
- Gauthier, M. J. y G.N. Flatau. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. Can. J. Microbiol. **22**:1612-19.
- Keen, J. H. 1966. Preparation and chemical properties of colicin 1. Can. J. Microbiol. **12**:425-26.
- Lemos, M. L.; A.E. Toranzo y J.L. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. Microb. Ecol. **11**:149-63.
- León, J. 1996. Cepas nativas del bacterioneuston marino con actividad antagónica frente a bacterias ictiopatógenas. Caracterización preliminar de substancias inhibitorias. Tesis Mg. Sc., Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- León, J.; P. Ramírez y M. Alcarraz. 1997. Evaluación de bacterias asociadas a invertebrados marinos y antagonismo frente a especies patógenas de peces y moluscos. En preparación.
- Lodeiros, C. J. M.; E. Fernández; A. Vélez y J. Bastardo. 1988. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente **27 (1 y 2)**:63-69

- Naclerio, G.; E. Ricca; M. Sacco y M. De Felice. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:4313-16.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; R. Araya, R.; A. Uchida; M. Satomi y Y. Ishida. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Research* **15**:369-374.
- Vignolo, G.M.; F. Suriani; P. Aída; H. De Ruíz y G. Oliver, G. 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:344-349.