

NOTA CIENTÍFICA

Actividad inhibitoria del sobrenadante de la bacteria Antártica *Pseudomonas* sp. M19B en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749

Inhibitory activity of Antarctic bacteria *Pseudomonas* sp. M19B on the biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* 19749

Arely Leyton¹, Homero Urrutia¹, José Miguel Vidal¹, Mery de la Fuente^{5,6}, Manuel Alarcón¹, Germán Aroca³, Gerardo González-Rocha⁴ y Katherine Sossa^{1,2}

¹Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Barrio Universitario s/n, Concepción, Chile. ksossa@udec.cl

²Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile

³Facultad de Ingeniería Bioquímica, Universidad de Valparaíso, Av. Brasil N° 2147, Valparaíso, Chile

⁴Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

⁵Laboratorio de Genómica y Biotecnología Aplicada, Departamento de Ingeniería Ambiental y Recursos Naturales, Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Rivera 2850, Concepción, Chile

⁶Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas, Facultad de Ciencia, Universidad San Sebastián, General Cruz 1577, Concepción, Chile

Abstract. *Flavobacterium psychrophilum* affects farmed salmon and trout worldwide and is the etiological agent of bacterial cold water disease. The treatment of this disease is made with antibiotics. The emergence of resistant strains and its ability to form biofilms have increased the resistance to antibiotics. Considering the diverse bioactivity of Antarctic bacteria, we evaluated the inhibitory effect of compounds secreted by Antarctic bacterial strains on the biofilm formation of *F. psychrophilum* 19749. 26.9% of the Antarctic bacterial isolates inhibited strongly the biofilm, the greatest effect was shown by M19B. Proteins (48-56 kDa) secreted by M19B may be related to the inhibition of the biofilm formation of *F. psychrophilum* 19749.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, biofilms, antarctic bacteria, inhibition

INTRODUCCIÓN

El patógeno de peces *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet *et al.* 1996) es una bacteria psicrófila y agente etiológico de la enfermedad bacteriana del agua fría que afecta a salmones y truchas a nivel mundial (Starliper 2010). Chile es el segundo productor mundial de salmónidos y la enfermedad causada por este patógeno produce un gran impacto económico sobre las principales especies de cultivo como *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch* (Henríquez-Núñez *et al.* 2012).

Actualmente, a nivel mundial el control de *F. psychrophilum* se lleva a cabo mediante quimioterapia; en Chile, los principales antibióticos usados para su tratamiento son florfenicol, oxitetraciclina y ácido oxolínico (Henríquez-Núñez *et al.* 2012).

Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos en la acuicultura ha provocado un aumento alarmante de

bacterias resistentes disminuyendo la efectividad de los mismos (Cabello 2006).

Otro factor que influye en la resistencia bacteriana a la acción de los antibióticos, es la capacidad de las bacterias de formar biopelículas (Mah & O'Toole 2001). Una biopelícula es una población de células microbianas que se encuentra adherida a una superficie y embebida en una matriz polimérica extracelular producida por las mismas células (Costerton *et al.* 1999). En instalaciones acuícolas, las biopelículas son ubicuas y se forman, por ejemplo, en los estanques de cultivo, tuberías de suministro de agua, sistemas de biofiltración, así como también en la superficie de los peces (King *et al.* 2008). Estudios realizados a la fecha indican que *F. psychrophilum* forma biopelículas *in vitro*, en vidrio y en pocillos de microplacas de poliestireno (Álvarez *et al.* 2006, Sundell & Wiklund 2011) y que las células del patógeno presentes en esta biopelícula muestran una mayor resistencia a los

antibióticos oxitetraciclina y flumequina, usados comúnmente en acuicultura en comparación a las células planctónicas o de vida libre, es decir, células que no se encuentran asociadas a una superficie (Sundell & Wiklund 2011). Debido a los problemas asociados a la formación de biopelículas se hace indispensable buscar inéditos mecanismos de control y el territorio Antártico se manifiesta como una fuente de recursos inexplorada en la que se pueden encontrar microorganismos con un potencial uso biotecnológico (Tindall 2004, Papa *et al.* 2013). Muchas de las investigaciones realizadas con bacterias antárticas se han enfocado en la búsqueda de compuestos antimicrobianos (O'Brien *et al.* 2004, Lo Giudice *et al.* 2007) ya que microorganismos antárticos han desarrollado estrategias peculiares de sobrevivencia como la secreción de dichos compuestos para reducir la competencia interespecífica, otorgándoles así ventajas competitivas. Las bacterias antárticas podrían secretar compuestos que afecten el desarrollo de una biopelícula. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de compuestos extracelulares producidos por aislamientos obtenidos en la Antártica sobre la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* 19749.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

En el presente estudio se emplearon un total de 67 sobrenadantes de aislamientos antárticos obtenidos a partir de superficie de rocas, columna de agua, sedimento y rizósfera de musgos, recolectados en la península Fildes, isla Rey Jorge (62°12'S; 58°57'O), Territorio Antártico Chileno, durante enero de 2010. Los aislamientos fueron mantenidos a -80°C en caldo Trypticase de Soya diluido al 50% y suplementado con glicerol al 20% (O'Brien *et al.* 2004). El patógeno *F. psychrophilum* aislado 19749 fue adquirido en Aquagestion Chile Company, y recuperado de un salmón moribundo que presentaba los signos clínicos típicos de la enfermedad del agua fría, como úlceras en la piel y lesiones en la aleta caudal. La identidad de la especie fue confirmada mediante PCR utilizando los partidores PSY1/PSY2 específicos para *F. psychrophilum* (Toyama *et al.* 1994). El patógeno fue mantenido a -80°C en caldo Triptona Extracto de Levadura y Sales (TYES) compuesto por MgSO₄ (0,5 g L⁻¹), CaCl₂ (0,5 g L⁻¹), triptona (4 g L⁻¹) y extracto de levadura (0,4 g L⁻¹) y suplementado con glicerol al 20% (Cain & LaFrentz 2007).

Todos los cultivos bacterianos líquidos, tanto de los aislamientos antárticos como del patógeno, fueron

crecidos en caldo TYES a pH 7,2 y en agitación (120 rpm) por 48 h a 15°C. La cuantificación celular de *F. psychrophilum* 19749 se realizó mediante recuento en placa con agar TYES diluido al 50 y 1,5% de agar bacteriológico incubadas a 15°C durante 5 días.

OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS

Los sobrenadantes libres de células de los aislamientos antárticos fueron obtenidos mediante centrifugación de los cultivos celulares luego de 48 h de incubación, cultivos que alcanzaron una densidad óptica de entre 0,9 y 1,2 (DO₆₀₀). Las condiciones de centrifugación fueron 15 min, 8000 x g, 4°C y los sobrenadantes fueron esterilizados filtrando en membranas de acetato de celulosa de 0,2 µm.

DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

La detección del efecto de los sobrenadantes de los aislamientos antárticos en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* 19749, se realizó mediante la cuantificación *in vitro* de la biopelícula utilizando el método de tinción con cristal violeta descrito por Christensen *et al.* (1985) con modificaciones. Para ello, el cultivo de 48 h de *F. psychrophilum* 19749, fue ajustado a DO₅₄₀ = 0,8 correspondiendo a 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹. Éste fue diluido (1/10) en medio TYES y 15 µL de la dilución fueron agregados por triplicado a los pocillos de las microplacas de poliestireno de 96 pocillos (CytoOne, USA) que contenían 60 µL del medio TYES diluido al 20%. Posteriormente, se agregaron 75 µL del sobrenadante de los aislamientos antárticos. La concentración final del patógeno en los pocillos fue de 1 x 10⁷ UFC mL⁻¹. Pocillos conteniendo sólo medio de cultivo fueron usados para eliminar factores inespecíficos y pocillos conteniendo medio TYES e inóculo de *F. psychrophilum* 19749 en ausencia del sobrenadante de los aislamientos antárticos fueron usados como control. La microplaca fue incubada a 15°C con 120 rpm de agitación durante 4 días. Luego del tiempo de incubación, la fase planctónica fue retirada y traspasada a otra microplaca para su posterior lectura a 540 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek, USA). Los pocillos con las células remanentes fueron lavados 3 veces con 300 µL de agua destilada estéril y las células adheridas fueron fijadas con 250 µL de metanol y luego de 15 min las microplacas fueron vaciadas y secadas al aire durante 45 min (Stepanovic *et al.* 2004). Posteriormente, 200 µL de la solución de cristal violeta al 1% (p/v) fueron agregados a cada pocillo. Después de 20 min de agitación, el exceso

de cristal violeta fue removido, los pocillos fueron lavados 3 veces con 300 μL de agua destilada estéril y 250 μL de etanol al 70% (v/v) fueron agregados a los pocillos para solubilizar el cristal violeta adherido a la microplaca. La biopelícula fue cuantificada midiendo la absorbancia del cristal violeta a 595 nm (Álvarez *et al.* 2006).

Para seleccionar el aislamiento que presentó el mayor efecto antibiopelícula, se calculó el índice específico de la formación de biopelículas, *Specific Biofilm Formation* (SBF) (Niu & Gilbert 2004, Naves *et al.* 2008); el cual fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula $\text{SBF} = (\text{AB} - \text{CW})/\text{G}$, en la que AB es la DO_{595} de las bacterias adheridas y teñidas con cristal violeta, CW corresponde a la DO_{595} de los pocillos teñidos que contenían solamente medio de cultivo sin bacterias y G que es la DO_{540} de la fase planctónica, a la cual se le restó el promedio de la DO_{540} de los pocillos que contenían solamente medio de cultivo. El criterio establecido por Naves *et al.* (2008), según el cual las células son fuertes productoras de biopelículas si $\text{SBF} > 1$ y débiles si $\text{SBF} \leq 1$ fue modificado estableciendo que el efecto de los aislados antárticos en la formación de biopelículas fue fuertemente inhibidor si $\text{SBF} \leq 1$ y débilmente inhibidor y/o sin efecto si $\text{SBF} > 1$. De los sobrenadantes de los aislamientos que presentaron un efecto fuertemente inhibidor de la formación de biopelículas, se seleccionó el sobrenadante del aislamiento que presentó el valor de SBF más bajo. Finalmente, se consideró un efecto inhibidor de crecimiento si el sobrenadante impidió el crecimiento planctónico del patógeno.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA BACTERIANA INHIBIDORA DE LA BIOPELÍCULA

El aislamiento que presentó el mayor efecto antibiopelícula fue identificado mediante técnicas moleculares, para ello se extrajo el ADN genómico mediante el kit de extracción de ADN, ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADN extraído se usó como templado para la amplificación por PCR con los partidores 9-27f y 1542r, específicos para ADNr 16S del Dominio *Bacteria* (Joulian *et al.* 1998, Weisburg *et al.* 1991). El producto de PCR (1.287 pb) fue secuenciado por Macrogen Inc. (Seúl, Korea). La secuencia obtenida se ingresó en el programa de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990). La confirmación de género se realizó mediante pruebas fenotípicas que incluyeron tinción de Gram, fermentación de glucosa, test de catalasa y oxidasa así como determinación de la movilidad.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL SOBRENADANTE Y SU EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Para detectar proteínas responsables de la actividad antibiopelícula, el sobrenadante libre de células del aislado seleccionado fue concentrado por ultrafiltración en una centrífuga (1 h, 8000 x g, 4°C) con un dispositivo de filtro de membrana con poro de corte de 3.000 Da (Amicon Ultra-15, 3K, Millipore). El retenido fue visualizado en un gel desnaturizante SDS-PAGE. Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga (20 μL de muestra y 8 μL de buffer de carga) y se procedió a realizar su desnaturización térmica calentando la muestra a 100°C durante 5 min. Luego, 20 μL de la mezcla fueron analizadas usando un gel de poliacrilamida al 16%. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 2,5 h y el buffer de corrida de electroforesis contenía Tris 1M, tricina 1M y SDS 1% (p/v), pH 8,25. Para su visualización, los geles fueron teñidos con azul de Comassie.

La cuantificación de las proteínas presentes en el sobrenadante del aislamiento seleccionado se realizó con el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor, para posteriormente realizar ensayos de inhibición de formación de biopelículas, los cuales se realizaron en microplacas y con distintas concentraciones proteicas. Para ello, un cultivo de 48 h de *F. psychrophilum* 19749, fue ajustado a $\text{DO}_{540} = 0,8$ correspondiendo a 10^9 UFC mL^{-1} para quedar en el pocillo una concentración del patógeno de 1×10^7 UFC mL^{-1} . A los pocillos de las microplacas se les agregó el inóculo del microorganismo, medio TYES diluido al 20% y distintos volúmenes del concentrado proteico, siendo evaluadas las siguientes concentraciones finales de proteínas: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mg mL^{-1} (volumen final 150 μL). La microplaca fue incubada a 15°C con 120 rpm de agitación durante 4 días. La cuantificación de la biopelícula se realizó mediante la técnica tinción con cristal violeta descrito anteriormente.

Se realizó un análisis ANOVA de una sola vía ($P < 0,050$) entre los tratamientos y el control y una comparación de medias mediante el test de Dunnett (Cady *et al.* 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los sobrenadantes obtenidos de los 67 aislamientos estudiados, 18 de ellos (26,9%) exhibieron un efecto antibiopelículas fuerte, mientras que 17 de ellos (25,4%) no presentaron efecto antibiopelículas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de sobrenadantes de aislados antárticos en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749 según valores de SBF* / Effect of the supernatant produced by antarctic bacterial isolates on the biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* 19749 according to the SBF*value

Clasificación del efecto de los sobrenadantes en la formación de biopelículas de <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Nº de aislados antárticos	%	Rango de SBF*
Anti- biopelícula	18	26,9	0,19 - 0,86
Sin efecto	17	25,4	4,2 - 5,9
Inhibidor del crecimiento	32	47,7	ND

*SBF, Specific Biofilm Formation; ND. No determinado

Los sobrenadantes de los 32 aislamientos restantes (47,7%) mostraron un efecto inhibitor del crecimiento planctónico de *F. psychrophilum* 19749, lo que no permitió metodológicamente determinar el índice SBF en este grupo de aislamientos.

De los 18 sobrenadantes que mostraron el efecto antibiopelículas fuerte, se eligió el sobrenadante del aislamiento M19B como el mejor representante ya que exhibió el menor índice de formación de biopelículas (SBF= 0,19) comparado con el control (SBF= 4,9), por lo tanto, fue el sobrenadante que inhibió en mayor medida la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* 19749 (Fig. 1).

Respecto de la identificación molecular del aislamiento M19B, se determinó que el fragmento de ADNr 16S amplificado, secuenciado y depurado presentó 99% de identidad con la especie *Pseudomonas fragi* (número de acceso GenBank AB685646.1). La secuencia obtenida en este trabajo (824 pb) fue ingresada en el GenBank con el código de acceso KC854411. Los resultados de las pruebas fenotípicas que permitieron confirmar la pertenencia del aislamiento M19B al género *Pseudomonas* fueron catalasa y oxidasa positiva, incapacidad de fermentar carbohidratos, presencia de bacilos cortos Gram negativos y movilidad positiva.

El sobrenadante concentrado fue utilizado para la realización de un gel desnaturalizante SDS-PAGE para detectar la presencia de proteínas en el sobrenadante del aislamiento seleccionado y luego evaluar su posible efecto en la actividad inhibitoria. El análisis del gel mostró proteínas de tamaño entre 46 y 58 kDa en el sobrenadante del aislamiento M19B (Fig. 2A).

El sobrenadante concentrado fue utilizado para cuantificar las proteínas presentes mediante un kit de

cuantificación proteica y se determinó una concentración de 3,6 mg mL⁻¹ de proteínas. Diluciones entre 0,5 y 1,5 mg mL⁻¹ de estas proteínas tuvieron un efecto inhibitorio fuerte (SBF < 1) en la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* 19749, mientras que concentraciones superiores a 1,5 mg mL⁻¹, si bien inhibieron la formación de biopelículas comparado con el control, esta inhibición se produjo por un efecto inhibitorio sobre el crecimiento planctónico del patógeno ($P < 0,05$) (Fig. 2B).

Los problemas asociados a la formación de biopelículas en acuicultura se relacionan con la persistencia de los microorganismos en el ambiente ya que provocan la exposición recurrente de los peces a los agentes patógenos (King *et al.* 2008) y además, se asocian con la elevada resistencia de una biopelícula al tratamiento con antimicrobianos (Mah & O'Toole 2001, Davies 2003, Jefferson 2004). El patógeno de peces *F. psychrophilum* forma biopelículas, por lo que es de suma importancia interferir en su formación. En este estudio se determinó que cerca de un tercio de los aislamientos antárticos evaluados secretaron compuestos con actividad inhibitoria sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* 19749. A la fecha, sólo hay un reporte de un aislamiento antártico identificado como *Pseudoalteromonas haloplanktis*, productora de compuestos inhibidores de biopelículas, en este caso de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* (Papa *et al.* 2013). Cabe destacar que cerca de la mitad de los aislamientos antárticos produjo compuestos que inhibieron el crecimiento en fase planctónica de *F. psychrophilum* 19749, por lo que sumado al efecto antibiopelículas, un 75% del total de los sobrenadantes presentó algún efecto sobre *F. psychrophilum* 19749, probablemente debido a que las condiciones extremas de la región obligan a estos microorganismos a secretar

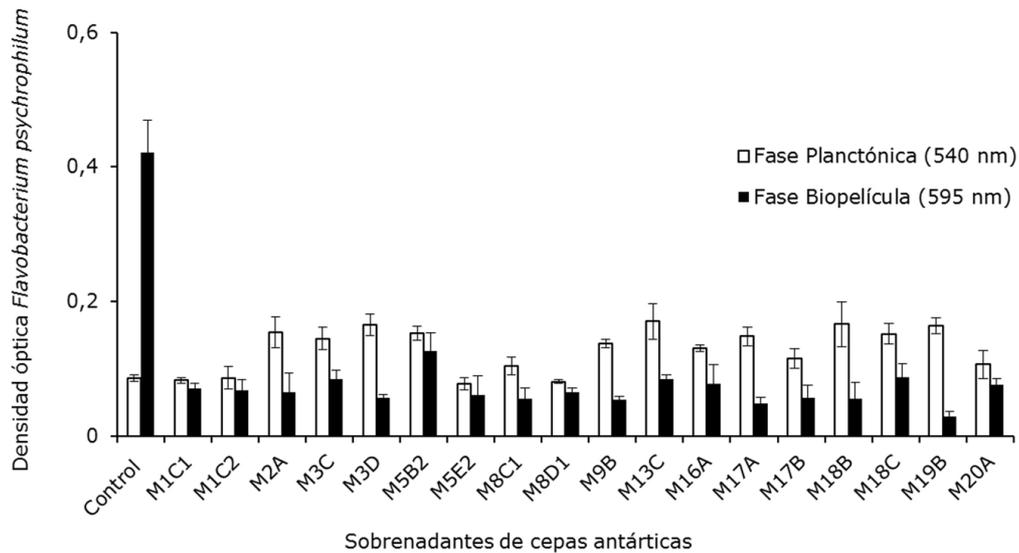


Figura 1. Efecto antibiopelículas de los sobrenadantes de los aislamientos antárticos sobre *F. psychrophilum* 19749. Todas las densidades ópticas de la biopelícula presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control que corresponde al patógeno y medio de cultivo sin sobrenadante / Anti biofilm effect of the supernatants of Antarctic bacterial isolates on *F. psychrophilum* 19749. All optical densities of the biofilm show significant differences ($P < 0.05$) compared with the control that corresponds to the pathogen and culture medium without supernatant

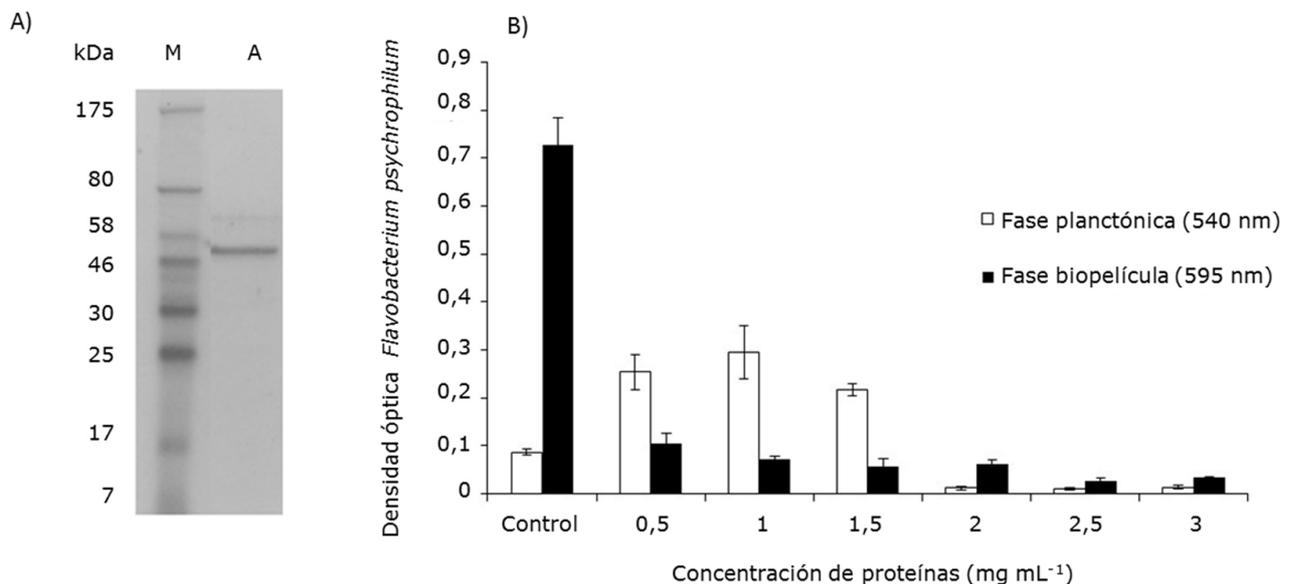


Figura 2. A) Electroforesis en gel SDS-PAGE (16% acrilamida) de proteínas presentes en el sobrenadante de *Pseudomonas* sp. M19B. M: Marcador de peso molecular; A: sobrenadante de *Pseudomonas* sp. M19B. B) Efecto de distintas concentraciones proteicas presentes en el sobrenadante de *Pseudomonas* sp. M19B sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* 19749. El control corresponde al patógeno y medio de cultivo sin sobrenadante / A) Gel Electrophoresis SDS-PAGE (16% acrylamide) of proteins present in the supernatant of *Pseudomonas* sp. M19B. M: molecular weight marker; A: *Pseudomonas* sp. M19B supernatant. B) Effect of different protein concentrations present in the supernatant of *Pseudomonas* sp. M19B on the biofilm formation of *F. psychrophilum* 19749. The control corresponds to the pathogen and medium without supernatant

compuestos antimicrobianos para hacer frente a potenciales competidores (Lo Giudice *et al.* 2007). El aislamiento antártico que presentó el mayor efecto antibiopelícula fue M19B, el cual pertenece al género *Pseudomonas*, género que ha sido utilizado con fines de biocontrol en acuicultura (Bly *et al.* 1997) y específicamente en el biocontrol de *F. psychrophilum* (Korkea-aho *et al.* 2011, Strom-Bestor & Wiklund 2011) ya que forma parte de la microbiota normal de los peces (Smith & Davey 1993, Bly *et al.* 1997). El análisis de la secuencia sugiere que el aislamiento pertenecería a la especie *Pseudomonas fragi*, una bacteria psicrófila, sin embargo, se requiere realizar un ensayo de hibridación ADN-ADN para confirmar la identidad exacta de la especie.

Los compuestos activos con efecto antibiopelículas presentes en el sobrenadante de *Pseudomonas* sp. M19B no pudieron ser extraídos con los disolventes orgánicos de diferente polaridad como hexano, diclorometano y acetato de etilo (datos no mostrados), lo que indica que los compuestos activos no serían compuestos apolares. Por otro lado, los resultados preliminares de este estudio sugieren que en la actividad antibiopelículas de *Pseudomonas* sp. M19B participarían proteínas secretadas por la cepa, las cuales se encuentran en un rango de peso molecular de entre 46 y 58 kDa. Además, cuando se evaluó el efecto de distintas concentraciones proteicas en la formación de la biopelícula, se produjo una inhibición dosis-dependiente de ésta, por lo que podemos sugerir que el efecto inhibitorio fue debido a las proteínas presentes en el sobrenadante de *Pseudomonas* sp. M19B. En este punto, se ha reportado la actividad antibiopelícula de compuestos proteicos como en el caso de una proteína de 48 kDa secretada por *Streptococcus intermedius*, la cual fue identificada como una arginina desaminasa, proteína que impidió la formación de la biopelícula de *Porphyromonas gingivalis* mediante la represión de la expresión de los genes que codifican las principales subunidades proteicas de los dos tipos de fimbrias presentes en su superficie y responsables de la adherencia y posterior formación de biopelículas (Christopher *et al.* 2010). Así también, péptidos y/o proteínas secretados por una cepa del género *Streptomyces* interfirieron en la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* (Kim *et al.* 2012).

Sin embargo, es necesario descartar la acción sinérgica de otros compuestos presentes en el sobrenadante con efecto en la formación de biopelículas, como por ejemplo, polisacáridos, los cuales han mostrado un efecto

antibiopelículas (Rendueles *et al.* 2013). Además, se deben purificar las proteínas secretadas por *Pseudomonas* sp. M19B y, por un lado, realizar estudios conducentes a comprobar el efecto antibiopelículas de las proteínas secretadas mediante técnicas de microscopía y por otro, evaluar el efecto de dichas proteínas en un mayor número de especies de *F. psychrophilum*. Si bien es cierto, este estudio entrega resultados preliminares, es punto de partida para investigaciones dirigidas a interferir en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue posible gracias al financiamiento del Proyecto FONDECYT 1101009, al Proyecto INACH T-17-08 a cargo del Dr. Gerardo González Rocha y al Proyecto INACH M_09-11 de apoyo a la realización de tesis de postgrado.

LITERATURA CITADA

- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers & DJ Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Álvarez B, P Secades, M Prieto, MJ McBride & JA Guijarro. 2006.** A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* *tlpB* inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4044-4053.
- Bernardet JF, P Segers, M Vancanneyt, F Berthe, K Kersters & P Vandamme. 1996.** Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basionym, *Cytophaga aquatilis* Strohl & Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 128-148.
- Bly JE, SA Quiniou, LA Lawson & LW Clem. 1997.** Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Disease* 20(1): 35-40.
- Cabello FC. 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8(7): 1137-1144.
- Cady NC, KA McKean, J Behnke, R Kubec, AP Mosier, SH Kasper, DS Burz & RA Musah. 2012.** Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PloS One* 7(6): e38492. <doi:10.1371/journal.pone.0038492>
- Cain KD & BR LaFrentz. 2007.** Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*. In: Coico R, T Kowalik, JM Quarles, B Stevenson, RK Taylor & AE Simon (eds). *Current Protocols in Microbiology*, pp. 13B.1.1-13B.1.12. John Wiley and Sons, Hoboken.

- Christensen GD, WA Simpson, JJ Younger, LM Baddour, FF Barrett, DM Melton & EH Beachey. 1985.** Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22(6): 996-1006.
- Christopher AB, A Arndt, C Cugini & ME Davey. 2010.** A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiology* 156(11): 3469-3477.
- Costerton JW, PS Stewart & EP Greenberg. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418): 1318-1322.
- Davies D. 2003.** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(2): 114-122.
- Henríquez-Núñez H, O Evrard, G Kronvall & R Avendaño-Herrera. 2012.** Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354: 38-44.
- Jefferson K. 2004.** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236(2): 163-173.
- Joulian C, B Ollivier, BKC Patel & PA Roger. 1998.** Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiology Ecology* 25(2): 135-145.
- Kim YG, JH Lee, CJ Kim, JC Lee, YJ Ju, MH Cho & J Lee. 2012.** Antibiofilm activity of *Streptomyces* sp. BFI 230 and *Kribbella* sp. BFI 1562 against *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(6): 1607-1617.
- King RK, GJ Flick Jr, SA Smith, MD Pierson, GD Boardman & CW Coale Jr. 2008.** Response of bacterial biofilms in recirculating aquaculture systems to various sanitizers. *Journal of Applied Aquaculture* 20(2): 79-92.
- Korkeaho, TL, J Heikkinen, KD Thompson, A von Wright & B Austin. 2011.** *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 111(2): 266-277.
- Lo Giudice A, V Bruni & L Michaud. 2007.** Characterization of Antarctic psychrotrophic Bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *Journal of Basic Microbiology* 47(6): 496-505.
- Mah TFC & GA O'Toole. 2001.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9(1): 34-39.
- Naves P, G del Prado, L Huelves, M Gracia, V Ruiz, J Blanco, G Dahbi, M Blanco, M Ponte & F Soriano. 2008.** Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis* 45(2): 86-91.
- Niu C & ES Gilbert. 2004.** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 6951-6956.
- O'Brien A, S Richard, N Russell & S Roller. 2004.** Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 48(2): 157-167.
- Papa R, E Parilli, F Sannino, G Barbato, ML Tutino, M Artini & L Selan. 2013.** Anti-Biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Research in Microbiology* 164(5): 450-456.
- Rendueles O, JB Kaplan & JM Ghigo. 2013.** Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology* 15(2): 334-346.
- Smith P & S Davey. 1993.** Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases* 16(5): 521-524.
- Starliper C. 2010.** Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2(2): 97-108.
- Stepanovic S, I Cirkovic, L Ranin & M Svabic-Vlahovic. 2004.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* 38(5): 428-432.
- StrömBestor M & T Wiklund. 2011.** Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. *Journal of Fish Diseases* 34(4): 255-264.
- Sundell K & T Wiklund. 2011.** Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 34(5): 373-383.
- Tindall BJ. 2004.** Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microbial Ecology* 47(3): 271-283.
- Toyama T, K Kita-Tsukamoto & H Wakabayashi. 1994.** Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology* 29: 271-275.
- Weisburg W, S Barns, D Pelletier & D Lane. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703.

Recibido el 29 de julio de 2014 y aceptado el 7 de mayo de 2015

Editor: Claudia Bustos D.