

Metabolitos Antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS: Influencia de la Fuente de Carbono en la Síntesis

Alina Frias, Pilar María Villa, Esmérida Torres

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca # 804 esq. Carretera Central. San Miguel del Padrón. Ciudad de La Habana. Cuba Apartado Postal 4026.

E-mail: alinafrias2001@yahoo.es

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, metabolitos antimicrobianos, fermentación, fuente de carbono.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial metabolites, fermentation, carbon sources

RESUMEN

Considerable atención ha recibido el uso de metabolitos de *Pseudomonas* para el control de fitopatógenos. Las bacterias pertenecientes a este género producen una amplia variedad de metabolitos antimicrobianos y la obtención de éstos por métodos biotecnológicos está altamente influenciada por parámetros fermentativos. En el presente trabajo se estudió la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de dichos compuestos en *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. Los mejores resultados se obtuvieron con glicerol y ácido glutámico como fuentes de carbono, demostrando la alta influencia de este factor sobre la producción de metabolitos antimicrobianos.

ABSTRACT

Considerable attention has received the use of metabolites from *Pseudomonas* as plant pathogens control. Bacteria belonging to the *Pseudomonas* genus produce a wide diversity of antimicrobial metabolites and its production by biotechnological methods is strongly influenced by fermentative parameters. In this work the influence of carbon sources over antimicrobial metabolites synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* PSS strain, was studied. The best results were obtained with glycerol and glutamic acid as carbon sources, which showed a remarkable influence on antimicrobial metabolites production.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la tendencia mundial es hacia la disminución del uso de plaguicidas químicos, en el control de plagas y enfermedades que atacan los cultivos agrícolas; por lo que se buscan métodos alternativos, entre los que se encuentran los biológicos, con el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos para el tratamiento de enfermedades provocadas por fitopatógenos, con vistas a la protección ambiental y aumentar la productividad en la agricultura. (Pérez, 2004; Stefanova *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1995)

Entre los microorganismos empleados en el control biológico, se destacan las especies del género *Pseudomonas*, por su gran versatilidad de producir metabolitos secundarios antimicrobianos, como: sideróforos y antibióticos, los cuales pertenecen a grupos de compuestos químicamente definidos y con funciones biológicas específicas, contra hongos fitopatógenos como: *Alternaria alternata*, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Alemany, 2002; De Souza *et al.*, 2003;

Villa, 1999; Duffy & Défago, 1997; Stefanova *et al.*, 1995; Thomashow & Weller, 1998; Howie & Suslow, 1991; Gutterson, 1990).

Estos metabolitos son producidos durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano y su producción depende de las condiciones de cultivo, siendo los parámetros nutricionales de gran importancia, reconociéndolos como la llave para incrementar los niveles de producción de los metabolitos (Alemany, 2002; Frias, 2003; Duffy & Défago, 1999; Ownley *et al.*, 1992), con el fin de obtener productos comerciales, por lo que para lograr un proceso industrial económicamente factible, el medio de producción debe ser menos complejo y viable, con vistas a abaratar los costos de obtención del producto.

Dado estos antecedentes, en este trabajo se presentan resultados del estudio de la influencia de la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos empleados

Pseudomonas aeruginosa cepa PSS y *Alternaria alternata*, procedentes de la colección de cultivos del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y del Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) respectivamente.

Medios y condiciones de cultivo

P. aeruginosa cepa PSS, fue conservada por liofilización y en placas de King B Agar (King *et al.*, 1954) a 27°C, mientras que el hongo fue crecido sobre placas de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Difco, Detroit, MM1) a 27-30°C.

Influencia de la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos

Para ello se evaluaron 9 fuentes de carbono de orígenes diferentes a una concentración de 10 g L⁻¹, las cuales se relacionan a continuación: Glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, glutámico, glicerol, maltosa, soya y Biopla (Medio residual en la producción de melagenina) (Fernández, 1998). Como fuente de nitrógeno se empleó urea (0.85 g L⁻¹) y como fuente de fósforo el K₂HPO₄ (0.56 g L⁻¹) (Villa, 1999). Todos los medios fueron ajustados con NaOH (0.1N) a pH 7 al inicio de la fermentación.

Desarrollo del inóculo

De un cultivo de 24 h crecido sobre Placa Petri con King B agar, se tomaron 10 colonias y se transfirieron a un matraz de 250-mL con invaginación que contenía 50 mL de King B caldo, el cual se incubó en zaranda rotatoria durante 8 h a 30°C y 175 rpm para desarrollar las células (Villa, 1999; Frias, 1997). Finalmente se empleó como inóculo, otro matraz de igual capacidad conteniendo 90 mL de King B caldo inoculado en una relación de 1:10 e incubado 18 h a 175 rpm y 30°C (Frias, 1997).

Condiciones de Fermentación

El inóculo fue transferido en una relación de 1:10 a matraces invaginados de 250-ml de capacidad que

contenían 90 ml de los medios con las distintas fuentes a estudiar. Se incubaron por triplicado en zaranda rotatoria durante 24 h a 30°C pH 7 y 175 rpm (Frias, 1997).

Análisis realizados

Crecimiento: Mediante densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro OPTON PM 2^a.

pH: Las determinaciones de pH se realizaron en pH metro Pacitronic MV 870.

Sideróforos: Se determinaron por un método espectrofotométrico, conociendo el coeficiente de absorción molar E=2000 L M⁻¹ cm⁻¹ (Villa *et al.*, 1995).

Determinación de azúcares por cromatografía de fase reversa (HPLC)

Las muestras del caldo fermentado (100 mL) se centrifugaron, filtraron e inyectaron directamente al sistema cromatográfico. Los perfiles cromatográficos se obtuvieron en un cromatógrafo líquido isocrático con un detector de índice de refracción. Se empleó una columna cromatográfica SUPERCOSIL LC-NH₂, 5 μm, 250 x 4.5, con una pre-columna SUPERCOSIL LC-NH₂, 5 μm y válvula de inyección RHEODYNE, con lazo de 20 μl. Como fase móvil se empleó acetonitrilo:agua 80:20, con flujo de 2 ml min⁻¹. La concentración de los azúcares se calculó mediante el programa BIOCROM por el método estándar externo.

Determinación de consumo de glicerol y glutámico

Estos compuestos se determinaron por cromatografía de fase reversa (HPLC), según la técnica desarrollada en el ICIDCA por Villa *et al.* (1999).

Producción, extracción y actividad antifúngica del crudo

El caldo final (24 h) obtenido por fermentación (100 mL) se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm. Del sobrenadante se tomaron 8 mL y fueron llevados hasta pH 3 con HCl 1N y extraídos 3 veces con 1.4 mL de acetato de etilo cada vez. Se centrifugó y la fracción orgánica se evaporó hasta sequedad en estufa al vacío a 45°C para cuantificar el principio activo en base a peso seco (mg L⁻¹) (Villa, 1999).

Ensayos in vitro

Se llevaron a cabo mediante ensayos de actividad antibiótica por la técnica del envenenamiento del medio

de cultivo en Agar Papa Dextrosa (PDA); frente al hongo fitopatógeno *A. alternata*. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial comparado con un testigo y las mediciones se realizaron a las 48 h (Frias, 2003; Villa, 1999; Bagnasco *et al.*, 1998).

Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron procesados por el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows, versión 5.0, Copyright by Statistical Graphics Corp.1994-2000.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la obtención de metabolitos antimicrobianos a partir de *P. fluorescens*, la fuente de carbono juega un importante emplear en el medio en que éstas se van a desarrollar, por lo que todo estudio relacionado con su efecto es indispensable para la producción de los mismos en condiciones de cultivo (Frias, 2003; Villa *et al.*, 2002, 2001; Duffy & Défago, 1997; Slininger *et al.*, 1996).

El efecto que ejercen las diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento celular y la velocidad específica de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PSS, se presentan en la Fig. 1. En la misma se observa que la fase estacionaria se alcanza a las 8 h para los medios glutámico y glicerol y para la glucosa a las 10 h, mientras que los medios Biopla, soya, sacarosa, lactosa, almidón y maltosa apenas propiciaron el crecimiento de la cepa PSS.

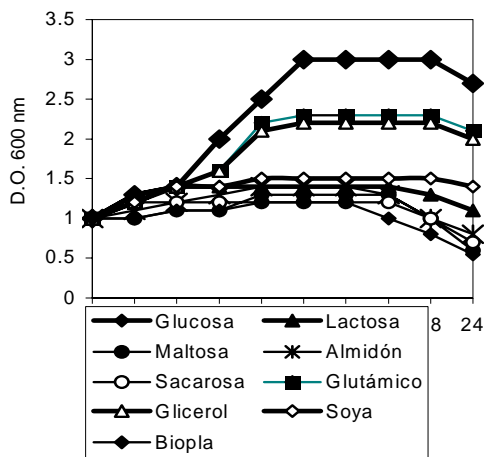


Fig. 1. Dinámica de crecimiento de la cepa PSS de *P. aeruginosa* con las 9 fuentes de carbono evaluadas, 30°C, 175 rpm (n= 3, desviación estándar= 0.03).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Villa (1999), Fernández (1998) y Frías (1997), con la misma cepa en los medios con glucosa, glutámico y Biopla.

Las fuentes de carbono estudiadas influyen sobre el crecimiento de la cepa de modo diferente, alcanzando la máxima velocidad específica de crecimiento en el medio con glucosa ($\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$), seguido de los medios glutámico y glicerol con una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$ y $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, sustratos como: soya, sacarosa, lactosa, almidón, maltosa y el medio residual de melagenina denominado Biopla (Tabla 1), reportan los valores más bajos ($\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$).

Tabla 1. Resultados de la influencia de las fuentes de carbono sobre el pH y la velocidad específica de crecimiento (μ) en *P. aeruginosa* cepa PSS.

Fuentes de Carbono	pH	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Glucosa	3.4	0.30
Lactosa	8.6	0.06
Maltosa	8.7	0.05
Almidón	8.5	0.05
Sacarosa	8.6	0.06
Glutámico	8.9	0.22
Glicerol	7.9	0.20
Soya	8.7	0.05
Biopla	8.8	0.05

Según el análisis de varianza (ANOVA), las fuentes de carbono estudiadas influyen significativamente sobre el crecimiento celular para un nivel de confianza del 99% (Datos no mostrados). Por su parte, el test de Duncan evidenció la diferencia significativa existente entre las fuentes de carbono, destacándose los medios con glucosa, glutámico y glicerol para un $\mu = 0.05$ (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono y el crecimiento microbiano

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glucosa	2.70	A
Glutámico	2.10	B
Glicerol	1.90	B
Maltosa	1.39	C
Soya	1.39	C
Lactosa	1.33	C
Almidón	1.21	C
Sacarosa	1.12	C
Biopla	1.10	C

(n= 3) ($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no difieren significativamente)

Estos resultados indican que la cepa PSS logra un mayor crecimiento al emplear un azúcar simple como la glucosa, siendo fácilmente asimilable por los microorganismos, según el principio de economía celular (Fernández, 1998).

Los niveles medio de crecimiento obtenidos con glutámico como fuente de carbono, se justifican al ser convertidos los aminoácidos a α -ceto ácidos mediante desaminación oxidativa, siendo incorporados directamente al ciclo de Krebs, así como el glicerol se fosforila y oxida a dihidroxiacetona fosfato, que a su vez se isomeriza a gliceraldehído-3 fosfato, siendo éste un compuesto intermediario que se encuentra tanto en la vía glicolítica como en la gluconeogénica (Stryer, 1995).

Por otra parte, los bajos niveles de crecimiento obtenidos con disacáridos como fuente de carbono, así como el Biopla y la harina de soya, pudieran estar relacionados con su asimilación. Debido a la complejidad de su estructura, éstos requieren de una previa hidrólisis enzimática, llevándolos a unidades individuales de monosacáridos para ser transportados al interior de la membrana citoplasmática (Doudoroff & Palleroni, 1984).

La Fig. 2 muestra la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de metabolitos sideróforos, donde el valor máximo alcanzado se produjo en el medio glutámico con $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguido de glicerol ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$). Los niveles de producción en las restantes

fuentes no sobrepasan los $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. En los medios donde se empleó lactosa, almidón, maltosa sacarosa, la síntesis de sideróforos fue baja, coincidiendo con lo reportado por Slininger *et al.* (1996) y en el que contiene glucosa, se reporta el nivel más bajo de producción de sideróforos, lo que confirma lo planteado por Villa (1999).

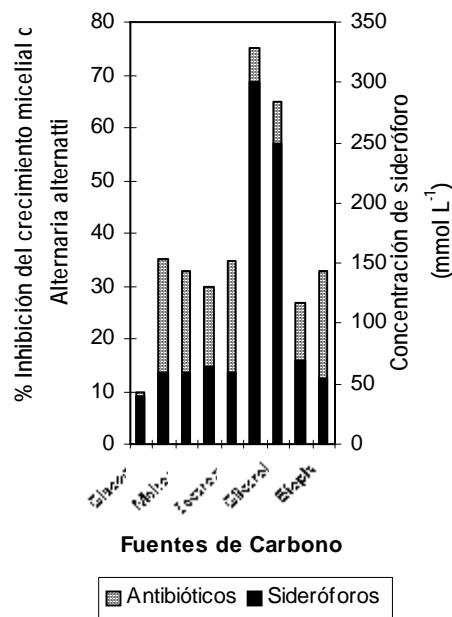


Fig. 2. Influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de metabolitos sideróforos y antibióticos en *P. aeruginosa* cepa PSS a las 48 h. (n= 3, desviación estándar= 1.16)

El análisis de varianza realizado a las fuentes de carbono sobre la producción de sideróforos muestra la diferencia significativa para un 99% de confianza entre los componentes (Datos no mostrados).

El test de Duncan refleja coincidencias entre grupos como son los casos de lactosa-maltosa-Biopla-sacarosa soya-almidón, siendo los medios glutámico, glicerol y glucosa los que mayor diferencias significativas presentaron para un $\alpha= 0.05$ (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono sobre la producción de sideróforos.

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glutámico	300.0	a
Glicerol	250.0	a
Almidón	61.6	b
Soya	61.6	b
Lactosa	53.3	b
Maltosa	51.6	b
Biopla	51.6	b
Sacarosa	50.0	b
Glucosa	36.6	b

(n= 3)($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no presentan diferencias significativas)

Estudios realizados por Nowak-Thompson *et al.* (1994), plantean que la glucosa favorece o desfavorece, según el metabolito a obtener. Particularmente, la cepa PSS prefiere un combustible fácilmente fermentable como la glucosa para su crecimiento, sin favorecer la producción de metabolitos sideróforos, posiblemente por la formación de ácido glucónico (Lehninger, 1981), si tenemos en cuenta que el pH final de la fermentación alcanza valores bajos (3.4), mientras que con las restantes fuentes de carbono, se mantuvo entre 7.9 y 8.9 (Tabla 1). Otros autores plantean que la síntesis de metabolitos antimicrobianos es sensible a pH ácidos, mostrando una pronunciada dependencia de éste parámetro (Díaz de Villegas, 1999; Budzikiewicz, 1997; Torres *et al.*, 1986 y Meyer & Abdallah, 1978). Otros plantean que los sideróforos pueden indirectamente estimular la biosíntesis de otros compuestos antimicrobianos (Leeman *et al.*, 1996).

En trabajos realizados por Slininger & Shea-Wilbur (1995) con la cepa *Pseudomonas fluorescens* 2-79 se obtuvo un rango de pH entre 7 y 8 como óptimo para el ácido 1-carboxilo fenacina en el medio glucosa con urea. Sin embargo, en nuestro trabajo con *P. aeruginosa* PSS, no se incrementa el pH como sucede con las otras fuentes, confirmando que la cepa PSS sólo utiliza la glucosa para

su crecimiento y como resultado del metabolismo produce ácido, que no inhibe el crecimiento del hongo, por lo que no es un sustrato para obtener metabolitos con fines fitosanitarios.

Por otra parte, estudios realizados por Duffy & Défago (1999), plantean que la producción de sideróforos como el piochelin es incrementada en medios con glucosa como fuente de carbono, así como, el ácido salicílico por glicerol y glucosa, afirmando que la fuente de carbono juega un papel importante en la obtención de dichos metabolitos. Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron los mejores resultados con ácido glutámico y glicerol, coincidiendo ambos medios con los resultados obtenidos en la producción de metabolitos antibióticos tal como se observa en la Fig. 2, donde se llega a alcanzar una inhibición del crecimiento micelial del hongo *A. Alternata* del 75-65% respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza de los resultados (ANOVA), se comprobó que en la producción de metabolitos antibióticos, influye significativamente la fuente de carbono empleada, para un 99% de confianza (Datos no mostrados).

Según el test de Duncan, las fuentes de carbono muestran diferencias significativas, donde los medios glutámico y glicerol, registran los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo *A. alternata* (Tabla 4) (Fig. 2).

Tabla 4. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono sobre la producción de metabolitos antibióticos.

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glutámico	75.3	a
Glicerol	65.5	a
Lactosa	35.3	b
Sacarosa	35.3	b
Maltosa	32.6	b
Biopla	32.6	b
Almidón	31.3	b
Soya	28.6	b
Glucosa	10.6	c

(n= 3)($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no difieren significativamente)

Entre los factores que incrementan la producción de metabolitos sideróforos y antibióticos está el suplemento de aminoácidos al medio, encontrando que el ácido glutámico es una de las fuentes de carbono más empleadas al aportar carbono y nitrógenos al medio (Frias, 2003; Slininger & Shea Wilbur, 1995; Casida, 1992).

En términos regulatorios, la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios es positivamente controlada por el sistema de dos componentes GacS/GacA (Heeb & Haas, 2001). Este sistema de regulación consiste en una proteína sensor quinasa alrededor de la membrana (GacS) y una proteína reguladora de la respuesta citoplasmática (GacA). El modelo propuesto es que GacS reconoce una estimulación ambiental específica y activa a GacA disparando la expresión del gen específico (Pernestig *et al.*, 2001; Appleby *et al.*, 1996). Muchos elementos pueden estar involucrados en la regulación de genes para la biosíntesis de antibióticos, formando un complejo regulatorio en cascada, con el par *gacS/gacA* ejerciendo control a alta jerarquía (Blumer & Haas, 2000; Chancey *et al.*, 1999; Sarniguet *et al.*, 1995). Se ha reportado que las mutaciones en *gacS* o *gacA* eliminan la producción del 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pioluterion (PLT), pirrolnitrin (PRN) y fenacina (PHZ) (De Souza & Raaijmakers, 2002).

Finalmente, es conocida la gran versatilidad metabólica que presenta el género *Pseudomonas*, que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono sustratos muy variados para la producción de compuestos antimicrobianos, por ejemplo: trabajos realizados por Shanahan *et al.* (1993), observaron que la síntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol en *Pseudomonas* sp. cepa F113, fue estimulada por manitol o sacarosa, pero no por glucosa. Otros autores plantean que la síntesis de pioluterin por *P. fluorescens* Pf-5, está disminuida en presencia de glucosa y en *P. fluorescens* HV-37^a, la producción de oomicina está presente cuando la glucosa es la fuente de carbono (Kraus & Loper, 1995). Sin embargo, Alstrom (1987) y James & Gutterson (1986), plantearon que los microorganismos frecuentemente prefieren una fuente de carbono específica para la producción de un metabolito secundario en particular.

En este estudio con la cepa *P. aeruginosa* PSS, se demostró la influencia significativa que ejerce la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos tales como sideróforos y antibióticos, donde los mejores resultados fueron obtenidos con los medios glicerol y glutámico. Todo lo cual brinda una alternativa importante en la obtención de medios de producción de metabolitos más económicos.

REFERENCIAS

- Alemaný J (2002) Caracterització de metabòlits produïts per soques de "*Pseudomonas fluorescens*" efectives en el control biològic de fongs fitopatògens. Tesis de grado de Doctor en Ciències. Universitat de Girona. España.
- Alstrom S (1987) Factors associated with determinant effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant Soil*. 102: 3-9.
- Appleby JL, Parkinson JS & Bourret RB (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845-848.
- Bagnasco P, De La Fuente L, Gualtieri G, Noya F & Arias A (1998) Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1317-1322.
- Blumer C & Haas D (2000) Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Microbiol.* 146: 2417-2424.
- Budzikiewicz H (1997) Siderophores from fluorescent *Pseudomonas*. In: Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman B.V (ed), Vol. 19, Elsevier Science, pp. 793-835.
- Casida LEJR (1992) Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2 a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 32-37.
- Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Banger G & Kim DS (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4197-4201.
- Chancey ST, Wood DM & Pierson III LS (1999) Two-component transcriptional regulation of N-acyl-

- homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2294-2299.
- De Souza JT, Weller DM & Raaijmakers J (2003) Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in dutch take-all decline soils. *Phytopathol.* 93: 54-63.
- De Souza JT & Raaijmakers JM (2002) Polymorphisms within the *prnC* and *pltD* genes of pyrrolnitrin and pyoluteorin producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 21-34.
- Díaz de Villegas ME (1999) Evaluación de la producción de sideróforos por cepas de *Pseudomonas* spp. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Doudoroff M & Palleroni NJ (1984) Gram-negative aerobic rods and cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Part 7. Eight Edition. Cowan ST, Holt JG, Liston J, Murria RGE, Niven CF, Ravin AW & Stanier RY (Eds). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 217-223.
- Duffy BK & D'efago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.
- Duffy BK & D'efago G (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium crown* and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathol.* 87: 1250-1257.
- Fernández Y (1998) Evaluación de diferentes medios para la producción de metabolitos secundarios a partir de dos cepas de *Pseudomonas* sp. Trabajo de grado de Licenciada en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Frias A (2003) Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en la síntesis de metabolitos antimicrobianos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS y su aislamiento. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Frías A (1997) Evaluación de diferentes factores que influyen en la producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas fluorescentes* para su uso en el control biológico. Trabajo de grado de Licenciada en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Gutterson N (1990) Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanism. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 69-91.
- Heeb S & Haas D (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1351-1363.
- Howie WJ & Suslow TV (1991) Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399.
- James DW & Gutterson NI (1986) Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37 and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1183-1189.
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kraus J & Loper JE (1995) Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 849-854.
- Leeman M, Den Ouden FM, Van Pelt JA, Dirx FPM, Steijl H, Bakker PAHM & Schippers B (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* 85: 149-155.
- Lehninger AJ (1981) Rutas metabólicas y de transferencia de energía. Panorámica del metabolismo intermediario. En Bioquímica. Capítulo 14 (Edición Pueblo y Educación) Ciudad de La Habana, Cuba., pp. 371-392.
- Meyer JM & Abdallah MA (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*. Biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Nowak-Thompson BS, Gould J, Kraus J & Loper JE (1994) Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by

- the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.* 40: 1064- 1066.
- Ownley BH, Weeler DM & Thomashow LS (1992) Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* 82: 178-184.
- Pérez CN (2004) Control biológico de patógenos vegetales. *En: Manejo Integrado de Plagas*. García Marrero A (ed). Editorial CEDAR, Cuba., pp. 231-354.
- Pernesting A-K, Melefors O & Georgellis D (2001) Identification of *uvrY* as the cognate response regulator for the *barA* sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 225-231.
- Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM & Loper JE (1995) The sigma factor σ^s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12255-12259.
- Shanahan P, Glennon JD, Crowley JJ, Donnelly DF & O'Gara F (1993) Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. *Anal. Chim. Acta* 272: 271-277.
- Slininger PJ, Van Cauwenberger JE, Bothast RJ, Weller DM, Thomashow LS & Cook RJ (1996). Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 391-398.
- Slininger PJ & Shea-Wilbur MA (1995) Liquid-culture, pH, temperature and carbon (not nitrogen) source regulated phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 994-800.
- Stefanova M, Muiño B, Espino M & Pérez I (1995) Efecto de un biopreparado de *Pseudomonas* sp. sobre patógenos foliares en tabaco, papa, tomate y pimiento. *En: Avances en biotecnología moderna II*. Arrieta J (ed). Editorial Elfos Scientiae. Habana' 95, Cuba., p. 37.
- Stryer L (1995) Bioquímica. Cuarta Edición, Tomo II. Capítulo 24. Editorial Reverté S.A. Barcelona., pp. 606-607.
- Thomashow LS & Weller DM (1998) Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170: 3499-3508.
- Torres L, Pérez-Orten JE, Tordera V & Beltrán JP (1986) Isolation and characterization of an Fe(III)-chelating compound produced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 157-160.
- Villa P, Alfonso I & Frías A (2002) Efectividad del producto biológico GLUTICID en el control de hongos fitopatógenos *Curvularia senegalensis* y *Curvularia gudauskasii* que atacan las semillas botánicas de la caña de azúcar. *Memorias de Diversificación 2002*. Tomo I Roselló S, Infante L, Martín A & García A (eds). Editorial ICIDCA, Cuba., pp.114-118.
- Villa P, Diaz de Villegas ME, Stefanova M & Michelena G (2001) Proceso biotecnológico para la producción de un fungicida a partir de *Pseudomonas* sp, cepa PSS. *Primer Concurso Latinoamericano en Innovación de tecnologías ecológicas para el agro*. Gomero L & Tazza M (eds). Lima, Perú., pp.64-74.
- Villa PM (1999) Producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas* fluorescentes para su uso en el control biológico de hongos fitopatógenos. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Villa P, Díaz de Villegas ME, Stefanova M & Zayas O (1995) Obtención de un biopreparado efectivo contra hongos fitopatógenos a partir de *Pseudomonas* sp. cepa PSS como agente de control biológico. *Avances en Biotecnología Moderna II*. Arrieta J (ed). Editorial Elfos Scientiae, Habana' 95, Cuba., p. 41.