

## EVALUACION DE METODOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES NATIVOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE SOBRE BACTERIAS Y LEVADURA PATOGENAS

### EVALUATION OF METHODS FOR MEASURING THE INHIBITORY ACTIVITY OF NATIVE PLANT EXTRACTS ON SUCRE DEPARTMENT OF BACTERIA AND YEAST PATHOGENS

PEREZ C., ALEXANDER. .Ph.D<sup>1\*</sup> ROJAS S., JOHANNA. M.Sc<sup>2</sup> RODRIGUEZ JOHANA M.Sc<sup>3</sup> DONCEL M., ARTURO Zoct<sup>4</sup> ARRIETA A., IRMA Biol.<sup>5</sup> ARRIETA A., JENNY Biol.<sup>6</sup> MARTINEZ A., JOSE Biol.<sup>7</sup> MIELES G., JORGE Biol.<sup>8</sup> RODRIGUEZ. C., ANDRES Biol.<sup>9</sup> CHAMORRO A., LEONARDO Biol.<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia. Grupo Bioprospección Agropecuaria. <sup>2-3</sup>Universidad de Sucre, Colombia, Facultad de Educación y Ciencias, <sup>4</sup>Técnico Laboratorio de Microbiología, Universidad de Sucre. <sup>5-10</sup>Dpto. de Biología, Universidad de Sucre.

\*Correspondencia: [alexander.perez@unisucre.edu.co](mailto:alexander.perez@unisucre.edu.co)

Recibido: 21-06- 2010; Aceptado: 11-10-2010.

#### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de dos métodos para medir actividad inhibitoria de extractos vegetales etanólicos nativos del Departamento de Sucre sobre bacterias y levadura patógenas de humanos y plantas. Los muestreos se realizaron en los municipios de Morroa y Sincelejo. Las hojas de las plantas *Melia Azederach*, *Sapium* sp, *Jatropha gossypilia*, *Psidium guajava*, *Origanum vulgare* *Melissa officinalis*, *Eucalyptus* sp y *Cymbopogon citratus* fueron procesadas utilizando los métodos de percolación y de soxhlet para la extracción de los extractos. Se evaluaron los métodos de orificio sobre agar (método 1) y el método de disco sensitivos (método 2) para medir el efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bulkolderia glumaea* y *Zygosaccharomyces microellipsoides*. Los resultados obtenidos demuestran que el método 2 permite una mayor eficacia e interpretación de los resultados con relación al método 1 donde se observó difusión de los extractos en el orificio, lo cual crea interferencia en la medición. Este es el primer trabajo en el departamento de Sucre donde se evalúan dos métodos para determinar actividad inhibitoria de un grupo amplio de plantas nativas sobre bacterias y levadura patógenas.

**Palabras claves:** extractos vegetales, bacterias y levadura patógenas

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficiency of two methods for measuring inhibitory activity of native ethanolic extracts plant of the Department of Sucre on bacteria and yeast human pathogenic. Sampling was conducted in the municipalities of Morroa and Sincelejo. The leaves of the plants *Melia azederach*, *Sapium* sp, *Jatropha gossypilia*, *Psidium guajava*, *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Eucalyptus* sp and *Cymbopogon citratus* were processed using the methods of percolation and Soxhlet for the extraction of the extract. Methods were tested on agar hole method (Method 1) and the sensitive disk method (method 2) to measure the inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Bulkolderia glumaea* *Zygosaccharomyces microellipsoides*. The results demonstrate that the method 2 allows greater efficiency and interpretation of results with regard to method 1 where there was diffusion of the extracts in the hole, which creates interference in the measurement. This is the first work in the department of Sucre where two methods are evaluated to determine inhibitory activity of a large group of native plants on pathogenic bacteria and yeast.

**Key words:** plant extracts, pathogenic bacteria and yeast.

## Introducción

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la biotecnología y se ofrece como una alternativa, especialmente para las que no existe un tratamiento adecuado. Otro aspecto importante a señalar son aquellas sustancias sintetizadas por individuos del reino animal que presentan igualmente capacidad antimicrobiana, con especial referencia a los compuestos de origen peptídico (YEAMAN y YOUNT, 2003). Pero es sin duda el reino vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003). Actualmente existe un gran interés en la búsqueda de sustancias antimicrobianas de origen vegetal y prueba de ello es que diferentes Institutos a nivel mundial centran sus esfuerzos en este campo.

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas. A su vez, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud (MONGELI y POMILIO, 2002); los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de

estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población. Esto abarca la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante el uso de medicamentos alternativos obtenidos de plantas, los cuales son de bajo costo con alta disponibilidad (MARTINEZ *et al.*, 1997).

Debido a su posición excepcional en el planeta, Colombia es uno de los países de mayor diversidad biológica en el mundo. La flora es la primera gran riqueza Colombiana, ya que poseemos entre 45.000 y 55.000 especies, principalmente endémicas. Siempre se habla del Amazonas, pero Colombia tiene otros lugares extraordinarios como la Sierra nevada de Santa Marta, el Choco, Guajira, Orinoquía, Montes de María entre otros. El departamento de Sucre, cuenta con una riqueza ecológica localizada en los montes de María y Colosó, donde existe una gran diversidad vegetal nativa con un amplio potencial biotecnológico sin estudiar. Con base en lo expuesto anteriormente surge la necesidad de explorar estos recursos naturales y sus principios activos como alternativa para su uso en el campo de la medicina vegetal, animal y humanos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes métodos de inhibición de bacterias y hongos patógenos utilizando extractos vegetales nativos del departamento de Sucre.

## **Materiales y métodos**

### **Recolección y tratamiento del material vegetal**

Fueron realizados muestreo en dos zonas del departamento de Sucre. *Melia azederach*, *Sapium* sp, *Jatropha gossypilia*, *Psidium guajava*, se recolectaron en Sincelejo y en el municipio de Morroa *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Eucalyptus* sp y *Cymbopogon citratus*. En cada zona se tomaron hojas jóvenes, se depositaron en recipiente para su traslado al laboratorio de fitoquímica de la Universidad de Sucre para iniciar el proceso de extracción.

### **Métodos de Extracción**

Para la obtención de extractos vegetales fueron utilizados dos métodos: El de percolación (DIAZ y RAMIREZ, 2007), modificado en el laboratorio de Fitoquímica y Microbiología de la Universidad de Sucre y el método de Soxhlet (GUALTIERI *et al.*, 2008).

Para la obtención de los extractos vegetales por el método de percolación, se pesaron 270 g de hojas fresca de *Origanum vulgare*, 74 g de *Melissa officinalis*, las cuales fueron picadas y depositadas en frasco de 1000 mL, adicionándole etanol

al 97% temperatura ambiente cubriendo la totalidad del material y haciendo pasar el solvente repetidas veces por el material, y luego una filtración durante 8 días. El extracto etanólico obtenido fue concentrado y secado en el rota evaporador a presión reducida. Para los extractos de *Melia Azederach*, *Sapium* sp, *Jatropha gossypilia*, *Psidium guajava*, *Eucalyptus* sp y *Cymbopogon citratus* se utilizó el método Soxhlet, el cual consistió en tomar hojas picadas en peso de, 278 g de *Sapium* sp, 260 g *Eucalyptus* sp, 200 g *Jatropha gossypilia* y 240 g para las otras plantas, seguida de sumersión en 1000 mL de etanol al 97% en el equipo soxhlet durante 8 horas y finalmente se concentró a una presión reducida en un rota evaporador para la obtención de cada extracto.

### Actividad antimicrobiana

Las bacterias y levadura patógenas utilizadas en el presente estudio aparecen registradas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Especies de bacterias y levadura patógenas, referencias y fuente donde fueron aisladas

Referencia	Especies	Fuente
ATCC27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula	Humanos
ATCC43863	<i>Klebsiella oxytoca</i> (Flugge) Lautrop	Humanos
ATCC 43086	<i>Klebsiella oxytoca</i> (Flugge) Lautrop	Humanos
ATCC29212	<i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz	Humanos
Lmi-Unisucre	<i>Escherichia coli</i>	Humanos
CF-320012	<i>Bulkolderia glumaea</i> (Kurita y Tabei)	Arroz
ATCC13049	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	Alimentos

### Métodos para evaluar actividad inhibitoria

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada extracto vegetal sobre bacterias y levadura patógenas (Tabla 1), se utilizaron dos métodos: El método de orificio sobre agar (método 1) y el método de disco sensitivos (método 2). Para los dos métodos se realizaron siembras de las bacterias y levadura purificadas, en medio caldo nutritivo y caldo de sabouraud, respectivamente, utilizando la técnica de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton.

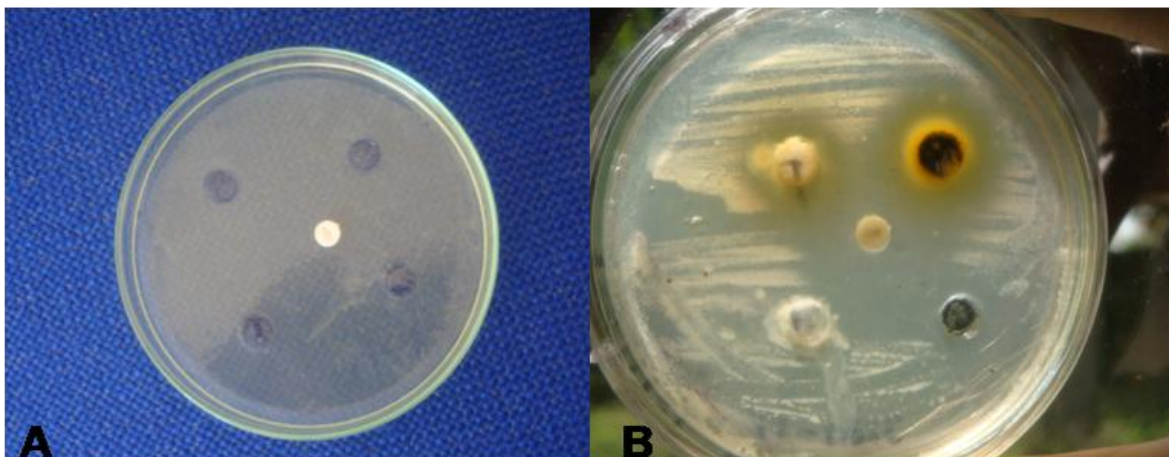
El método 1 consistió en realizar orificios con la ayuda de un barrenador estéril de 8 mm de diámetro sobre la superficie del agar, dentro de los cuales se depositaron 70µl de los diferentes extractos y selladas con el mismo agar. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C (CUELLAR y HUSSEIN, 2009). Para cada microorganismo, se utilizaron controles positivos de gentamicina 80 mg/ mL y negativos agua destilada. Los ensayos se realizaron por triplicado y la evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los orificios. El efecto inhibitorio de los extractos vegetales fue obtenido por la diferencia con el etanol y su eficiencia fue comparada con el control positivo.

En el método 2, discos estériles de papel filtro fueron sumergidos por un tiempo de 24 horas en cada extracto, posteriormente y en condiciones asépticas se depositaron sobre la superficie del agar. El periodo y la temperatura de incubación, la evaluación y la eficiencia de los ensayos fueron similares a los del método 1.

## Resultados

Fueron preparados 7 extractos a partir de plantas nativas provenientes de dos municipios del departamento de Sucre y su actividad inhibitoria fue evaluada sobre 5 bacterias patógenas de humanos, una bacteria patógena de planta y una levadura patógena de humanos (Tabla 1).

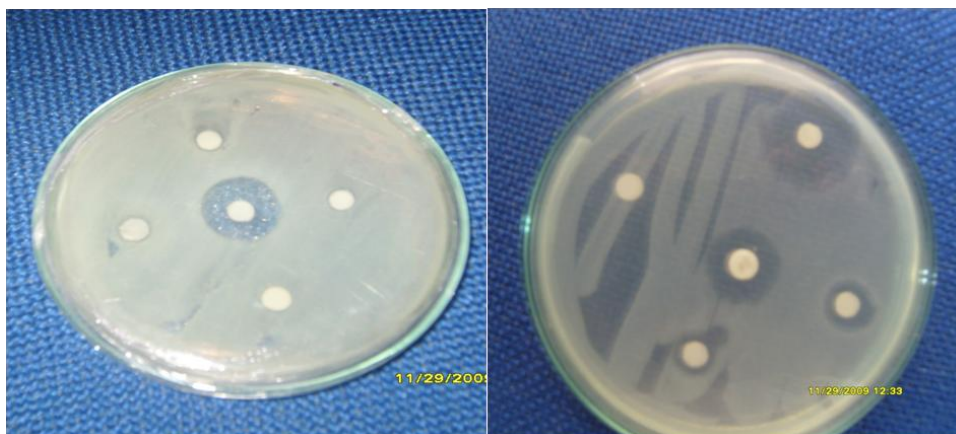
En la Fig. 1 aparece los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad inhibitoria de extractos vegetales por el método 1.



**Figura 1.** Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre bacterias y levaduras patógenas método 1. A- Orificio sobre agar, B- Actividad inhibitoria de extractos

En la Fig. 2 se muestra las imágenes de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre bacterias y levadura patógenas por el método 2.

En La tabla 2 y 3 aparecen los resultados obtenidos de la actividad de inhibición de los diferentes extractos vegetales sobre bacterias y levadura patógenas por el método 1 y 2, respectivamente.



**Figura 2.** Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre bacterias y levaduras patógenas método 2.

**Tabla 2.** Promedio de actividad Inhibitoria de extractos vegetales en mm sobre bacterias y levadura patógenas, por el método 1.

Bacterias	Actividad inhibitoria en mm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	-	E
ATCC13049	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18	0.0	0.0
ATCC43863	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ATCC29212	0.0	0.0	0.0	0.0	21	0.0	0.0	26	19	36	0.0	0.0
ATCC43086	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	21	0.0	0.0
ATCC27853	21	21	19	0.0	19	0.0	18	23	17	32	0.0	0.0
Lmi-unisucre	0.0	17	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	31	0.0	0.0
CF- 320012	22	0.0	0.0	0.0	25	0.0	0.0	0.0	23	12	0.0	0.0

1. *Melissa officinalis*, 2. *Origanum vulgare* 3. *Jatropha gossypilia*, 4. *Cymbopogon citratus*, 5. *Eucalyptus* sp 6. Flor de *Jatropha gossypilia*, 7. *Psidium guajava*, 8. *Melia Azederach*, 9. *Sapium* sp, + control positivo, - control negativo y E: etanol

**Tabla 3.** Promedio de actividad Inhibitoria de extractos vegetales en mm sobre bacterias y levadura patógenas, por el método 2.

Bacterias	Actividad inhibitoria en mm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	-	E
ATCC13049	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	24	0.0	15
ATCC43863	0.0	0.0	0.0	0.0	27	0.0	0.0	14	0.0	19	0.0	0.0
ATCC29212	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19	0.0	22	0.0	0.0
ATCC43086	11	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	22	0.0	29	0.0	0.9
ATCC27853	0.0	0.0	20	0.0	0.0	0.0	0.0	15	0.0	30	0.0	0.6
Lmi-unisucre	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11	0.0	20	0.0	0.0
CF- 320012	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	30	0.0	0.0	0.0	25

1. *Melissa officinalis*, 2. *Origanum vulgare* 3. *Jatropha gossypilia*, 4. *Cymbopogon citratus*, 5. *Eucalyptus* sp 6. Flor de *Jatropha gossypilia*, 7. *Psidium guajava*, 8. *Melia Azederach*, 9. *Sapium* sp, + control positivo, - control negativo y E: etanol

## Discusión

La presencia permanente de enfermedades infecciosas causada por microorganismos patógenos resistente en humanos, animales y plantas es un problema de salud pública a nivel mundial. La adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos u otros productos químicos de estos microorganismos ha reducido el uso de drogas para su control y manejo. Las compañías farmacéuticas están en la búsqueda permanente de drogas alternativas a través del uso de plantas medicinales. Según la OMS el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente. El número de sustancias químicas sintetizadas en el laboratorio que se pueden utilizar por su toxicidad o efectos secundarios aumenta constantemente, por lo tanto en la naturaleza se pueden obtener nuevas estructuras, con actividad terapéutica (QUEIPO *et al.*, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria, perteneciente gamma-Proteobacteria. Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, de vida libre, común en el suelo y el agua, se presenta regularmente en las superficies de las plantas y de vez en

cuando en las superficies de los tejidos animales. Los miembros del género son bien conocidos por los fitopatólogos porque son uno de los pocos grupos de bacterias que son patógenos de las plantas superiores. Sin embargo, ha sido reconocida como un patógeno oportunista emergente de importancia clínica, causando infecciones del tracto urinario, infecciones de las vías respiratorias, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia, infecciones óseas y articulares, infecciones gastrointestinales y una variedad de infecciones sistémicas, especialmente en pacientes con quemaduras graves y en pacientes con cáncer y SIDA que están inmunodeprimidos. La infección es un problema grave en pacientes hospitalizados con cáncer, fibrosis quística y quemaduras (TODAR, 2008). De otra parte es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga. WALKER *et al.* (2004) demostraron que en la colonización radicular, forma biofilmes que confieren resistencia contra los diferentes grupos de antibióticos.

*Enterococcus faecalis* es una bacteria perteneciente a Phylum Firmicutes son cocos gram-positivos, inmóviles, anaerobios facultativos y no forman endosporas ni cápsulas. Evidencias genéticas basadas en estudios de hibridación DNA-DNA y DNA-rRNA demostraron que *Streptococcus faecalis* debía ser reclasificado como *Enterococcus faecalis*, lo cual había sido sugerido previamente por otros investigadores. Existen 14 especies de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* que se consideran de origen fecal o intestinal. Es agente causante de infecciones nosocomiales y de una variedad de infecciones adquiridas en la comunidad, además de ser intrínsecamente resistentes a un número de agentes antimicrobianos. Entre las especies de mayor importancia clínica se destacan, *Enterococcus faecalis* que constituye el 85-90 % de los aislamientos en la mayoría de los laboratorios y *Enterococcus faecium* del 5-10 % de las cepas detectadas clínicamente (MORRINSON *et al.*, 1997).

*Klebsiella oxytoca* es una gamma-proteobacteria, son patógenos oportunistas que pueden causar enfermedades graves como septicemia, neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones de tejidos blandos. Entre las cepas de *Klebsiella* aisladas de pacientes hospitalizados, *K. oxytoca* es la más frecuentes, seguida de *K. pneumoniae*. Al igual que en *K. pneumoniae*, las cepas de *K. oxytoca* pueden volverse resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y monobactamas por plásmidos transmitidas beta-lactamasas de los genes. Un aspecto controvertido de la biología de *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* es



que, además de ser conocido como agentes causales de las enfermedades humanas, son también conocidos como microorganismos fijadores de nitrógeno en suelo agrícolas, ha sido aislada de la rizosfera de arroz, y desde el interior de las raíces del arroz, y *K. pneumoniae* ha sido aislado desde el interior de las raíces del maíz (KOVTONOVYCH *et al.*, 2003).

*Escherichia coli* es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que se encuentra generalmente en los intestinos animales. *E. coli*, en su hábitat natural, vive en los intestinos de la mayor parte de mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. *E. coli* puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente severas, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía. La *E. coli* entérica está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales, como cerdos, cabras, ganado, perros y caballos. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países se han presentado casos de muerte con esta bacteria. Generalmente en niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70°C (DWORKIN *et al.*, 2007).

Los monitoreos realizados por FEDEARROZ-Fondo Nacional del Arroz y los análisis de patogenicidad desarrollados por el CIAT; reportan por primera vez la presencia de la enfermedad conocida como Añublo bacteriano de la panícula, producida por *Burkholderia glumae* (Kurita & Tabei). *Burkholderia*, una bacteria aeróbica, Gram negativa, perteneciente al subfilum beta-proteobacterium. Se reportan diversos hospederos para *B. glumae*, entre ellos se destacan las arvenses pertenecientes a los géneros *Andropogon*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Lolium*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* y *Setaria* (PEREZ *et al.*, 2008).

A pesar del enorme beneficio económico que se puede derivar del uso de las levaduras para la producción de alimentos y otros metabolitos, existe también un aspecto negativo debido a su potencial como alterantes de alimentos. Este aspecto negativo no ha sido tan considerado como el beneficio que reportan en la industria alimentaria. Sin embargo, en la actualidad se ha incrementado el interés por la alteración de alimentos y bebidas por levaduras (THOMAS, 1993). El uso de tecnologías modernas en el procesado de alimentos, la gran variedad de nuevas

formulaciones de alimentos y bebidas, la tendencia a reducir el uso de conservantes (especialmente aquellos que son efectivos frente a levaduras, como el dióxido de sulfuro y el ácido benzoico), y la aplicación de procesados menos severos, han provocado un aumento en la frecuencia de los sucesos de alteración por levaduras (FLEET, 1999; LOUREIRO y QUEROL, 1999).

En la actualidad existen aproximadamente 800 especies de levadura descritas (BARNETT, 2000), aunque en los últimos años, este número ha ascendido hasta aproximadamente 1000 especies (BOEKHOUT, 2005). Sin embargo, sólo un pequeño grupo es responsable de la alteración de alimentos. PITT y HOCKING (1997) señalaron que alrededor de 110 especies de 30 géneros diferentes estaban asociadas a alimentos, y sólo 10-12 especies producían alteración en alimentos procesados y envasados. *Zygosaccharomyces* es un género de la familia Saccharomycetaceae. Primero fue descrito como *Saccharomyces* pero en 1983 fue reclasificado a su nombre actual en el trabajo por BARNETT *et al.* (2000). La levadura tiene una larga historia dentro del sector alimenticio. Esto es principalmente porque es tolerante a muchos métodos de preservación de alimento. Las características bioquímicas que posee para alcanzar esto incluye tolerancias al azúcar (50-60%), etanol (hasta el 18%), ácido acético (2.0-2.5%), ácido sórbico y benzoico (hasta 800-1000mg/L). *Z. microellipsoides* es una levadura alterante asociada a los siguientes productos lácteos: leche, nata, mantequilla, yogurt y queso.

De acuerdo a los resultados obtenidos por los dos métodos de medición de la actividad de inhibición de los extractos sobre bacterias y levadura patógenas, para mejor observación y medición del halo, el método 2 presenta una alta resolución que permite una mayor eficacia e interpretación de los resultados con relación al método 1 donde se observó difusión de los extractos en el orificio, lo cual crea interferencia en la medición.

### **Agradecimientos**

Los autores expresan sus agradecimientos a la Ing. Agroindustrial Derys Cumplido Arroyo de la Universidad de Sucre.

### **Referencias**

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. 2000. *Yeasts: characteristics and identification* 3<sup>rd</sup> Edition. Cambridge University Press. Cambridge

BOEKHOUT, T. 2005. Biodiversity: gut feeling for yeasts. *Nature* 434:449-451.

CUÉLLAR, C. A.; HUSSEIN, Y.R. 2009. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in Mbarara district (Uganda). *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 1(2):240-249.

DIAZ, H.; RAMIREZ, L. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica* 13(33):397-400.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16(4):385-393.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKBRANDT, E. 2007. *The prokaryotes*. 3<sup>er</sup> edition. A handbook on the biology of bacteria. Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, USA.

FLEET, G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2):101-117.

GUALTIERI, M.; GONZÁLEZ, M.; CONTRERAS, K.; NOGUERA, M.; UZCÁTEGUI E., VILLASMIL, S.; VILLALTA C. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"* 39(2):12-16.

KOVTUNOVYCH, G.; LYTVYNENKO, T.; NEGRUTSKA, V.; LAR, O.; BRISSE S.; KOZYROVSKA, N. 2003. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Research in Microbiology* 154(8):587-592

LOUREIRO, V.; QUEROL, A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Science Technology* 10(11):356-365.

MARTÍNEZ, M.J.; MOLINA, N.; BOUCOURT, E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2(1):12-14.

MONGELI, E.; POMILIO, A. 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy* 12:2-3.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B.1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symp Supplement.* 83:895-995.

PEREZ, C.; SAAVEDRA, E.; LOPEZ, P.; CARDONA, G. 2008. Medidas preventivas sobre la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz. Revista Arroz 56:22-26.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*, 2<sup>nd</sup> edition, Blackie Academic and Professional, London Weinhein New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

QUEIPO, J.A.; BUDIA, A.; MASCAROS, E.; GÓMEZ-FERRER, A.; GOBERNADO, M.; JIMÉNEZ, J.F. 2000. Evolución de la resistencia microbiana a fluorquinolonas en un hospital terciario. Actas Urológicas Españolas 24(5): 381-387.

THOMAS, D.S. 1993. *Yeasts as spoilage organisms in beverages*. The yeasts, Yeast Technology. 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.

TODAR, K. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*. Online textbook of bacteriology. disponible en: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; DÉZIEL, E.; SCHWEIZER, H.P.; RAHME, L.G.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiology 134:320-331.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Revista Pharmacol. 55:27-55.