

## Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos

Isabel Castillo<sup>1</sup>, César Lodeiros<sup>1\*</sup>, Maximiano Núñez<sup>1</sup> e Isabel Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Acuicultura, Dpto. Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela.

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela.

\* Autor de correspondencia Tel: +293-4302118; Fax: +293-4315902. Corel: clodeiro@sucre.udo.edu.ve; clodeiro@ci.udo.edu.ve

Recibido 25-III-2000. Corregido 25-V-2001. Aceptado 30-VII-2001.

**Abstract:** Bacteria from several groups of marine organisms were isolated and, using direct antibiograms, identified those that produce antibacterial substances, using a human pathogenic strain of *Staphylococcus aureus* ATCC6538 as revealing microorganism. Bacteria which produce substances that inhibit *S. aureus* growth were identified through morphological, physiological and biochemical tests. Out of 290 bacteria, 54 (18.6 %) inhibited the growth of *S. aureus*, but only 27 survived for identification. Bivalves, sponges and corals were the most represented from which 41.2, 33.3 and 29.7 %, respectively, produced antibacterial substances of the isolated bacteria in each group. The marine species with highest proportions of these bacteria were the hard coral *Madracis decactis* (62.5 %), the sponges *Cliona* sp. (57.1 %) and the octocoral *Plexaura flexuosa* (50.0 %). Out of the 27 strains that produced antibacterial substances, 51.8 % were *Aeromonas* spp. and 14.8 % *Vibrio* spp. Marine bacteria that produce antibacterial substances are abundant, most belong in the Vibrionacea group and were isolated mainly from corals and bivalve mollusks.

**Key words:** Antibiotic, antibacterial substances, antibiosis, marine bacteria, *Staphylococcus aureus*.

La producción de sustancias antibacterianas por parte de poblaciones microbianas en ecosistemas marinos se encuentra involucrada dentro del proceso autodepurador del mar. Estas sustancias, producto de las interrelaciones ecológicas, juegan un papel importante en el equilibrio de los microambientes marinos (De Freitas y Fredrickson 1978, Fredrickson y Stephanopoulos 1981, Lemos *et al.* 1985) y representan fuentes potenciales de selección de sustancias activas con posibilidad de ser aprovechadas por el hombre.

Una serie de investigaciones ha verificado la potencialidad de bacterias marinas para el uso profiláctico en cultivos de organismos acuáticos (Dopazo *et al.* 1988, Lodeiros *et al.* 1988, 1991, Gil *et al.* 1989, Tjahjadi *et al.* 1994, Austin *et al.* 1995), sugiriendo su aplicación como biocontroles en epizootias. Por

ejemplo, estudios en cultivo de larvas del cangrejo *Portunus trituberculatus* comprobaron que la aplicación de cepas bacterianas aisladas de las áreas de cultivo promueve una mayor tasa de supervivencia relacionada con la disminución de bacterias patógenas del género *Vibrio*, debido a la producción de sustancias antibacterianas o a la competencia interespecífica entre la bacteria utilizada (probiótico) y las patógenas (Nogami y Maeda 1992). Lodeiros *et al.* (1989b) y Riquelme *et al.* (1997), en experiencias para elaborar biocontroles de enfermedades bacterianas establecidas en criaderos larvarios ("hatcheries"), indujeron la enfermedad vibriosis en larvas de los pectínidos *Euvola ziczac* y *Argopecten purpuratus*, manteniendo los cultivos larvarios conjuntamente con otras especies de bacterias marinas y demostrando el carácter probiótico de estas últimas debido a la

inhibición del crecimiento de los gérmenes patógenos por sustancias antibacterianas. Según estos resultados, se propuso como método alternativo para el control de especies de bacterias patógenas en cultivos de vieiras, la adición de cultivos puros de bacterias aisladas del medio natural capaces de secretar sustancias inhibitorias de bacterias patógenas.

En el área de la medicina y la farmacología también se han realizado investigaciones de notable importancia basadas en el manejo de las bacterias marinas. Se ha detectado una serie de escenarios que conducen a establecer la utilidad como potenciales generadores de sustancias antibióticas, antivirales, antitumorales, de actividad enzimática y metabolitos bacterianos relativos de la inmunología básica en mamíferos, aportando conocimientos actualizados en varios tratamientos como en el cáncer (Austin 1989, Lodeiros *et al.* 1989a, Fenical 1993, Mikhajlov e Ivanova 1994, Padilla *et al.* 1996, Canedo *et al.* 1997, Imamura *et al.* 1997,

Ishida *et al.* 1997). Todas estas investigaciones proponen a las bacterias marinas como organismos atrayentes para obtener beneficios para la humanidad. Debido a ello, en el presente trabajo se evaluó la producción de sustancias antibacterianas a partir de bacterias aisladas de diferentes organismos marinos con el objeto de destacar y descartar fuentes de aislamiento de bacterias marinas en función de la búsqueda de sustancias antibacterianas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras representativas de moluscos, equinodermos, corales blandos y duros, esponjas, zoántidos, actinarios, macroalgas y fanerógamas fueron recolectadas manualmente en la Ensenada de Turpialito, Morro de Chacopata y Golfo de Santa Fe (Fig. 1) y transportadas al Laboratorio de Acuicultura del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de



Fig. 1. Ubicación geográfica de la zona de muestreo. Los recuadros indican el área de recolección.

Fig. 1. Geographical location of the sampling zone. Boxes indicate the collection area.

Oriente (IOV-UDO) en envases isotérmicos conteniendo agua de mar aireada.

Las bacterias fueron aisladas de la superficie o biopeclícula externa de los organismos mediante siembra directa con asa de inoculación en agar marino (MA, Difco). Las placas sembradas fueron incubadas a una temperatura entre los 24-27 °C, durante 2 a 6 días. Las colonias bacterianas desarrolladas fueron aisladas aplicando siembras sucesivas en MA e incubando a las mismas condiciones del proceso de aislamiento. Los cultivos puros formados fueron mantenidos en el mismo medio en nevera a 8-10 °C.

Los ensayos para la prueba de la actividad antibacteriana de las sustancias producidas por las bacterias marinas aisladas fueron realizados siguiendo la metodología de antibiosis directa según Gauthier (1976), con algunas modificaciones: el método consistió en sembrar por dise-

minación con un hisopo el germen revelador *S. aureus* ATCC6538 en una placa de Agar Tripticasa Soya (TSA, Difco), luego de 20 min fueron depositados pequeños acúmulos de los cultivos puros de las bacterias marinas. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C por un período de 18 a 24 hr. La presencia de halos de inhibición del crecimiento del germen revelador puso de manifiesto la producción de sustancias.

Las bacterias marinas generadoras del halo de inhibición fueron caracterizadas como productoras de sustancias antibacterianas e inoculadas en MA inclinado para su conservación a 24 °C. Estas cepas fueron identificadas hasta nivel de género, siguiendo los esquemas de Shewan *et al.* (1960), Yoshimizu *et al.* (1980) y Oliver (1982), mediante las pruebas de tinción de Gram, morfología y movilidad celular, reacción del citocromo c, presencia de catalasa, oxidación-fermentación de la glucosa (O/F) para bacterias marinas (Lemos *et al.* 1985), sensibilidad al compuesto O/129, producción de indol, producción de ácido sulfhídrico y luminiscencia.

## RESULTADOS

De 290 cepas de bacterias marinas aisladas, 54 (18.6 %) inhibieron al germen revelador. De los grupos de organismos estudiados, los corales y las esponjas fueron los que mayormente aportaron con cepas aisladas de bacterias productoras de sustancias antibacterianas, siendo su representación equivalente al 35.2 y 25.9 %, respectivamente, del total de bacterias aisladas de los diferentes organismos.

Los grupos con mayor proporción de cepas productoras de sustancias antibacterianas relativas al total de cepas aisladas en cada grupo (Fig. 2) fueron los moluscos bivalvos con un 41.2 %, los octocorales con el 33.3 % y los corales con 29.7 %. Los demás grupos mostraron proporciones menores del 20 %. En el caso de los equinodermos no se encontraron bacterias que inhibieran el crecimiento del germen revelador, a pesar de tener un número representativo de cepas aisladas (39).

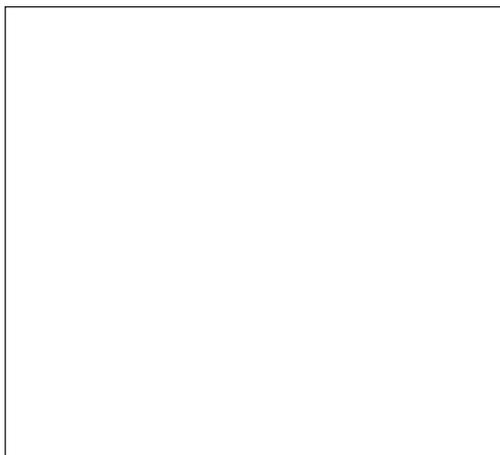


Fig. 2. Porcentaje de bacterias marinas aisladas de diferentes grupos de organismos, que produjeron sustancias que inhibieron el crecimiento en el germen revelador *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Los números en paréntesis representan el total de bacterias marinas aisladas en el grupo de organismos y el total de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas, respectivamente.

Fig. 2. Percentage of marine bacteria, isolated from different groups of marine organisms, which produce substances that inhibited the growth of the revealing strain *Staphylococcus aureus* ATCC6538. The numbers in parentheses represent respectively the total number of marine bacteria isolated in the group of marine organisms and the total number of marine bacteria that produce antibacterial substances.

CUADRO 1  
 Identificación de bacterias marinas que produjeron sustancias antibacterianas

TABLE 1  
 Identification of marine bacteria that produced antibacterial substances

GÉNEROS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS																	Color de colonias en AM
	TG	MC	KH	MC	SD	LM	HS	OG	FG	O/F	M	OX	CT	ID	TC	VB	SC	
<i>Aeromonas</i> UfSf(70)5298	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas amarillentas
<i>Aeromonas</i> NpSf(6)17298	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas amarillentas
<i>Aeromonas</i> PiSf(8)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Aeromonas</i> CISf(14)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas amarillentas
<i>Aeromonas</i> CISf(15)3398	-	B	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	Blancas
<i>Aeromonas</i> CISf(17)3398	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Aeromonas</i> HrSf(53)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Aeromonas</i> PcSf(23)27498	-	B	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	Marrones
<i>Aeromonas</i> AsSf(26)27498	-	B	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Aeromonas</i> AsSf(28)27498	-	B	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Marrones
<i>Aeromonas</i> MdSf(58)27498	-	B	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Translúcidas blanquecinas
<i>Aeromonas</i> RmET(19)2511	-	B	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Marrones
<i>Aeromonas</i> MdSf(64)27498	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Aeromonas</i> CnSf(71)27498	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Alcaligenes</i> PcSf(22)27498	-	B	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Blancas
<i>Chromobacterium</i> SnSf(30)27498	-	B	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Rojas
<i>Chromobacterium</i> PaSf(48)27498	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	Azules
<i>Flavobacterium</i> ZpSf(36)27498	-	B	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	Anaranjadas
<i>Moraxella</i> AsSf(29)27498	-	Cb	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Marrones
<i>Moraxella</i> MdSf(59)27498	-	Cb	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Translúcidas amarillentas
<i>Photobacterium</i> CISf(20)3398	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	Blancas
<i>Photobacterium</i> AsSf(25)27498	-	B	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	Blancas
<i>Pseudomonas</i> ChnSf(76)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	Translúcidas amarillentas

Continúa en la siguiente página...

Continuación del Cuadro 1...

GÉNEROS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS														Color de colonias en AM			
	TG	MC	KH	MC	SD	LM	HS	OG	FG	O/F	M	OX	CT	ID		TC	VB	SC
<i>Vibrio</i> PfSf(1)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Translúcidas blanquecinas
<i>Vibrio</i> HrSf(50)3398	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Blancas
<i>Vibrio</i> ZpSf(35)27498	-	B	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Marrones
<i>Vibrio</i> MdSf(57)27498	-	B	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Blancas

TG: tinción de Gram; MC: morfología celular; KH: KOH al 3 %; MC: agar McConkey; SD: agar SDS; LM: luminiscencia; HS: producción de H<sub>2</sub>S; OG: oxidación de glucosa; FG: fermentación de glucosa; O/F: producción de gas; M: movilidad al microscopio; OX: oxidasa; CT: catalasa; ID: indol; TC: agar TCBS; VB: vibriostato (O/129); SC: sacarosa; B: bacilos; Cb: cocobacilos; AM: agar marino.

Las especies de corales mostraron una proporción elevada de cepas productoras de sustancias antibacterianas relativa a sus cepas aisladas; así, el 62.5 % de las cepas aisladas de *Madracis decatis* produjeron inhibición del crecimiento del germen revelador y entre el 30 y 37.5 % de las cepas aisladas de las especies *Colpophyllia natans*, *Millepora alcornis*, *Porites asteroides* y *Dichocoenia estokesi* (Fig. 3a). Las especies de esponjas también presentaron una elevada proporción de bacterias productoras de sustancias antibacterianas (Fig. 3b), principalmente representantes de los géneros *Cliona* sp. (57.1 %) y *Haliclona rugosa* (33.3 %). De las demás especies estudiadas (Fig. 3c), el octocoral *Plexaura flexuosa* mostró una elevada proporción (50 %), al igual que los bivalvos *Atrina seminuda* (44.4 %) y *Lyropecten nodosus* (37.5 %) y el actinario *Condylactis gigantea* (37.5 %).

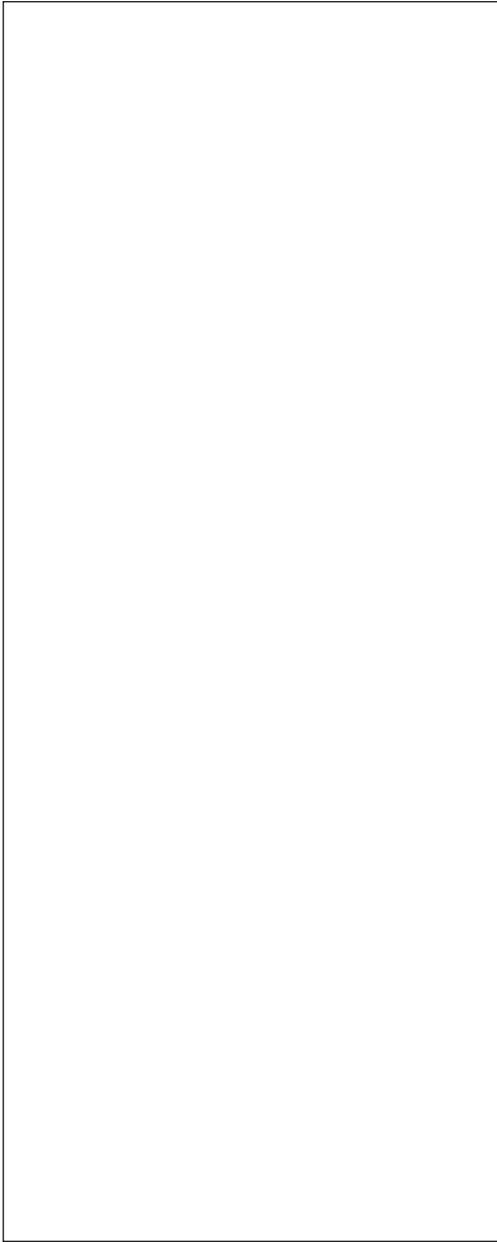
De las 54 cepas productoras de sustancias antibacterianas, tan solo 27 pudieron ser mantenidas bajo las condiciones establecidas en el presente estudio, siendo la mayor proporción (> 65 %) identificada como especies representantes del género *Aeromonas* (51.9 %) y *Vibrio* (14.8 %) (Cuadro 1).

## DISCUSIÓN

Se detectaron 54 cepas de bacterias productoras de sustancias inhibitorias de *S. aureus* (ATCC6538) que correspondieron al 18.6 % del total de bacterias aisladas. Esta proporción fue similar a la encontrada en estudios realizados en algas marinas por Lemos *et al.* (1985) y Lodeiros *et al.* (1991). Sin embargo, en estudios donde la fuente de aislamiento fue variable (Lodeiros *et al.* 1988, Sugita *et al.* 1996, 1997, Riquelme *et al.* 1997) el porcentaje se mostró notablemente menor. Ello indica que existen fuentes marinas de aislamiento que proporcionan mayor cantidad de bacterias productoras de sustancias activas que otras.

La mayor proporción de cepas bacterianas productoras de sustancias asociadas a corales y esponjas permite sugerir que probablemente parte de esas sustancias detectadas a partir de extractos de estos organismos (Reichelt y Borowitska 1984, Ballantine *et al.* 1987, Porcile *et al.* 1991, Lustigman *et al.* 1992, Jensen *et al.* 1996) sean producto de la flora bacteriana acompañante y no al extracto en su totalidad, como lo ha demostrado Faulkner *et al.* (1999).

Los moluscos bivalvos *L. nodosus* y *A. seminuda* fueron un grupo importante en el



aislamiento de bacterias productoras de sustancias antibacterianas. En contraste con nuestros resultados, Riquelme *et al.* (1997) obtuvieron un porcentaje bajo (4.9 %) de bacterias inhibidoras del germen revelador *Vibrio anguillarum*, aisladas de larvas del pectínido *A. purpuratus*. Esta menor proporción de bacterias productoras de sustancias antibacterianas puede justificarse debido a que los organismos utilizados por Riquelme *et al.* (1997) fueron larvas provenientes de cultivos en condiciones controladas en donde se cumplen estrictos controles de calidad del agua, lo cual genera una disminución importante de la flora bacteriana. Otra hipótesis alternativa podría ser la utilización de *V. anguillarum* como germen revelador por Riquelme *et al.* (1997), el cual posiblemente muestre menor sensibilidad a la actividad antibacteriana de las cepas marinas que el *S. aureus* del presente estudio, el cual es un germen muy utilizado para detectar bacterias productoras de sustancias antibacterianas debido precisamente a su alta sensibilidad a dichas sustancias. Los resultados obtenidos por Lodeiros *et al.* (1988) corroboran la existencia de una elevada actividad antibacteriana por parte de las sustancias activas, producto de bacterias marinas, sobre el germen *S. aureus* de colección utilizado en sus estudios, en relación con el germen *V. anguillarum* Epp3 aislado de epizootias larvares del bivalvo *Euvola ziczac* bajo cultivo.

De las 54 bacterias marinas que resultaron inhibidoras del crecimiento del germen revelador, solo 27 permanecieron vivas. La mortalidad de la mayoría de las cepas puede explicarse por el hecho de que las bacterias marinas se mantuvieron en una misma placa,

Fig. 3. Porcentaje de bacterias marinas productoras de sustancias que inhibieron el crecimiento en el germen revelador *Staphylococcus aureus* ATCC6538, aisladas de especies de corales (a), esponjas (b) y especies de otros grupos de organismos estudiados (c). Los números en paréntesis representan el total de bacterias marinas aisladas en el grupo de organismos y el total de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas, respectivamente.

Fig. 3. Percentage of marine bacteria, isolated from species of corals (a), sponges (b) and species of other groups studied (c), which produce substances that inhibited the growth of the revealing strain *Staphylococcus aureus* ATCC6538. The numbers in parentheses represent the total number of marine bacteria isolated in the species of marine organisms and the total number of marine bacteria that produce antibacterial substances, respectively.

por dos semanas, donde probablemente las sustancias antibacterianas de algunas difundieron a través del medio de cultivo, provocando la inhibición de la mayoría de las acompañantes. Otra explicación es la posible autoinhibición de algunas cepas por sus propias sustancias como un proceso de control poblacional (De Freitas y Fredrickson 1978, Sakata *et al.* 1986). En este sentido, algunas cepas rojas y violetas identificadas como especies pertenecientes al género *Chromobacterium* no mostraron crecimiento en su replicación, aunque sí actividad antibacteriana. Esta observación, coincide con los estudios realizados por Andersen *et al.* (1974) y Gauthier y Flatau (1976), donde se muestra que algunas cepas marinas pigmentadas, productoras de sustancias antibacterianas pertenecientes a los géneros *Chromobacterium* y *Alteromonas*, producían efectos de autoinhibición. Es probable también que las condiciones de mantenimiento de las cepas con temperaturas más bajas que las de su aislamiento e incubación pudo haber condicionado la viabilidad de las mismas. Nuestros resultados permiten recomendar la conservación de las cepas individualmente con réplicas frecuentes, evitando de esta manera la autoinhibición, así como mantener las mismas a la temperatura del proceso de aislamiento.

Dentro del grupo de bacterias sobrevivientes, inhibidoras del germen revelador, se obtuvo una predominancia de los géneros *Aeromonas* (51.9 %) y *Vibrio* (14.8 %); a diferencia, Lodeiros *et al.* (1988) encontraron, para un grupo de bacterias con características similares, una predominancia de los géneros *Alteromonas* (33.3 %) y *Flavobacterium* (20.8 %) y Riquelme *et al.* (1997) informaron *Vibrio* en un 81.8 % y *Pseudomonas* en un 18.2 %. Estos resultados posiblemente son inherentes a las diferentes fuentes de aislamiento utilizadas, las cuales normalmente poseen diferentes floras bacterianas asociadas, sin menospreciar las variantes geográficas y evolutivas de los aislados en los diferentes trabajos.

Nuestros resultados corroboran la potencialidad que poseen los microambientes marinos

para el aislamiento de bacterias productoras de sustancias activas con posibles beneficios para el hombre, por lo cual se recomienda continuar la búsqueda de bacterias marinas con dichas capacidades hacer investigaciones subsiguientes para la elaboración de posibles fármacos. La utilización de bacterias en este campo posee ventajas sobre otros organismos como muchos invertebrados, de los cuales se pretende aislar sustancias activas, ya que se manipulan y adaptan más fácilmente, incrementando la producción por estrategias de cultivo o aislando la secuencia genética responsable de la producción de la sustancia activa y reproduciéndola en otros sistemas microbianos más adecuados para la producción. Son también adecuadas para realizar copias sintéticas de sus sustancias activas, ya que el cultivo podría permitir obtener biomásas para los análisis respectivos corriendo menos riesgo de producir daños ecológicos en los ecosistemas marinos.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Dpto. de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente (IOV-UDO). Se agradece la colaboración técnica prestada por el personal de la Estación Hidrobiológica de Turpialito, perteneciente al IOV-UDO, a M. Amaro, por su colaboración en la identificación de los invertebrados marinos, en especial en el grupo correspondiente a las esponjas y a los revisores anónimos por mejorar notablemente el artículo.

#### RESUMEN

Se realizaron antibiogramas directos para detectar la presencia de bacterias productoras de sustancias antibacterianas aisladas de diferentes organismos marinos, utilizando el patógeno de humanos *Staphylococcus aureus* ATCC6538 como germen revelador. A las bacterias que produjeron sustancias inhibidoras del crecimiento del germen revelador se les realizó pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en función de identificarlas a nivel de género. De un total de 290 cepas 54 (18.6 %) inhibieron el crecimiento del germen revelador, pero sólo 27 se mantuvieron

viabiles. Los grupos más representativos de donde se aislaron las bacterias productoras de sustancias antibacterianas fueron los moluscos bivalvos, las esponjas y corales, presentaron un 41.2, 33.3 y 29.7 %, respectivamente, de bacterias productoras relativas al número de sus aislados. Los organismos que presentaron una mayor proporción de bacterias inhibidoras del germen revelador se aislaron del coral *Madracis decactis* (62.5 %), la esponja *Cliona* sp. (57.1 %), y el octocoral *Plexaura flexuosa* (50.0 %). De las 27 cepas productoras de sustancias antibacterianas que se identificaron, 51.85 % pertenecieron al género *Aeromonas* y 14.8% al género *Vibrio*. Los resultados muestran la abundancia de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas, la mayoría de ellas pertenecientes al grupo de las vibrionáceas principalmente aisladas de corales y moluscos bivalvos.

#### REFERENCIAS

- Andersen, R., M. Wolfe & D. Faulkner. 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. *Mar. Biol.* 24: 281-285.
- Austin, B. 1989. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 461-470.
- Austin, B., L. Stuke, P. Robertson, I. Effendi & D. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish. Dis.* 18: 93-96.
- Ballantine, D., W. Gerwick, S. Velez, E. Alexander & P. Guevara. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiology.* (151-152): 463-469.
- Canedo, L., J. Puentes, J. Baz, C. Acebal, F. De la Calle, D. Gravalos & T. De Quesada. 1997. PM-94128, a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. *J. Antibiot.* 50: 175-176.
- De Freitas, M. & G. Fredrikson. 1978. Inhibition as a factor in the maintenance of the diversity of microbial ecosystems. *J. G. Microbiol.* 106: 307-320.
- Dopazo, M., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja & A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 97-101.
- Faulkner D., C. Bewley, C. Salomon, E. Schmidt & M. Unson. 1999. Production of bioactive metabolites by symbiotic microorganisms in marine sponges. 29va reunión ALMC, IOV-UDO, Cumaná, Venezuela. p. 22.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria developing a new resource. *Chem. Rev.* 93: 1673-1683.
- Fredrickson, A. & G. Stephanopoulos. 1981. Microbial competition. *Science* 213: 972-979.
- Gauthier, M. 1976. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26 : 459-466.
- Gauthier, M. & G. Flatau. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.* 22: 1612-1619.
- Gil, M., M. Hay & W. Fenical. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustaceans embryos from a pathogenic fungus. *Science.* 246: 116-118.
- Ishida, K., H. Matsuda, M. Murakami, & K. Yamaguchi. 1997. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Natur. Prod.* 60: 724-726.
- Imamura, N., M. Nishijima, T. Takadera, K. Adachi, M. Sakai & S. Sano. 1997. New anticancer antibiotics pelagiomycins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. *J. Antibiot.* 50: 8-12.
- Jensen, P., C. Harvell, K. Wirtz & W. Fenical. 1996. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Mar. Biol.* 125: 411-419.
- Lemos, L., A. Toranzo & J. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecol.* 11: 149-163.
- Lodeiros, C., E. Fernandez, A. Velez & J. Bastardo. 1988. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela Univ. Oriente* 27: 63-69.
- Lodeiros, C., A. Espín, Y. Ordaz y C. González, C. 1989a. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas en humanos. *Acta. Cien. Venezolana.* 40: 254-256.
- Lodeiros, C., L. Freitas, E. Fernández, A. Vélez & J. Bastardo. 1989b. Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente* 28: 165-169.
- Lodeiros, C., Y. Campos & N. Marín. 1991. Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. *Soc. Cien. Natur. La Salle* 60: 213-223.

- Lustigman, B., L. Lee, N. Thees & J. Masucci. 1992. Production antibacterial substances by macroalgae of the New York/New Jersey coast, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 743-749.
- Mikhajlov, V. & E. Ivanova. 1994. Bacteria of the genus *Alteromonas*: Systematic, physiologically active compound. *Mar. Biol.* 20: 171-180.
- Nogami, K. & M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2373-2376.
- Oliver, J. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Res.* 29: 795-798.
- Padilla, C., P. Brevis, O. Lobos & E. Hubert. 1996. Bacteriocin activity of *Pseudomonas* sp. on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 371-374.
- Porcile, P., R. Bandelloni, D. Tiberti & F. Mandolini. 1991. Biologically active compounds in some algae and their interactions with marine bacteria: the ecological role. *Oebalia* 17: 455-265.
- Reichelt, J. & M. Borowitska. 1984. Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. *Hidrobiologia* 116-117: 159-169.
- Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita & M. Candia. 1997. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- Sakata, T., K. Sakaguchi & D. Kakimoto. 1986. Antibiotic production by marine pigmented bacteria. II. Purification and characterization of antibiotic substance of *Alteromonas luteoviolacea*. *Mem. Fac. Fish.* 35: 29-37.
- Shewan, J., G. Hobbs & D. Hodkiss. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of gram negative bacteria with especial reference to Pseudomonadacea. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 379-390.
- Sugita, H., K. Shibuya, H. Shimooka & Y. Deguchi. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145: 195-203.
- Sugita, H., K. Shibuya, H. Hanada & Y. Deguchi. 1997. Antibacterial abilities of intestinal microflora of the river fish. *Fish. Sci.* 63: 378-383.
- Taylor, G. & J. Gulnick. 1996. Enhancement of marine bacterial growth by mineral surfaces. *Can. J. Microbiol.* 42: 911-918.
- Tjahjadi, M., S. Angka & A. Suwanto. 1994. Isolation and evaluation of marine bacteria for biocontrol of luminous disease in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon* Fab.). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2: 347-352.
- Yoshimizu, M., T. Kimura & M. Sakai. 1980. Microflora of the embryonic and the fry salmonids. *Bull. Japan. Sci. Fish.* 46: 967-975.

