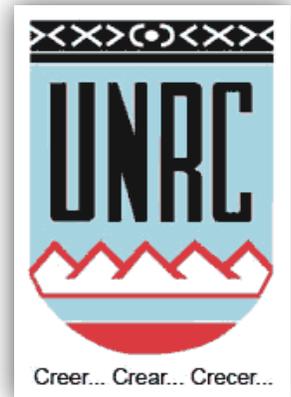


# *Universidad Nacional de Río Cuarto*

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Cátedra Bacteriología



## **“Interacción entre *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 productores de bacteriocinas sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*”**



**Romina Alín Tobares**

**Directora: Dra. Lucila Barberis**

**Co-Directora: Dra. Liliana Pascual**

**Trabajo final de grado para optar al título de Microbióloga**

**2010**

*Sorprendernos por algo es el primer  
paso de la mente hacia el descubrimiento.*

*Louis Pasteur 1822-1895.*

*Químico y microbiólogo francés.*

*A mis padres.*

*A mis hermanos.*

*A todos aquellos que siempre*

*creyeron en mí.*

Este trabajo final fue realizado en la cátedra Bacteriología, en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Seminarista**

*Romina Alín Tobares*

.....

**Directora**

*Dra. Lucila Barberis*

.....

**Co- Directora**

*Dra. Liliana Pascual*

.....

**Jurado evaluador**

*Dra. Lucila Barberis*

.....

*Dra. Susana Bettera*

.....

*Dra. Carina Magnoli*

.....

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1 INTRODUCCION</b>	
Capítulo I: Bacterias ácido lácticas.....	2
I.1 Género <i>Lactobacillus</i> .....	3
I.2 <i>Lactobacillus</i> spp. y el cuerpo humano.....	4
I.3 Probióticos.....	5
I.4 Mecanismos de acción de cepas de lactobacilos probióticos.....	6
I.4.1 Producción de compuestos antimicrobianos.....	7
I.4.2 Bacteriocinas.....	8
I.4.2.1 Clasificación de bacteriocinas.....	9
I.4.2.1.1 Bacteriocinas de bacterias Gram negativas.....	9
I.4.2.1.2 Bacteriocinas de bacterias Gram positivas.....	9
I.5 Perspectivas futuras.....	12
I.6 <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60.....	12
Capítulo II: Infecciones en el tracto urogenital femenino.....	13
II.1 características de la infección en el tracto urinario.....	14
Capítulo III: Características del género <i>Pseudomonas</i> .....	15
III.1 Hábitat, metabolismo y cultivo.....	15
III.2 Estructura antigénica y factores de virulencia.....	15
III.3 Patogenia de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
III.4 Resistencia a antibióticos.....	19

<b>2 HIPOTESIS</b> .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	22
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1 Identificación y almacenamiento de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60.....	23
4.1.1 Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. utilizadas.....	23
4.1.2 Identificación.....	23
4.1.2.1 Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp. por pruebas bioquímicas.....	23
4.1.2.2 Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp. por API 50 CH.....	25
4.1.3 Almacenamiento de las cepas.....	26
4.2 Aislamiento, identificación y almacenamiento de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
4.2.1 Aislamiento.....	26
4.2.2 Identificación.....	26
4.2.3 Almacenamiento de las cepas.....	27
4.3 Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
4.4 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
4.5 Ensayo de interacción entre <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
4.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas.....	30
4.7 Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) de las bacteriocinas.....	31
4.8 Análisis estadístico.....	34

## **5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

5.1 Cultivo e identificación de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60.....	35
5.2 Cultivo e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
5.3 Sensibilidad a antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
5.4 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	43
5.5 Ensayo de interacción entre <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
5.6 Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	47
5.7 Concentración inhibitoria fraccionaria (CIF).....	48
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>7 ANEXO</b> .....	<b>53</b>
<b>8 BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>64</b>

## RESUMEN.

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo de gran interés en el estudio de las enfermedades infecciosas como patógeno oportunista principalmente en pacientes que tienen alguna alteración en la barrera cutánea mucosa, falla inmunológica o enfermedad de base. En estos pacientes las infecciones terminan siendo de tipo crónicas dado que esta bacteria tiene un grado alto de resistencia innata a varios antibióticos de uso clínico, y además es capaz de adquirir nueva resistencia mediante diversos mecanismos de intercambio de información genética horizontal como por conjugación y transducción. Está involucrada en muchas enfermedades como infecciones del tracto urinario, septicemia, neumonía, infecciones intestinales, dermatitis, endocarditis, osteocondritis, etc. Actualmente diferentes grupos de investigación estudian estrategias alternativas al uso de antibióticos para tratar estos cuadros infecciosos. Las bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus* pueden estar asociadas al hombre y a animales como grandes defensores de las mucosas, encontrándose en intestino delgado, colon y el tracto urogenital. Dentro de las propiedades que permiten el desarrollo de la función protectora se encuentran la producción de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos. Las bacteriocinas son metabolitos secundarios que presentan un núcleo proteico al cual se pueden unir diferentes grupos químicos y que presentan actividad antimicrobiana sobre microorganismos relacionados o no taxonómicamente. En éste trabajo de investigación se evaluó la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus rhamnosus* L60 y *Lactobacillus fermentum* L23 productores de bacteriocinas frente a cepas de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes muestras biológicas, analizando el efecto individual y combinado de las bacteriocinas de estas especies contra diferentes cepas del microorganismo patógeno. Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de estrías cruzadas demostraron que las cepas de lactobacilos estudiadas inhibieron el crecimiento del 100% de las cepas de *P. aeruginosa*. Los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento microbiano fueron de  $19.0 \pm 5.0\text{mm}$  frente a *L. fermentum* L23 y de  $16.3 \pm 4.8\text{mm}$  frente a *L. rhamnosus* L60. Mediante el ensayo de estrías perpendiculares se demostró un 100% de sinergismo entre las sustancias antimicrobianas producidas por ambos lactobacilos y la técnica del tablero de ajedrez permitió confirmar dicha interacción.

# 1 Introducción.

## Capítulo I. Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido históricamente definidas como un grupo de organismos Gram positivos, microaerobios que fermentan hexosas para producir principalmente ácido láctico. Esta clasificación funcional incluye los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Este amplio grupo de microorganismos está asociado a distintos nichos animales y vegetales, y juega un rol clave en la producción de alimentos fermentados y bebidas (Miller y Wetterstrom, 2000). También estas bacterias están naturalmente asociadas con la mucosa superficial de los animales, como intestino delgado, colon y vagina. El aislarlas de diferentes especies implica una amplia adaptación a distintos ambientes. Su pequeño genoma codifica para un vasto número de transportadores que permiten la utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno desde el ambiente nutricionalmente rico que habitan y refleja un limitado rango de capacidad biosintética (Makarova y col., 2006).

La definición de BAL es biológica en vez de taxonómica, y esto es así porque el grupo no es monofilético (no tienen un ancestro común): la mayoría pertenece a la clase *Bacilli* (orden *Lactobacillales*), y un pequeño grupo a la clase *Actinobacteria* (Makarova y Koonin, 2007). Además, si bien todas las especies incluidas en el término BAL comparten características metabólicas y culturales, existen muchas diferencias como el hecho de incluir en el mismo grupo especies patógenas (del género *Streptococcus*) y no patógenas (Garrity y col., 2005).

Las BAL obtienen su energía de la fermentación parcial de hidratos de carbono, sin la participación de O<sub>2</sub>. Esto implica la utilización de altas cantidades de azúcares para la obtención de relativamente poca energía para el crecimiento, ya que la mayor parte de la energía permanece en los productos de fermentación, los cuales permiten una identificación parcial de especies o grupos de especies. El grupo de los homofermentadores incluye BAL que producen ácido láctico en mayor proporción (entre un 85-95% de la hexosa fermentada) con poca cantidad de CO<sub>2</sub> y ácido acético obtenidos. El grupo de los heterofermentadores incluye BAL que convierten más del 50% del azúcar en ácido láctico con un 20-30% de CO<sub>2</sub> y 20-25% de etanol y ácido acético (Savadogo y col., 2006).

Las características morfológicas y metabólicas de los principales géneros de las BAL se observan en la tabla 1 (Madigan y col., 1999).

**Tabla 1.** Características morfológicas y metabólicas de los principales géneros de BAL.

Género	Forma celular y organización	Fermentación
<i>Streptococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativa
<i>Leuconostoc</i>	Cocos en cadenas	Heterofermentativa
<i>Pediococcus</i>	Cocos en tétradas	Homofermentativa
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos, normalmente en cadenas	Homofermentativa/ Heterofermentativa
<i>Enterococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativa
<i>Lactococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativa

(Madigan y col., 1999)

### I.1 Género *Lactobacillus*.

Los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* son bacilos Gram positivos, no esporulados que presentan cierto pleomorfismo, desde bastones largos y delgados a curvos y cortos. La longitud de los bacilos y el grado de curvatura depende de la edad del cultivo y la composición del medio. Generalmente se agrupan en cadenas cortas, no presentan movilidad y los que presentan lo hacen por flagelación peritrica (Estela y col., 2007).

El metabolismo de este género es de tipo fermentativo y poseen eficientes vías para utilizar azúcares acopladas a la fosforilación a nivel de sustrato. Las principales vías de fermentación de hexosas son:

- Vía de Embden-Meyerhof (glucólisis), en la cual 1 mol de azúcar se convierte en 2 moles de ácido láctico (fermentación homoláctica).
- Vía de 6-fosfogluconato en la que se obtienen 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol y 1 mol de ácido láctico (fermentación heteroláctica).

Los *Lactobacillus* spp. se pueden clasificar en 3 grupos según lo propuesto por Orla-Jensen en el manual de Bergey (1994):

- Grupo I. Son lactobacilos con un metabolismo homofermentativo obligado, en el cual fermentan las hexosas exclusivamente a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof. Las bacterias de este grupo no pueden fermentar las pentosas dado que carecen de la enzima fosfoacetolasa. Ej.: *L. acidophilus*, *L. crispatus* y *L. jensenii*.
- Grupo II. Las bacterias pertenecientes a este grupo se caracterizan por tener un metabolismo homofermentativo facultativo, en el cual fermentan las hexosas casi

exclusivamente a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof y algunas especies pueden fermentarlas a ácido láctico, etanol, ácido fórmico y ácido acético. También son capaces de fermentar las pentosas por la presencia de la fosfocetolasa inducible por pentosas dando ácido láctico y ácido acético, por la vía de 6-fosfogluconato. Ej.: *L. casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*.

- Grupo III. Comprende microorganismos que tienen un metabolismo heterofermentativo obligado, en el cual fermentan las hexosas a CO<sub>2</sub>, etanol y ácido láctico y fermentan las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Ej.: *L. fermentum* y *L. reuteri*.

Los lactobacilos se caracterizan por crecer en medio sólido dando colonias pequeñas, con bordes netos, convexas, lisas, opacas y sin pigmentos. Son microaeróbios y el crecimiento es mejor en anaerobiosis o con presiones de CO<sub>2</sub> entre 5 y 10%. La reducción de nitratos es altamente inusual, no licúan la gelatina, no producen SH<sub>2</sub> e indol, no digieren la caseína. Son catalasa y citocromo oxidasa negativas. Crecen mejor en un medio ácido con un pH inicial de 4.5 - 6.4 y el crecimiento cesa cuando se llega a un pH de 3.6 - 4, dependiendo de las especies y de las cepas. La mayoría son mesófilos con un límite superior de 40°C e inferior comprendido entre 5 y 15°C. Tienen requerimientos nutricionales complejos como aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos e hidratos de carbono fermentables. Los *Lactobacillus* spp. no desarrollan olores característicos cuando crecen en medios comunes, sin embargo contribuyen al llamado “flavor” de alimentos fermentados, término que hace referencia a la percepción sensitiva en la degustación, por producción de varios compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados. El medio de cultivo adecuado para su desarrollo es caldo o agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), el cual suple las exigencias nutricionales de este grupo (Collado Amores, 2004).

## **I.2 *Lactobacillus* spp. y el cuerpo humano.**

El cuerpo humano vive en cercana armonía con un ecosistema complejo que está compuesto por miles de especies de microorganismos a los que se los denominan microbiota y que habitan la cavidad oral, tracto respiratorio superior y gastrointestinal, vagina y piel. Estos microorganismos, que se adquieren poco después del nacimiento y persisten durante toda la vida, juegan un rol importante en la fisiología del huésped, como en la digestión y asimilación de nutrientes, protección contra la colonización por bacterias patógenas, modulación de la respuesta inmune, etc. (Backhed y col., 2005).

Los lactobacilos se encuentran asociados a diferentes tejidos y la cantidad de microorganismos encontrados depende de la especie animal, la edad del huésped, la localización, etc. Por ejemplo la microbiota del infante es altamente inestable en comparación con la del adulto y el contenido en lactobacilos es variable (Mackie, y col., 1999). Otro ejemplo lo constituye la presencia más pronunciada de *Lactobacillus* spp. en el tracto urogenital femenino que en el masculino y esta distribución dominante generalmente define el tracto de mujeres sanas (Zhou y col., 2007).

La identificación de la microbiota normal que determina un tracto sano, es una tarea complicada, principalmente por el hecho de que varía extensamente entre diferentes individuos, por lo tanto es muy difícil correlacionar el estado de salud con la presencia o ausencia de ciertas especies bacterianas (Lebeer y col., 2008). Otro factor clave en la identificación de los microorganismos que forman parte de la microbiota es la técnica de detección utilizada. Por más de un siglo para identificar los microorganismos presentes en un tejido u órgano sano se utilizaban métodos de cultivo directos, los cuales consistían en el aislamiento y observación de colonias en medios de cultivo no selectivos con incubación en aerobiosis y en anaerobiosis. Pero aquellos microorganismos que, por ejemplo, no son capaces de crecer aislados o tienen exigencias nutricionales específicas, no desarrollaban colonias y por lo tanto resultaban indetectables. Para salvar este problema, hoy en día se aplican tecnologías en base a genes o secuenciamiento de ADN para identificar microorganismos independientemente de su capacidad para cultivarlos (Hyman y col., 2005). Estudios recientes realizados con estas tecnologías confirman que la microbiota vaginal en mujeres premenopáusicas saludables está dominada generalmente por especies de *Lactobacillus*, en especial por *L. iners*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus* (Falagas y col., 2007; Cribby y col., 2008; Martin y col., 2008).

### **I.3 Probióticos.**

El término **probiótico** ha sido definido por La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: “microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del huésped” (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001). Para ser utilizados como probióticos, estos microorganismos deben ser habitantes del cuerpo humano, no patógenos, no toxigénicos, poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales, producir sustancias antimicrobianas, ser resistentes a las condiciones fisiológicas que encontrarán en el huésped, como por ejemplo ser tolerantes al medio

ácido estomacal o al efecto de la bilis en el duodeno, entre otros (Reid y Hammond, 2005; Castro y de Rovetto, 2006).

La mayoría de los probióticos están formulados con bacterias principalmente de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (Carr y col., 2002; Picard y col., 2005), que comúnmente habitan intestino y vagina. Actualmente se investiga la utilización de otros microorganismos como cepas probióticas como bacterias entéricas (Sartor, 2003), especies de *Streptococcus* (Meurman y Stamatova, 2007) y levaduras del género *Sacharomyces* (Czeructa y col., 2007)

Al presente, el uso de probióticos y especialmente los formulados con BAL ha recibido gran atención como una alternativa natural y de bajo costo para restaurar y mantener la salud (Hamilton-Miller, 1997) no sólo en el hombre, sino también en mamíferos y muy recientemente se están utilizando en otros animales, como en peces y crustáceos (Monroy Dosta y col., 2009).

#### **I.4 Mecanismos de acción de cepas de lactobacilos probióticos.**

Las cepas de lactobacilos probióticos influyen sobre la salud del huésped mediante diferentes mecanismos:

- Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y bacteriocinas (Servin, 2004).
- Exclusión competitiva de microorganismos patógenos mediante competencia por nutrientes (Castro y de Rovetto, 2006) o competencia por un receptor que permite la adherencia al epitelio del huésped (Johnson y col., 2007; Lebeer y col., 2008).
- Estimulación de la respuesta inmunológica: los lactobacilos son especialmente necesarios para la respuesta inmunológica primaria y pueden inducir a células dendríticas y células-T, aumentar la actividad fagocítica de monocitos y granulocitos (Rook y Brunet, 2005) y participar en la síntesis de interferón *gamma* y citoquinas proinflamatorias (Reid y col., 2003).
- Modulación de la respuesta inmunológica, importante en la prevención de las enfermedades alérgicas (Kalliomaki y col., 2001).
- Interacciones benéficas con el epitelio: por ejemplo en intestino los lactobacilos intervienen en la síntesis de compuestos útiles para el epitelio, como la vitamina B12 (Santos y col., 2008), modifican el metabolismo de lípidos en hígado, de aminoácidos y de ácidos grasos como el butirato, que es fuente de energía particularmente importante para las células del colon (Martin. y col., 2008). Los

lactobacilos participan también en la inducción de musina, que es un mucopolisacárido que tiene función lubricante y es componente principal del moco, por lo tanto se encuentra en cualquier secreción mucosa de las superficies expuestas a fricción y erosión (Mack y col., 2003).

Es importante aclarar que una cepa probiótica puede participar en muchos, pero no necesariamente en todos los mecanismos anteriormente mencionados.

La aplicación de las BAL como probióticas puede estar dirigida al tratamiento o prevención de diferentes patologías (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001). En los trastornos del aparato digestivo, como diarreas asociadas a virus o bacterias, enfermedades cardiovasculares (De Roos y Katan, 2000; Oxman y col., 2001), prevención de infecciones en el aparato genitourinario (Reid, 2001), entre otras; así como también pueden estar destinadas a mantener la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades a largo plazo en individuos sanos (Hatakka y col., 2001).

#### **I.4.1 Producción de compuestos antimicrobianos.**

La síntesis de compuestos antimicrobianos es uno de los mecanismos probióticos más importantes de los lactobacilos y dentro de las principales sustancias que producen podemos mencionar:

- Acido láctico: es uno de los principales compuestos que liberan las cepas de *Lactobacillus* spp. La fracción no disociada del ácido es la que tiene mayor efecto inhibitorio debido a su naturaleza lipofílica, ya que puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. El resultado es una interferencia en las funciones celulares (como la translocación de sustratos y la fosforilación oxidativa) y un aumento en la concentración de protones en el interior celular lo que disminuye el pH. Esta disminución promueve la desnaturalización proteica y desestabilización de otros componentes estructurales. Cuando la concentración de protones excede la capacidad buffer del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante una bomba dependiente de ATP, reduciendo así las reservas energéticas de la célula. Además, este ácido orgánico funciona como permeabilizador de la membrana plasmática permitiendo que otros compuestos actúen sinérgicamente con él y tiene función quelante, capturando elementos esenciales para el crecimiento microbiano, como el hierro (Vásquez y col., 2009).

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: posee un efecto bacteriostático y bactericida, ya que funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ADN (Jangho-Hyuk y col., 2008). La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo se debe principalmente a que los lactobacilos no poseen catalasa. No todas las cepas de lactobacilos son productoras de éste compuesto.
- Bacteriocinas: son sustancias que producen algunos microorganismos, las cuales presentan un núcleo proteico al cual se unen otros compuestos químicos como glúcidos, lípidos, ARN, etc. mediante modificaciones post-traduccionales y presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias relacionadas y no relacionadas filogenéticamente (Muñoz-Rojas, 2003; Sánchez Ruíz, 2008; Gillord y col., 2008b; Monroy Dosta y col., 2009).
- Otros: biosurfactantes. Esta sustancia o sustancias se absorben a las superficies e inhiben la adhesión inicial del microorganismo patógeno. Están compuestas por proteínas e hidratos de carbono, en algunos casos acompañadas de una elevada cantidad de alanina (Reid, 2001).

#### **I.4.2 Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas fueron inicialmente identificadas como un producto termolábil presente en cultivos de *Escherichia coli* y con efecto antagonista contra algunas cepas de la misma especie y se le dio el nombre de colicina, como para identificar el microorganismo productor. Desde entonces las bacteriocinas han sido aisladas de numerosas bacterias y recientemente han sido descritas como producidas por algunas archaeobacterias (Riley y Wertz, 2002a).

Ecológicamente, las bacteriocinas pueden servir como un factor de competencia o como un factor de defensa, para inhibir el establecimiento de cepas en un nicho ecológico (Gillor y col., 2008a).

Son liberadas al medio extracelular donde cumplen con su función bacteriostática o bactericida (Muñoz-Rojas, 2003).

### **I.4.2.1 Clasificación de bacteriocinas.**

Las bacteriocinas se las pueden clasificar en términos de tamaño, microorganismo diana, modo de acción, liberación de la célula productora y mecanismos inmunológicos. Se pueden dividir en 2 grupos principales: bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas y Gram positivas.

#### **I.4.2.1.1 Bacteriocinas de bacterias Gram negativas.**

De las bacteriocinas de este grupo bacteriano, la que más se conoce es la colicina. Los grupos de genes que codifican para estas bacteriocinas generalmente se localizan en plásmidos encontrándose también, a veces o exclusivamente, en el cromosoma como en el caso de las piocinas producidas por *P. aeruginosa*. El operón que codifica para colicina incluye 3 genes: el gen de la bacteriocina, para la síntesis de una proteína que confiere inmunidad específica a la cepa productora (mediante unión e inactivación de la sustancia antimicrobiana) y un gen de lisis que permite la liberación de la sustancia. Esto significa que la liberación de la colicina es letal para la célula productora (debido a una coexpresión de la colicina y el gen de lisis) y el sentido de este proceso no está del todo elucidado. La síntesis de la colicina se produce principalmente en condiciones de estrés, como por ejemplo en la respuesta SOS que es un sistema de regulación de la expresión genética frente a lesiones en el ADN, aunque también existen otras condiciones ambientales específicas que pueden desencadenarlo (Muñoz Rojas, 2003; Cascales y col., 2007; Gillor y col., 2008b).

El modo de acción de estas bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana plasmática hasta la actividad nucleasa contra ADN, ARN y ARNt (Riley y Wertz, 2002b).

#### **I.4.2.1.2 Bacteriocinas de bacterias Gram positivas.**

Generalmente son catiónicas, anfifílicas, permeabilizan las membranas citoplasmáticas de las células susceptibles y tienen un tamaño entre 2 y 60 KD (Heng y col., 2007). Se diferencian de las bacteriocinas de bacterias Gram negativas principalmente por tres razones (Riley y Wertz, 2002b):

1. Son más abundantes y más diversas que las de bacterias Gram negativas.
2. No son necesariamente letales para la célula productora, ya que en estas bacterias existen mecanismos transportadores dedicados a la liberación de la sustancia que pueden ser específicos de la bacteriocina o transportadores sec-dependientes (Drider y col., 2006).
3. En bacterias Gram positivas hay un sistema de regulación de la síntesis específica y más compleja que en bacterias Gram negativas (Nes y col., 1996).

Las bacteriocinas de las BAL son las mejores caracterizadas de éste grupo y han sido clasificadas en 5 grupos según Kemperman y col. (2003):

- Clase I: comprende bacteriocinas modificadas post-traduccionalmente, conocidas como lantibioticos (Twomey y col., 2002). Se denominan así, porque tienen modificaciones post-traduccionales y contienen residuos de lantionina o sus derivados. La bacteriocina más estudiada de este grupo es la nisina. Están subdivididas en 3 grupos sobre la base de su estructura y modo de acción: **Tipo A lantibioticos** las cuales son pequeños péptidos que contienen moléculas cargadas positivamente y actúan por formación de poros, permitiendo la disipación del potencial de membrana y el eflujo de metabolitos de la célula sensible (Nagao y col., 2006). **Tipo B lantibioticos** que actúan interfiriendo con las reacciones enzimáticas celulares, como la síntesis de pared (Drider y col., 2006) y el último subgrupo, **Tipo C lantibioticos** formado por dos componentes que actúan sinérgicamente (Martín y col., 2004).
- Clase II: incluyen bacteriocinas mínimamente modificadas, estables al calor (Drider y col., 2006). Son también pequeños péptidos pero no contienen lantionina (Oppegård y col., 2007) y la mayoría de las bacteriocinas de este grupo actúan por permeabilización de la membrana y la subsecuente fuga de moléculas en la bacteria diana. Estas bacteriocinas también están subdivididas en grupos: **Clase IIa** es el más grande y sus miembros se distinguen por su actividad compartida frente a bacterias del género *Listeria* y por una secuencia N-terminal conservada que facilita la unión a la superficie de la célula sensible. Esta clase actúa por formación de poros y como ejemplos se pueden nombrar la pediocina y la leucocina A. Las bacteriocinas **Clase IIb**, como la lactacina F y la lactococcina G forman poros compuestos por 2 péptidos diferentes en la membrana diana (Garneau y col., 2002). Por último las bacteriocinas **Clase IIc**, como la acidocina 1B, que son bacteriocinas pequeñas, sec-dependientes y termoestables (Han y col., 2007).

- Clase III: son proteínas termolábiles largas como helveticina J o lactacina B (Dobson y col., 2007).
- Clase IV: incluye bacteriocinas complejas con residuos de lípidos o de hidratos de carbono (Heng y col., 2007). Requieren de la unión con éstos compuestos para su actividad. Se conoce poco sobre su estructura y función, y como ejemplos se pueden nombrar la leucocina S y lactocina 27 (Vermeiren y col., 2006).
- Clase V: abarca bacteriocinas de estructura circular y no modificadas post-traduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A.

Las bacterias productoras de bacteriocinas clase I y II son las estudiadas con mayor frecuencia en la búsqueda de cepas probióticas (Gillor y col., 2008a).

La estructura genética de estas bacteriocinas es más compleja si se las compara con la de bacterias Gram negativas, por ejemplo el cluster de nisina incluye el gen para el pre-péptido (*nisA*), genes de enzimas para la modificación de aminoácidos (*nisB* y *nisC*), gen para el clivado del péptido líder (*nisP*), gen para secreción (*nisT*), genes de inmunidad (*nisI*, *nisF*, *nisE* y *nisG*) y genes regulatorios de la expresión (*nisR* y *nisK*). El grupo de genes para la síntesis de bacteriocinas en bacterias Gram positivas están frecuentemente codificados en plásmidos y ocasionalmente se encuentran en el cromosoma. Algunos pueden encontrarse en transposones, como en el caso de la nisina (Cheigh y Pyun, 2005).

El rango de actividad puede variar desde estrecho, como para la lactocina A que presenta actividad antimicrobiana sólo sobre *Lactococcus* spp., hasta extremadamente amplio, como en el caso de la nisina A que actúa frente a especies de *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* además de un importante grupo de géneros de bacterias Gram negativas como *Campylobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Helicobacter* spp. y *Neisseria* spp. (Morency y col., 2001).

Las bacteriocinas son metabolitos secundarios. La producción de bacteriocinas por bacterias Gram positivas comienza al final de la fase exponencial y se hace máxima en la fase estacionaria de crecimiento, pero la regulación de la expresión no es dependiente de este cambio en el estadio de crecimiento *per se*, sino más bien de la densidad de cultivo (Dufour y col., 2007). Por ejemplo, en el caso de la nisina, la expresión está controlada por un sistema de transducción de señales en 2 componentes, típico de la mayoría de los mecanismos de "quórum sensing", el cual es un sistema de control de la expresión genética dependiente de la densidad celular, en donde el gen *nisR* es el regulador de la respuesta y el gen *nisK* es el sensor quinasa (Hechard y Sahl, 2002).

## **I.5 Perspectivas futuras.**

Por lo evaluado en los puntos anteriores, podemos afirmar que el estado de salud de un tracto en el cuerpo humano es el resultado de varios factores, como la ausencia de patógenos, la presencia de una microbiota adecuada con efectivas propiedades antagónicas y el desarrollo del sistema inmunológico innato y adaptativo competentes, entre otros. Es decir que un microorganismo patógeno puede entrar en contacto con el hospedador y aun así no provocar enfermedad, ya sea porque la cepa no posee los factores de virulencia que permitan el desarrollo de la enfermedad, porque el huésped tiene un sistema inmunológico que erradica al patógeno y/o debido a la presencia de la microbiota benéfica que es la responsable de su eliminación. Pero estos factores no son estáticos, por ejemplo la composición microbiana varía desde un individuo a otro, y en diferentes estadios del mismo individuo, permitiendo que en determinadas circunstancias el microorganismo patógeno colonice y desencadene la enfermedad. Una terapia preventiva sería la utilización de cepas probióticas que al ser administradas a un individuo en particular colonicen y defiendan la mucosa contra la entrada de potenciales microorganismos patógenos. Para ello es importante plantear si el objetivo específico de esta inserción es que la cepa probiótica se vuelva parte e inclusive que reemplace a la microbiota endógena, o sólo que se encuentre en el órgano mientras la microbiota normal se encuentra reducida, por ejemplo post-tratamiento con antibióticos (Cribby y col., 2008; Borchert y col., 2008; Forestier y col., 2008).

Otra aplicación importante sería la utilización de bacteriocinas de manera análoga al uso de antibióticos, es decir como tratamiento de infecciones. La resistencia a antibióticos en la mayoría de los patógenos habituales está aumentando de manera considerable. Esto se debe a la exposición a antibióticos por períodos prolongados o a dosis subletales que promueven la emergencia de subpoblaciones de bacterias resistentes al antimicrobiano. Como consecuencia, se debe utilizar otro antibiótico en la mayoría de los casos de mayor espectro de actividad y mayor toxicidad. Esta situación lleva a la necesidad de diseñar estrategias contra el ataque de patógenos, donde la aplicación de bacteriocinas tendría mucho éxito, dado que son específicas, no tóxicas para el hospedador y de bajo costo (Muñoz Rojas, 2003; Jiménez y col, 2009).

## **I.6 *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.**

Como parte del cepario de la cátedra Bacteriología de la UNRC, se encuentran los microorganismos *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60, que fueron aislados de exudados vaginales de mujeres sanas, sexualmente activas, no embarazadas y

premenopáusicas. Estas cepas están siendo actualmente evaluadas como posibles probióticos urogenitales (Pascual y col., 2008<sub>a, b</sub>).

*L. fermentum* L23 es un microorganismo productor de la bacteriocina L23, la cual pertenece a la clase II de bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Esta bacteriocina es termoestable, de bajo peso molecular, estable a un amplio rango de pH (entre 4 y 7), no es alterada por tratamiento con catalasa ni ureasa, pero sí por proteasas. El espectro de inhibición es amplio e incluye bacterias patógenas Gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*, bacterias patógenas Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* y levaduras como *Candida albicans* (Pascual y col., 2008<sub>b</sub>).

*L. rhamnosus* L60 produce la bacteriocina L60, que pertenece a la clase II de bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Esta bacteriocina es efectiva en un amplio rango de pH (entre 4 y 7, con un óptimo de 5), no es significativamente alterada por cambios de temperatura ni por tratamiento con catalasa ni ureasa y es tripsina sensible. Es un microorganismo resistente a antibióticos utilizados frecuentemente contra infecciones urogenitales, como ofloxacina, ciprofloxacina, ceftazidima, norfloxacina, ácido nalidíxico, vancomicina y metronidazol. En un primer estudio, mostró inhibir a muchos microorganismos patógenos urogenitales, como *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *G. vaginalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *C. albicans*, entre otros. Además ésta cepa produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tiene alta hidrofobicidad, cualidad necesaria para la adherencia al epitelio vaginal (Pascual y col., 2008<sub>a</sub>).

Estudios previos realizados por el equipo de investigación de la cátedra Bacteriología determinaron que las bacteriocinas L23 y L60 puras tienen una actividad de 640UA/ml.

## **Capítulo II. Infecciones en el tracto urogenital femenino.**

Las infecciones en el aparato urogenital femenino se definen como aquellas que afectan vejiga, riñón, uretra, periuretra, vagina y cérvix. Dentro de las infecciones en el tracto genitourinario que no son de transmisión sexual se incluyen: vaginosis bacteriana (VB), vaginitis por levaduras e infecciones en el tracto urinario (ITU). En la mayoría de los casos, el origen de los microorganismos que causan la infección es fecal: los microorganismos ascienden desde el recto a vagina y/o a vejiga, y lo pueden hacer dada la proximidad que se encuentra entre ellos. Este mecanismo de colonización es un proceso

natural, ya que los microorganismos pertenecientes a la microbiota vaginal (e inclusive las cepas probióticas) alcanzan el tracto genitourinario desde intestino (Reid y Bruce, 2003).

## II.1 Características de la Infección en el tracto urinario.

La infección del tracto urinario es una patología cuyo cuadro clínico se caracteriza por presentar alguno de los siguientes síntomas:

- Necesidad urgente y frecuente de orinar.
- Picazón o quemazón al orinar.
- Dolor al orinar.
- Aspecto anormal de la orina. Color turbio o lechoso (espeso).
- Aparición de sangre en la orina.
- Fiebre y escalofríos (la fiebre puede significar que la infección ha alcanzado los riñones).
- Dolor en el costado o espalda (indica infección en los riñones).

A veces la ITU puede ser asintomática. En estas situaciones la colonización microbiana del tracto urinario cursa sin invasión ni respuesta inflamatoria, por lo que el paciente no posee sintomatología pero el urocultivo es positivo.

El diagnóstico se hace mediante el análisis microbiológico de la orina por urocultivo, recuento e identificación del microorganismo patógeno (Foxman, 2002). Por lo general un recuento mayor o igual a  $10^5$  UFC/ml se considera ITU, con excepciones particulares como por ejemplo en el caso de muestras obtenidas por punción suprapúbica donde la presencia de 1 UFC/ml ya es diagnóstico de la infección. Junto con el cultivo de orina se realiza el patrón de sensibilidad a antibióticos de la cepa microbiana aislada, para informar cual/cuales son los antibióticos efectivos que se pueden utilizar en el tratamiento.

La mayoría de los episodios de ITU ocurren en hospedadores inmunocompetentes y con un aparato urinario normal, por lo que se habla de ITU no complicadas. De la misma forma, los casos donde la ITU cursa en hospedadores que tienen un problema base, donde se incluye diabetes, inmunosupresión, anormalidades funcionales o estructurales del tracto urinario se definen como ITU complicadas (Le Nicolle y col., 2005; Tabibian y col., 2008).

La bacteria que con mayor frecuencia causa ITU en mujeres es *E. coli* (en más del 85% de los casos), seguido por cocos Gram positivos como *E. faecalis* y *S. saprophyticus* y

otros bacilos Gram negativos como especies de los géneros *Proteus* y *Klebsiella* (Reid, 2001; Andreu y Planells, 2008; Seija y col.; 2010).

Los microorganismos uropatógenos poseen diferentes factores de virulencia y mecanismos patogénicos que les permiten colonizar e infectar el tracto urinario. Por ejemplo, *Proteus* spp. producen ureasa, la cual hidroliza la urea que se encuentra en el tracto dando  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_2$ . El aumento de  $\text{NH}_4^+$  aumenta el pH urinario, favoreciendo la precipitación de sales en forma de cálculos en riñón o vejiga que sirven como sitio de resguardo para el microorganismo patógeno permitiendo el desarrollo de infecciones recurrentes. Pero existen también algunas características del hospedador que favorecen el desarrollo de la infección por determinado microorganismo patógeno, por ejemplo *P. aeruginosa* es más frecuente encontrarla en ITU de hombres, que generalmente tuvieron tratamiento con antibióticos o procedimientos previos en el tracto urinario (Tabibian y col. 2008).

Las ITU tienen una elevada morbilidad. Se estima que aproximadamente 150 millones de personas sufren esta patología alrededor del mundo, lo cual representa altos costos sanitarios. Hasta 10% de las mujeres experimentan, por lo menos, un episodio de ITU en un año y hasta 60% experimentan un episodio en algún momento de su vida. El pico de incidencia es entre los 18 y 24 años. Los episodios recurrentes se ven en 5% de las mujeres. Pueden traer complicaciones como daño renal, problemas en la gestación como partos prematuros e inclusive la muerte (Reid, 2001; Seija y col.; 2010).

### **Capítulo III. Características del género *Pseudomonas*.**

#### **III.1 Hábitat, metabolismo y cultivo.**

El género *Pseudomonas* pertenece a la clase *Gammaproteobacterias* y la especie representativa del género es *Pseudomonas aeruginosa*. La ubicación taxonómica de la especie se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.** Ubicación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*.

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Pseudomonadales</i>
FAMILIA	<i>Pseudomonadaceae</i>
GENERO	<i>Pseudomonas</i>
ESPECIE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

(Schroeter, 1872; Migula, 1900)

Los microorganismos del género *Pseudomonas* comprenden bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos, no esporulados. Tienen un metabolismo estrictamente respiratorio utilizando O<sub>2</sub> como último aceptor en la cadena de transporte de electrones, por lo que son aerobios, si bien en algunos casos el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede usarse como aceptor alternativo permitiendo así el crecimiento en anaerobiosis. La movilidad está dada por 1 o más flagelos polares y son raramente inmóviles. Algunas especies sintetizan un exopolisacárido mucoide denominado matriz de alginato que facilita la adhesión celular, la formación de biofilm que los protege de la fagocitosis, de la acción de anticuerpos o complemento, aumentando así su patogenicidad. Tienen un metabolismo muy versátil, por lo que pueden colonizar un amplio rango de ecosistemas. Tienen escasos requerimientos nutricionales y muchas especies almacenan gránulos de poli-β-hidroxi-butilato. En medios de cultivo líquidos crecen abundantemente formando un anillo en la superficie y en medios sólidos pueden dar 3 tipos de colonias (Bergey, 1994):

- **Rugosas:** generalmente asociadas a microorganismos aislados de tierra o agua. Son colonias chicas.
- **Lisas:** aisladas de material clínico. Son colonias tipo huevo frito, es decir largas, lisas y con una elevación central.
- **Mucosas:** frecuentemente aislada de infecciones respiratorias o urinarias. Este aspecto mucoide está relacionado a la producción de la matriz de alginato.

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y pueden crecer hasta 42°C. Es tolerante a una amplia variedad de condiciones físicas, como elevadas temperaturas y elevada concentración de sal, así como también es resistente a la presencia de colorantes, varios antisépticos y a la mayoría de los antibióticos comúnmente usados en la clínica (Todar, 2008).

Las especies del género *Pseudomonas* se caracterizan por ser: oxidasa positiva, no productoras de gas a partir de glucosa; y las pruebas indol, rojo de metilo y Voges-Proskawer son negativas. Los cultivos tienen un característico olor frutal. Los microorganismos pertenecientes a éste género pueden producir pigmentos. *P. aeruginosa* es la única especie que produce piocianina, un pigmento azul, hidrosoluble, no fluorescente que puede extraerse con cloroformo. Este pigmento actúa como sideróforo (molécula de unión al hierro) y tiene propiedades antimicrobianas contra *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, amebas y protozoos acuáticos. Esta especie y otras pueden producir pioverdina, pigmento amarillo-verdoso, hidrosoluble (pero insoluble en cloroformo), fluorescente a luz UV que también actúa como sideróforo y cuya secreción está asociada a condiciones limitantes de hierro (Bergey, 1994, Todar, 2008).

Las especies de éste género son ubicuas y se encuentran en suelos, aguas y en las superficies en contacto con ellos. Son predominantes en la rizósfera y filósfera de plantas y han sido aislados tanto de aguas dulces como marinas.

En el género, hay muchos microorganismos de interés, como *P. aeruginosa* que es un importante patógeno humano, *P. syringae* que es un importante patógenos de plantas y *P. fluorescens* que es promotor del crecimiento vegetal.

### **III.2 Estructura antigénica y factores de virulencia.**

La estructura celular del género *Pseudomonas* incluye antígenos (Ag) somático O, Ag flagelares H y fimbriales F. Como todo microorganismo Gram negativo, *Pseudomonas* spp. poseen una membrana externa que en su composición lipopolisacárida incluye el lípido A o endotoxina, responsable del síndrome de shock endotóxico, el cual en términos generales se caracteriza por: fiebre, hipotensión, distrés respiratorio, inhibición de los fagocitos, activación del sistema de coagulación, fibrinólisis, activación de la vía del complemento alternativa y liberación de sustancias vasoactivas.

La patogénesis de las especies del género es multifactorial, ya que la virulencia no se puede atribuir a un único determinante. Producen enzimas extracelulares como elastasa, proteasas, colagenasas y fibrinolisisina, que ayudan a la invasión del microorganismo y dos hemolisinas: fosfolipasa y lecitinasa, las cuales actúan sinérgicamente para solubilizar fosfolípidos de membrana. Son productores de 2 exotoxinas: la exotoxina A y la exotoxina S. La más estudiada es la exotoxina A, la cual actúa sobre el factor de elongación II celular inhibiendo la síntesis de proteínas produciendo necrosis, alteración de macrófagos y fagocitos, hepatotoxicidad, hipotensión, entre otros síntomas. La exotoxina S impide la acción de células fagocíticas en sangre y en

tejidos internos y se sintetiza principalmente en tejidos de pacientes quemados. Producen leucocidina que es una sustancia con acción lítica sobre leucocitos, macrófagos y polimorfonucleares bloqueando de esta forma la barrera primaria de defensa (Martínez, 2007).

Algunas cepas producen bacteriocinas, como la piocina de *P.aeruginosa*.

La matriz de alginato forma el biofilm el cual aísla a las bacterias del ambiente y las protege de los mecanismos de defensa del hospedador, principalmente de la opsonización con anticuerpos, depósito de complemento, fagocitosis y también del ataque de antibióticos (Martínez, 2007).

### **III.3 Patogenia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.**

A pesar de la gran variedad de factores de virulencia *P. aeruginosa* rara vez ataca individuos inmunocompetentes o tejidos no lesionados. Esto que parece contradictorio, refleja la limitada capacidad del microorganismo de colonizar o dañar epitelios intactos, y explica por que la pérdida de la integridad epitelial, acompañada por una disminución en la función inmunológica, es normalmente un pre-requisito para la infección por esta bacteria (Martínez, 2007).

Este microorganismo es un patógeno oportunista, ya que puede formar parte de la microbiota normal del hombre (se lo puede recuperar de piel, mucosa nasal, faringe y materia fecal), pero cuando existe alguna alteración en las barreras primarias de defensa, como heridas o quemaduras, por el uso de dispositivos médicos, como catéteres intravenosos, sondas urinarias, tubos endotraqueales o existe algún problema base como la fibrosis quística e inmunosupresión, *P. aeruginosa* es capaz de producir enfermedad. Puede entonces estar involucrada en muchas patologías como ITU, septicemia, neumonía, infecciones intestinales, dermatitis, endocarditis, osteocondritis, entre otras. Que se establezca cada una de estas patologías depende principalmente de los factores de virulencia que expresa el microorganismo patógeno y las condiciones predisponentes que presenta el epitelio.

Las infecciones por *P. aeruginosa* son tanto invasivas como toxigénicas y se las pueden analizar en 3 estadios (Todar, 2008):

1. **Colonización:** como es una bacteria que se encuentra en el ambiente y también es parte de la microbiota humana, es muy difícil descubrir cual fue el origen de microorganismos en una patología. La adherencia es el principal mecanismo

implicado en esta etapa y se sabe que está mediada por la unión de pilis a receptores de la superficie epitelial. En el caso de la colonización del epitelio respiratorio, el proceso puede estar acompañado de la producción de proteasas que degraden la fibronectina como para exponer el receptor del pili en las células. Una injuria en el epitelio juega un rol importante en la colonización, como la lesión provocada por el avance de un primer patógeno al tejido, quemaduras, heridas, y demás. La matriz de alginato favorece la permanencia de la bacteria evadiendo la defensa del huésped.

2. **Invasión**: la habilidad de invadir tejidos depende de la producción de enzimas extracelulares y toxinas. Las enzimas rompen la integridad epitelial y permiten que ocurra la infección, mientras las toxinas contribuyen a la invasión a través de su efecto citotóxico contra neutrófilos, linfocitos y otras células eucariotas.
3. **Diseminación**: la posibilidad de alcanzar sangre y diseminarse a otros tejidos está mediada por los mismos factores asociados a las infecciones localizadas. Principalmente la endotoxina microbiana es la responsable de los aspectos patológicos de la septicemia.

### III.4 Resistencia a antibióticos.

*P. aeruginosa* es un microorganismo importante como patógeno principalmente por su elevada resistencia a antibióticos. Esta resistencia es debida, entre otros factores, a la naturaleza de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la cual actúa como una barrera a la entrada del antibiótico. Además este microorganismo tiende a colonizar las superficies con formación de biofilm, lo que impide que la bacteria esté en contacto con concentraciones terapéuticas del antibiótico (Todar, 2008).

Muchos de los genes de resistencia a antibióticos en este microorganismo están en plásmidos que se pueden adquirir por mecanismos de transferencia génica horizontal, principalmente por conjugación y transducción. Esto significa que el patrón de sensibilidad a antibióticos de una cepa de *P. aeruginosa* puede cambiar por adquisición de nueva información genética.

*P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a diversos antibióticos, como beta lactámicos, macrólidos, tetraciclinas y la mayoría de las fluoroquinolonas. El amplio número de antibióticos restantes pueden ser efectivos pero no contra todas las cepas de esta especie ya que *P. aeruginosa* es capaz de desarrollar resistencia a cualquiera de estos agentes, con frecuencia bajo la influencia de la exposición antibacteriana previa. El riesgo

de emergencia de resistencia antimicrobiana como consecuencia de la exposición a antibióticos varía según el fármaco empleado (Driscoll y col., 2007; Riverón y col., 2003).

Los mecanismos generales de resistencia antibacteriana comprenden el bloqueo del ingreso, la salida activa de la célula, la degradación enzimática y la alteración de la estructura blanco (Driscoll y col., 2007; Riverón y col., 2003).

En la actualidad se están buscando terapias alternativas que permitan disminuir la probabilidad de infección por cepas de *P. aeruginosa* (prevención) o actuar sobre el microorganismo una vez establecido (tratamiento). El uso de bacteriocinas o microorganismos productores de bacteriocinas con propiedades antagonistas sobre cepas de *P. aeruginosa*, podría ser una estrategia efectiva aplicable en diferentes procesos infecciosos (Muñoz- Rojas, 2003; Borchert y col.; 2008).

## 2 Hipótesis.

- Las bacteriocinas L23 y L60 producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 respectivamente presentan actividad antimicrobiana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de procesos infecciosos.
- El efecto inhibitorio de las bacteriocinas L23 y L60 es sinérgico frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de procesos infecciosos.

### 3 Objetivos.

#### **Objetivo general:**

El objetivo de éste trabajo de investigación fue estudiar la actividad de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **Objetivos específicos:**

1. Identificar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas.
2. Determinar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Detectar la actividad antimicrobiana de las cepas *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Estudiar las interacciones entre *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 productores de bacteriocinas y diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Estudiar la Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF) de las bacteriocinas sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

## **4 Materiales y métodos.**

### **4.1 Identificación y almacenamiento de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.**

#### **4.1.1 Cepas de *Lactobacillus* spp. Utilizadas.**

Se trabajó con las cepas *L. rhamnosus* L23 y *L. fermentum* L60 pertenecientes al cepario de la cátedra Bacteriología de la UNRC. Estas cepas se aislaron previamente del tracto genital femenino de mujeres sanas, no embarazadas, sexualmente activas y premenopáusicas (Pascual y col., 2008<sub>a, b</sub>).

Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS (Man, Rogosa, and Sharpe- Britania) o también conocido como agar Rogosa durante 24 h a 37°C en microaerobiosis (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente se obtuvieron colonias aisladas en agar MRS incubando en idénticas condiciones y la pureza de la cepa se confirmó por tinción de Gram.

#### **4.1.2 Identificación.**

Se realizaron las pruebas bioquímicas (de género, grupo y especie) sugeridas en el manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (1994) para la identificación de las cepas; y los resultados se confirmaron por el sistema de identificación semiautomatizado API 50 CH (Laboratorio BioMérieux). Además se realizó la genotipificación de cada cepa con almacenamiento en el GenBank.

##### **4.1.2.1 Identificación de *Lactobacillus* spp. por pruebas bioquímicas.**

A partir de colonias aisladas características crecidas en agar MRS, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas identificatorias (anexo I y II):

- 1) Pruebas bioquímicas para la identificación de género *Lactobacillus* (tabla 3).

**Tabla 3.** Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Lactobacillus*.

**Pruebas bioquímicas**  
Catalasa  
Reducción de nitrato  
Producción de indol  
Hidrólisis de la Gelatina  
Producción de SH<sub>2</sub>

Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (1994)

2) Pruebas bioquímicas para la identificación de grupos de lactobacilos (tabla 4).

**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas para la identificación de grupos de lactobacilos.

**Pruebas bioquímicas**  
Arginina dehidrolasa  
Gas glucosa  
Desarrollo a 45°C  
Fermentación del gluconato  
Fermentación de ribosa

Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (1994)

3) Pruebas bioquímicas para la identificación de especies (tabla 5).

**Tabla 5.** Patrón de fermentación de hidratos de carbono por especies de *Lactobacillus*.

<b>Azúcar</b>	<b><i>Lactobacillus fermentum</i></b>	<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i></b>
Arabinosa	d	d
Celobiosa	d	+
Fructosa	+	+
Galactosa	+	+
Lactosa	+	+
Maltosa	+	+
Manosa	+	+
Melibiosa	+	-
Rafinosa	+	-
Salicina	-	+
Sacarosa	+	+
Trehalosa	d	+
Xilosa	d	-

Referencias: (+)= más del 90% positiva;(-)= más del 90% negativa;  
d= entre 11-89% de las cepas positivas.

#### 4.1.2.2 Identificación de *Lactobacillus* spp. por API 50 CH.

API 50 CH es un sistema de identificación semiautomatizado empleado para el estudio de la utilización bacteriana mediante fermentación de hidratos de carbono y sus derivados como polialcoles, heterósidos y ácidos urónicos. El sistema comercial para la identificación de especies de *Lactobacillus* consiste en 50 microtubos con los sustratos fermentables, los cuales se rehidrataron e inocularon con una suspensión de la cepa en estudio en el medio API 50 CHL equivalente al tubo 2 en la escala de McFarland. Las galerías se cubrieron con vaselina estéril, se incubaron a 37°C y se leyeron los resultados a las 48 h. Los datos se interpretaron como positivo (+), negativo (-) o dudoso (D) y fueron ingresados al sistema Mini API 50 CH para su procesamiento. En la tabla 6 se observa la composición de cada microtubo.

**Tabla 6.** Composición de los microtubos de la galería API 50 CH.

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	TUBO	ENSAYO	COMPONENTES ACTIVOS
0		TESTIGO	25	ESC	ESCULINA-CITRATO FERRICO
1	GLY	GLICEROL	26	SAL	SALICINA
2	ERY	ERITRITOL	27	CEL	D_CELOBIOSA
3	DARA	D_ARABINOSA	28	MAL	D_MALTOSA
4	LARA	L_ARABINOSA	29	LAC	D_LACTOSA (origen bovino)
5	RIB	D_RIBOSA	30	MEL	D_MELIBIOSA
6	DXYL	D_XILOSA	31	SAC	D_SACAROSA
7	LXYL	L_XILOSA	32	TRE	D_TREHALOSA
8	ADO	D_ADONITOL	33	INU	INULINA
9	MDX	METIL_BD_XILOPIRANOSIDA	34	MLZ	D_MELESITOSA
10	GAL	D_GALACTOSA	35	RAF	D_RAFINOSA
11	GLU	D_GLUCOSA	36	AMD	ALMIDON
12	FRU	D_FRUCTOSA	37	GLYG	GLICOGENO
13	MNE	D_MANOSA	38	XLT	XILITOL
14	SBE	L_SORBOSA	39	GEN	GENTIOBIOSA
15	RHA	L_RAMNOSA	40	TUR	D_TURANOSA
16	DUL	DULCITOL	41	LYX	D_LIXOSA
17	INO	INOSITOL	42	TAG	D_GATOSA
18	MAN	D_MANITOL	43	DFUC	D_FUCOSA
19	SOR	D_SORBITOL	44	LFU	L_FUCOSA
20	MDM	METIL_AD_MANOPIRANOSIDA	45	DARL	D_ARABITOL
21	MDG	METIL_AD_GLUKOPIRANOSIDA	46	LARL	L_ARABITOL
22	NAG	N_ACETILGLUCOSAMINA	47	GNT	GLUCONATO POTASICO
23	AMY	AMIGDALINA	48	2KG	2_CETOGLUCONATO POTASICO
24	ARB	ARBUTINA	49	5KG	5_CETOGLUCONATO POTASICO

### 4.1.3 Almacenamiento de las cepas.

Las cepas de *Lactobacillus* se sembraron en placas y en caldo MRS y se incubaron a 37°C 24 h en microaerobiosis. Las placas se almacenaron a 4°C realizándose repiques cada 20 días aproximadamente y a los tubos con caldo se les agregó glicerol al 30% conservándose a -20°C durante tiempos prolongados.

## 4.2 Aislamiento, identificación y almacenamiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.2.1 Aislamiento.

Se trabajó con 31 cepas de *P. aeruginosa* que fueron aisladas en el Hospital de Río Cuarto a partir de distintos materiales clínicos. Las mismas se sembraron en agar cetrimide y se incubaron 24 h a 37°C en aerobiosis. Se realizó coloración de Gram a las colonias aisladas para confirmar que los microorganismos fueran bacilos Gram negativos.

### 4.2.2 Identificación.

Se realizaron pruebas metabólicas identificatorias de familia y de especie aconsejadas en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (1994) que se observan en las tablas 7 y 8, respectivamente. El fundamento e interpretación de cada una de las pruebas se explica en el anexo II.

**Tabla 7.** Pruebas bioquímicas para la identificación de la familia *Pseudomonadaceae*.

#### Pruebas bioquímicas

Oxidasa

OF glucosa

Indol

Rojo de metilo

Voges- Proskauer

**Tabla 8:** Pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Pruebas bioquímicas**

Desarrollo a 42°C

Tolerancia al ceftrime

Catalasa

Hidrólisis de la gelatina

Reacción del nitrato

Almidón

Producción de pirocianina

Producción de piroverdina

Hidrólisis de la arginina

### 4.2.3 Almacenamiento de las cepas.

Las cepas de *P. aeruginosa* crecieron en caldo tripteína soya durante 24 h a 37°C en aerobiosis y se agregó glicerol al 30% para su almacenamiento a -20°C. Cada cepa se sembró en una placa de Petri conteniendo agar tripteína soya y se incubó en las condiciones anteriormente descritas. Las placas se almacenaron a 4°C para su utilización diaria, realizándose repiques cada 20 días.

### 4.3 Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

El patrón de sensibilidad de *P. aeruginosa* a los antibióticos se estudió siguiendo la técnica de Bauer y col (1966). Se realizó un cultivo de 24 h de incubación en aerobiosis a 37°C en caldo tripteína soya, a partir del cual se preparó una suspensión microbiana de turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland en el mismo medio. Se considera que esta turbidez es correspondiente a una concentración de 10<sup>8</sup>UFC/ml. Utilizando un hisopo estéril se sembró la suspensión en placas de agar Muller-Hinton. Los antibióticos a ensayar fueron los utilizados generalmente para uso clínico. Se colocaron multidiscos para bacilos Gram negativos serie 2 (Britania) sobre la placa ya sembrada. Las placas fueron incubadas 18-24 h en aerobiosis a 37°C y posteriormente se leyeron los resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano según los criterios de susceptibilidad y resistencia aprobados por el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS, 2005). Se evaluó la sensibilidad a los siguientes antibióticos: amicacina (AKM) 30 µg, meropenem (MEM) 10 µg,

piperacilina/tazobactama (TAZ) 5 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, cefepime (FEP) 30 µg y cefalotina (CEF) 30 µg.

#### 4.4 Detección de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

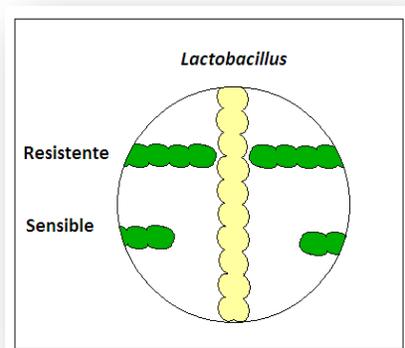
Se utilizó la técnica de estrías cruzadas, la cual permitió evaluar la actividad antimicrobiana de cada lactobacilo productor de bacteriocinas sobre las 31 cepas de *P. aeruginosa*. El ensayo se realizó en tres días consecutivos (Kullisaar y col., 2002).

DIA 1: a partir de un caldo de 24 h de incubación de los lactobacilos se realizó una estría central utilizando un ansa en rulo en una placa de agar MRS y se incubó 24 h a 37°C en microaerobiosis.

DIA 2: se inactivaron los *Lactobacillus* spp. por exposición de las placas a vapores de cloroformo durante 20 min y se sembró cada cepa de *P. aeruginosa* en una estría perpendicular a la anterior, utilizando como inóculo un cultivo en caldo tripteína soya de 24 h de incubación. Se incubaron las placas 18-24 h a 37°C en aerobiosis.

DIA 3: lectura de resultados. Si las sustancias producidas por los lactobacilos tienen efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* se ve una zona de inhibición o “halo” de tamaño proporcional a la actividad de la cepa. Los halos de inhibición se midieron en milímetros (Figura 1).

Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó una cepa de *E. coli* sensible a la acción de estas cepas de lactobacilos como control positivo de la técnica.



**Figura 1.** Técnica de estrías cruzadas para la detección de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus*.

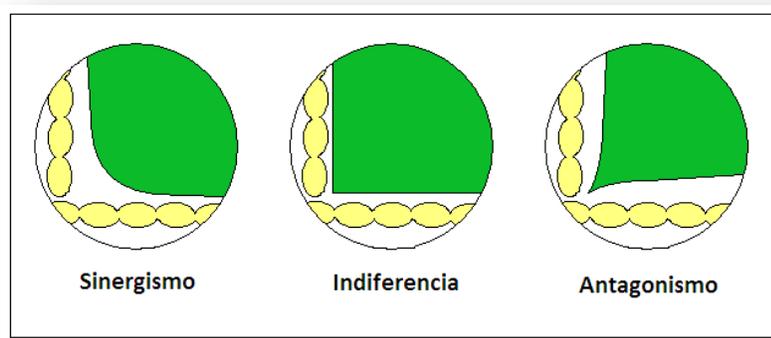
#### 4.5 Ensayo de interacción entre *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 y diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

La técnica de estrías perpendiculares permitió evaluar el efecto combinado de las cepas de lactobacilos sobre cada de las 31 cepas de *P. aeruginosa*. El ensayo también se realizó en 3 días consecutivos y se realizaron por triplicado. (Ruiz y col., 2009).

DIA 1: a partir de un cultivo en MRS de 24 h de incubación de los lactobacilos se sembraron formando un ángulo de 90° en una placa de agar MRS. Se incubaron las placas 24 h a 37°C en microaerobiosis.

DIA 2: se inactivaron las placas por exposición a vapores de cloroformo durante 20 min. Se sembró el espacio de las placas comprendido entre las 2 estrías con la cepa de *P. aeruginosa* a partir de una suspensión de 24 h de incubación equivalente al tubo 0.5 en la escala de McFarland en caldo tripteína soya, utilizando un hisopo estéril. Se incubó 18-24 h a 37°C en aerobiosis.

DIA 3: lectura de resultados (figura 2). Para medir el efecto de las sustancias antimicrobianas se evaluó la zona de intersección entre las cepas de *Lactobacillus* spp. y el efecto que tuvo sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Si se observa en la zona de intersección entre los lactobacilos un halo de inhibición del crecimiento microbiano mayor a cada uno de los mismos de manera independiente se denomina **sinergismo**. Si el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en la zona de intersección de ambos lactobacilos no varía respecto a los halos de inhibición del crecimiento en forma independiente, el efecto entre las bacteriocinas es de **indiferencia**. Cuando el halo de inhibición del crecimiento en la zona de intersección entre las cepas de lactobacilos es menor que cada uno de ellos de manera independiente, corresponde a una interacción **antagónica**.



**Figura 2.** Técnica de interacción entre dos cepas de *Lactobacillus* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **4.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas.**

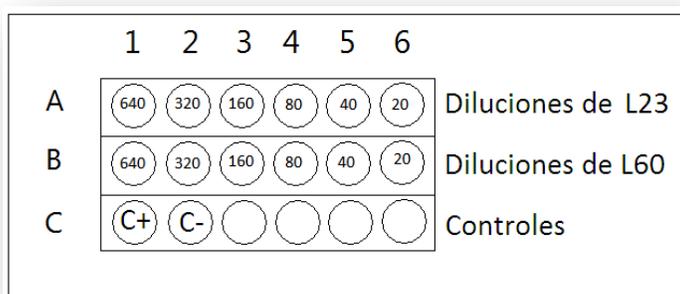
Este estudio permitió determinar la CIM de las bacteriocinas necesaria para inhibir el crecimiento de las 5 cepas de *P. aeruginosa* evaluadas (Mota-Meira y col.; 2000).

La extracción del sobrenadante libre de células (SLC) de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se realizó a partir de un cultivo de menos de 24 h de incubación de cada uno de los lactobacilos crecidos en agar MRS. Para ello, se tomaron 2 o 3 colonias y se inoculó un caldo MRS el cual fue incubado durante 24 h a 37°C en microaerobiosis. Se tomó 0.5 ml de este cultivo y se trasvasó a 9.5 ml de caldo fresco MRS el que se incubó en las mismas condiciones (dilución al 5% (V/V)). Este cultivo se centrifugó a 8500 rpm durante 20 min a 4°C y se extrajo el sobrenadante, el cual se esterilizó por exposición a vapores de cloroformo durante 20 min. El SLC obtenido fue fraccionado en tubos estériles, neutralizado con NaOH 1N hasta alcanzar pH 6 y para el caso del SLC de *L. rhamnosus* L60 fue además tratado con peroxidasa (0,1 mg/ml). Como se eliminó el efecto antimicrobiano de otras sustancias inhibitorias presentes en el SLC, se puede correlacionar el efecto inhibitorio exclusivamente a la acción de las bacteriocinas.

Por otro lado, partir de cada cepa de *P. aeruginosa* se realizó una suspensión con una turbidez correspondiente al tubo 0.5 de la escala de McFarland en caldo tripteína soya, la cual se utilizó como inóculo para la siembra del ensayo.

Se emplearon policubetas de 96 pozos con una capacidad de 200µl por pozo. En la fila A se determinó la CIM de la bacteriocina L23 de la siguiente manera: se realizaron diluciones seriadas en base 2 en la fila A utilizando los SLC conteniendo la bacteriocina L23 utilizando caldo MRS como diluyente. A continuación se agregó a cada pozo 75µl de inóculo de *P. aeruginosa*. De la misma forma se procedió con el SLC conteniendo la bacteriocina L60 en la fila B (figura 3).

Se utilizaron los siguientes controles: control positivo (pozo C1) conteniendo 100µl de caldo MRS y 100µl de inóculo de *P. aeruginosa*, control negativo (pozo C2) conteniendo únicamente 200µl de caldo MRS.



**Figura 3.** Determinación de la CIM de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Ref.: Los valores representados en cada pozo corresponden a las diluciones de las bacteriocinas (UA/ml). C+= control positivo y C-= control negativo.

Una vez sembradas las policubetas se incubaron 18 h a 37°C en aerobiosis. Por último, se revelaron las placas mediante el agregado de 10µl de una solución de tetrazolio (TTC= cloruro de 2, 3,5 trifenil tetrazolio- Sigma) al 5% en agua destilada a cada pozo y se incubó 2h a 37°C en aerobiosis. Esta sal cuando es sustrato de dehidrogenasas bacterianas se reduce, pasando de incoloro a rojo. Los pozos con crecimiento de *P. aeruginosa* van a tomar una coloración roja por acción de las enzimas sobre la sal y aquellos donde las bacteriocinas inhiban el desarrollo microbiano, no van a tener cambio de coloración.

Se consideró como CIM a la mínima concentración de bacteriocina que inhibe el crecimiento microbiano.

#### 4.7 Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) de las bacteriocinas.

En este estudio se realizó una adaptación de la técnica CIF propuesta por Krogstad y Moellering (1980), que habitualmente se emplea para evaluar sinergismo entre antibióticos, para valorar la interacción entre bacteriocinas. Mediante esta técnica se analizan las posibles combinaciones entre 2 sustancias antimicrobianas diluidas serialmente y los resultados se expresan en términos de CIF. El valor CIF se determina realizando el cociente entre la CIM del agente antimicrobiano en la combinación y la CIM de la sustancia sola, según la siguiente fórmula:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM A en AB}}{\text{CIM A}} + \frac{\text{CIM B en AB}}{\text{CIM B}}$$

Donde A y B representan las sustancias antimicrobianas a evaluar y AB se refiere a las sustancias en la combinación.

Cuando el índice CIF es menor o igual a 0.5, la interacción entre las sustancias antimicrobianas es sinérgica. Cuando el índice CIF está comprendido entre 0.51 y 0.99 la interacción entre las sustancias es parcialmente sinérgica. Si el valor CIF está entre 1 y 2, la interacción entre las sustancias antimicrobianas es indiferente, y si se obtienen índices mayores que 2, las sustancias interaccionan antagónicamente (White y col., 1996).

Para este ensayo se obtuvieron los SLC conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 como se explicó en el apartado anterior. Se utilizaron las mismas cepas de *P. aeruginosa* que en la determinación de la CIM con cada una de las cuales se realizó una suspensión en caldo tripteína soya de turbidez proporcional al tubo 0.5 de la escala de McFarland que sirvió como inóculo de siembra.

Para determinar el índice CIF se realizaron diluciones seriadas en base 2 de las bacteriocinas L23 y L60 en tubos ependorff utilizando caldo MRS como diluyente. Estas diluciones se sembraron en policubetas de 96 pozos de la siguiente manera (Figura 4):

Fila A: se colocó 75µl de la bacteriocina L60 sin diluir en cada pozo.

Fila B: se colocó 75µl de la dilución 1/2 de la bacteriocina L60 en cada pozo.

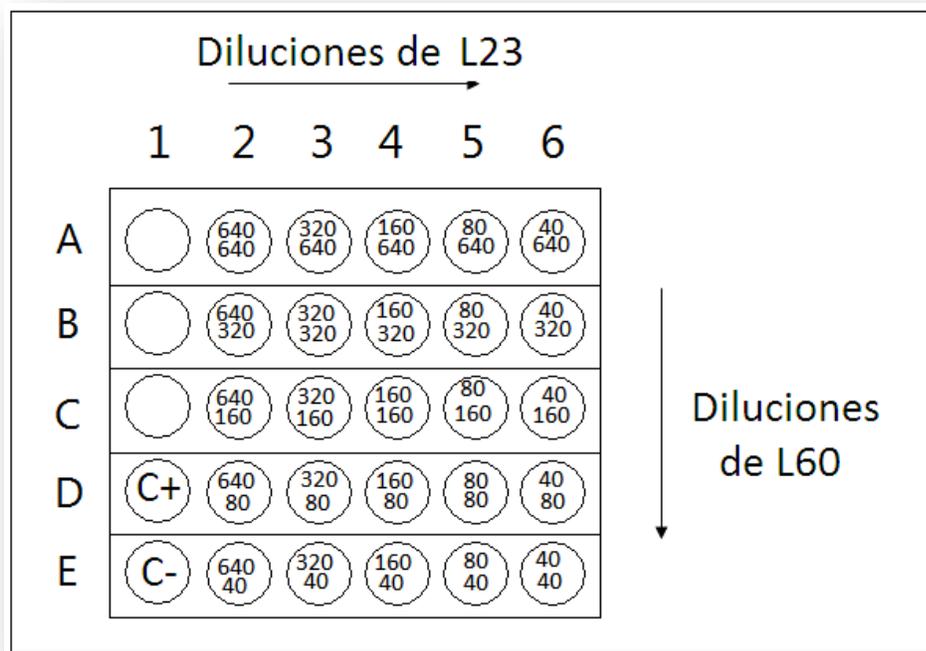
Filas C, D y E: se colocó 75µl de la dilución 1/4, 1/8 y 1/16 de la bacteriocina L60 respectivamente en cada pozo.

De forma similar se procedió para las diluciones de la bacteriocina L23:

Columna 2: se colocó 75µl la bacteriocina L23 sin diluir en cada pozo.

Columna 3: se colocó 75µl la dilución 1/2 de la bacteriocina L23 en cada pozo.

Columnas 4, 5 y 6: se colocó 75µl las diluciones 1/4, 1/8 y 1/16 de la bacteriocina L23 respectivamente en cada pozo.



**Figura 4.** Determinación de la CIF de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Referencias: Los valores representados en cada pozo corresponden a las diluciones de las bacteriocinas (UA/ml). C+= control positivo y C-= control negativo.

Luego, se procedió a la siembra del inóculo de *P. aeruginosa*, para lo cual se agregó 25µl de la suspensión microbiana en todos los pozos.

En el pozo D1 se sembró 100µl de caldo MRS y 100µl de inóculo constituyendo así el control positivo de la técnica y como control negativo se sembró el pozo E1, el cual tuvo únicamente 200µl de caldo MRS.

Se incubaron las policubetas 18 h a 37°C en aerobiosis. Se revelaron las placas mediante el agregado de 10µl de una solución al 5% de tetrazolio a cada pozo y posteriormente se observó la presencia/ausencia de coloración roja posterior a 2h de incubación a 37°C en aerobiosis, como se explicó en el apartado 4.6.

Se realizaron los cálculos del índice CIF como se explicó anteriormente.

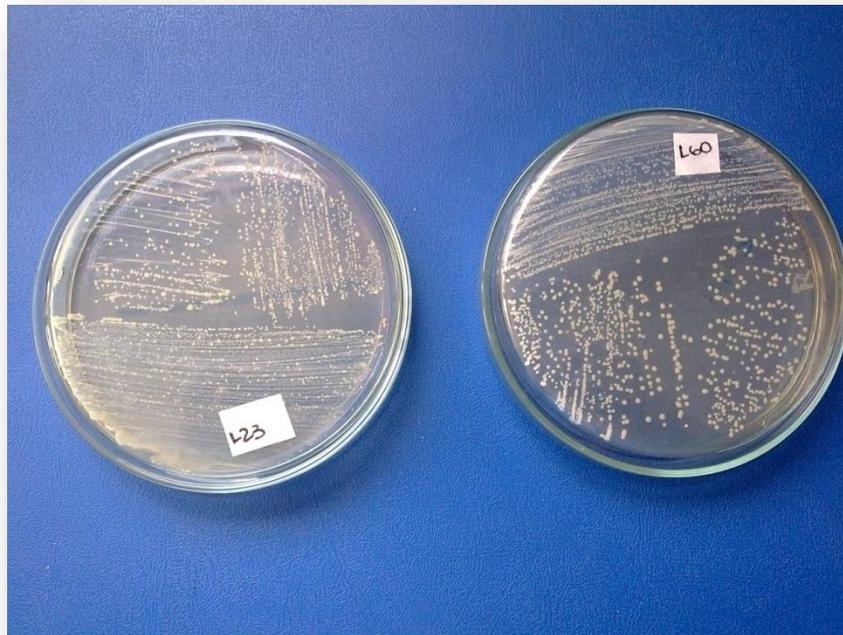
#### **4.8 Análisis estadístico.**

Se testeó la normalidad de los datos obtenidos mediante un análisis de varianza. Se utilizó el procedimiento One Way ANOVA y se trabajó con un nivel de significancia  $p \leq 0.01$ . El análisis fue procesado mediante el software Sigma Stat Statical versión 2.0 para Windows 95 NT & 3.1 (SPSS Inc. Chicago, USA).

## 5 Resultados y discusión.

### 5.1 Cultivo e identificación de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Las colonias de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aisladas en agar MRS presentaron la morfología característica de lactobacilos: colonias lisas, opacas de bordes netos y sin pigmentos (figura 5).



**Figura 5.** Morfología de colonias de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en agar MRS.

La observación de la tinción de Gram de estos cultivos mostró también esta morfología, observándose bacilos Gram positivos grandes no esporulados, ubicados individualmente, de a pares o en cadenas cortas.

Las pruebas bioquímicas identificatorias de género confirmaron que las cepas de lactobacilos estudiadas pertenecían al género *Lactobacillus* (tabla 9).

**Tabla 9:** Pruebas metabólicas para la identificar el género *Lactobacillus*.

Prueba Metabólica	Resultado
Catalasa	-
Reducción de nitrato	-
Producción de indol	-
Hidrólisis de la gelatina	-
Producción de SH <sub>2</sub>	-

Por los resultados de las pruebas metabólicas de grupo basadas en la clasificación de Orla-Jensen (Bergey, 1994), podemos confirmar que la cepa *L. rhamnosus* L60 pertenece al grupo II de *Lactobacillus*: homofermentadores facultativos y la cepa *L. fermentum* L23 pertenece al grupo III de *Lactobacillus*: heterofermentadores obligados (tabla 10).

**Tabla 10.** Pruebas bioquímicas para la identificación de grupos de *Lactobacillus*.

Género <i>Lactobacillus</i>			
GRUPO I: Homofermentadores obligados			
GRUPO II: Homofermentadores facultativos			
GRUPO III: Heterofermentadores obligados			
Características bioquímicas diferenciales de los 3 grupos de <i>Lactobacillus</i> según Orla- Jensen (Bergey, 1994).			
Característica bioquímica	GRUPO I <i>Termobacterium</i>	GRUPO II <i>Streptpbacterium</i>	GRUPO III <i>Betabacterium</i>
Arginina dehidrolasa	-	-	+
Gas desde glucosa	-	-	+
Desarrollo a 45°C	+	-	D
Fermentación de gluconato	-	+	+
Fermentación de ribosa	-	+	+

Para la identificación de especies se realizaron las pruebas de fermentación de hidratos de carbono propuestas por el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (1994). Los resultados de estas pruebas junto con la confirmación brindada por API 50 CH indican que la cepa L23 pertenece a la especie *L. fermentum* y que la cepa L60 pertenece a la especie *L. rhamnosus*. Los resultados del perfil bioquímico API 50 CH se observan en la tabla 11 y 12.

**Tabla 11.** Resultados de API 50 para *Lactobacillus rhamnosus* L60

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	48h
0		TESTIGO	-
1	GLY	GLICEROL	-
2	ERY	ERITRITOL	-
3	DARA	D_ARABINOSA	-
4	LARA	L_ARABINOSA	-
5	RIB	D_RIBOSA	+
6	DXYL	D_XILOSA	-
7	LXYL	L_XILOSA	-
8	ADO	D_ADONITOL	-
9	MDX	METIL_BD_XILOPIRANOSIDA	-
10	GAL	D_GALACTOSA	+
11	GLU	D_GLUCOSA	+
12	FRU	D_FRUCTOSA	+
13	MNE	D_MANOSA	+
14	SBE	L_SORBOSA	+
15	RHA	L_RAMNOSA	+
16	DUL	DULCITOL	-
17	INO	INOSITOL	-
18	MAN	D_MANITOL	+
19	SOR	D_SORBITOL	+
20	MDM	METIL_AD_MANOPIRANOSIDA	-
21	MDG	METIL_AD_GLUKOPIRANOSIDA	+
22	NAG	N_ACETILGLUCOSAMINA	+
23	AMY	AMIGDALINA	+
24	ARB	ARBUTINA	+
25	ESC	ESCULINA-CITRATO FERRICO	+
26	SAL	SALICINA	+
27	CEL	D_CELOBIOSA	+
28	MAL	D_MALTOSA	+

(Continuación Tabla 11).

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	48h
29	LAC	D_LACTOSA (origen bovino)	+
30	MEL	D_MELIBIOSA	-
31	SAC	D_SACAROSA	+
32	TRE	D_TREHALOSA	+
33	INU	INULINA	-
34	MLZ	D_MELESITOSA	+
35	RAF	D_RAFINOSA	-
36	AMD	ALMIDON	-
37	GLYG	GLICOGENO	-
38	XLT	XILITOL	-
39	GEN	GENTIOBIOSA	+
40	TUR	D_TURANOSA	+
41	LYX	D_LIXOSA	-
42	TAG	D_GATOSA	+
43	DFUC	D_FUCOSA	-
44	LFU	L_FUCOSA	-
45	DARL	D_ARABITOL	-
46	LARL	L_ARABITOL	-
47	GNT	GLUCONATO POTASICO	+
48	2KG	2_CETOGLUCONATO POTASICO	-
49	5KG	5_CETOGLUCONATO POTASICO	-

**Tabla 12.** Resultados de API 50 para *Lactobacillus fermentum* L23.

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	48h
0		TESTIGO	-
1	GLY	GLICEROL	-
2	ERY	ERITRITOL	-
3	DARA	D_ARABINOSA	-
4	LARA	L_ARABINOSA	-
5	RIB	D_RIBOSA	+
6	DXYL	D_XILOSIA	-
7	LXYL	L_XYLOSIA	-
8	ADO	D_ADONITOL	-
9	MDX	METIL_BD_XILOPIRANOSIDA	-

(Continuación Tabla 12).

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	48h
10	GAL	D_GALACTOSA	+
11	GLU	D_GLUCOSA	+
12	FRU	D_FRUCTOSA	+
13	MNE	D_MANOSA	-
14	SBE	L_SORBOSA	-
15	RHA	L_RAMNOSA	-
16	DUL	DULCITOL	-
17	INO	INOSITOL	-
18	MAN	D_MANITOL	-
19	SOR	D_SORBITOL	-
20	MDM	METIL_AD_MANOPIRANOSIDA	-
21	MDG	METIL_AD_GLUKOPIRANOSIDA	-
22	NAG	N_ACETILGLUCOSAMINA	-
23	AMY	AMIGDALINA	-
24	ARB	ARBUTINA	-
25	ESC	ESCLINA-CITRATO FERRICO	-
26	SAL	SALICINA	-
27	CEL	D_CELOBIOSA	-
28	MAL	D_MALTOSA	+
29	LAC	D_LACTOSA (origen bovino)	+
30	MEL	D_MELIBIOSA	+
31	SAC	D_SACAROSA	+
32	TRE	D_TREHALOSA	-
33	INU	INULINA	-
34	MLZ	D_MELESITOSA	-
35	RAF	D_RAFINOSA	+
36	AMD	ALMIDON	-
37	GLYG	GLICOGENO	-
38	XLT	XILITOL	-
39	GEN	GENTIOBIOSA	-
40	TUR	D_TURANOSA	-
41	LYX	D_LIXOSA	-
42	TAG	D_GATOSA	-
43	DFUC	D_FUCOSA	-
44	LFU	L_FUCOSA	-
45	DARL	D_ARABITOL	-
46	LARL	L_ARABITOL	-
47	GNT	GLUCONATO POTASICO	+
48	2KG	2_CETOGLUCONATO POTASICO	-
49	5KG	5_CETOGLUCONATO POTASICO	-

## 5.2 Cultivo e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas de *P. aeruginosa* mostraron en agar cetrimide colonias con morfología característica: colonias pigmentadas, algunas mucoides, por lo general pequeñas. Al microscopio se observó que estas colonias estaban formadas por bacilos delgados Gram negativos que se disponían aislados o en cadenas cortas.

Por medio de pruebas metabólicas se determinó que todas las cepas pertenecían a la familia *Pseudomonadaceae*, diferenciándolas claramente de otros bacilos Gram negativos (tabla 13) y por pruebas metabólicas de especie se identificó a todas las cepas analizadas como *P. aeruginosa* (tabla 14).

**Tabla 13:** Pruebas bioquímicas claves para la identificación de la familia *Pseudomonadaceae*.

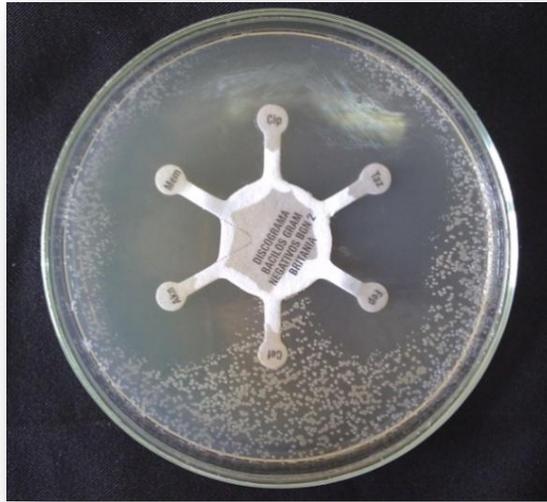
PRUEBAS METABOLICAS	RESULTADO
OXIDASA	+
OXIDACION DE LA GLUCOSA	+
INDOL	-
ROJO DE METILO	-
VOGES-PROSKAWER	-

**Tabla 14:** Pruebas bioquímicas identificatorias de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

PRUEBA METABOLICA	RESULTADO
DESARROLLO A 42°C	+
TOLERANCIA AL CETRIMIDE	+
CATALASA	+
HIDROLISIS DE LA GELATINA	+
REACCION DEL NITRATO	+
ALMIDON	-
PRODUCCION DE PIOCIANINA	+
PRODUCCION DE PIOVERDINA	VARIABLE
HIDRÓLISIS DE ARGININA	+

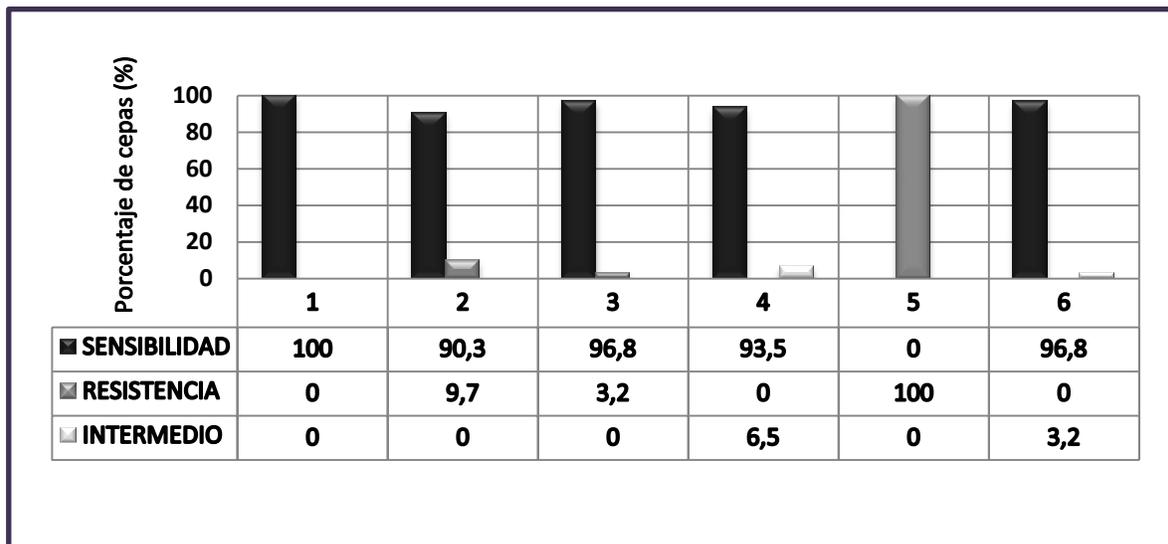
### 5.3 Sensibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se analizó el comportamiento de *P. aeruginosa* frente a antibióticos de uso clínico mediante la técnica de Bauer y col (1966) como se observa en la figura 6.



**Figura 6:** Resultado de la susceptibilidad a antibióticos de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la figura 7 se exponen los resultados del perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa*, el cual muestra un alto grado de susceptibilidad a los antimicrobianos estudiados. El 87.1% de las cepas fueron sensibles a la acción de 5 de los 6 antibióticos utilizados. El 100% de las cepas estudiadas fueron sensibles a la acción conjunta del betalactámico piperacilina y el inhibidor de la betalactamasa tazobactama. Porcentajes importantes de cepas sensibles se obtuvieron con los antibióticos cefepime y meropenem (96,8%) y con el aminoglucósido ampicilina (93,5%). Con respecto a la quinolona ciprofloxacina las cepas presentaron un 90.3% de sensibilidad. Frente a cefalotina se obtuvieron resultados diferentes: las cepas de *P. aeruginosa* manifestaron un 100% de resistencia.



**Figura 7.** Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ref.: 1: tazobactama/ piperacilina; 2: ciprofloxacina; 3: meropenem; 4: amicacina; 5: cefalotina y 6: cefepime.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos previamente por Murillo Llanes y col. (2009), los cuales aislaron *P. aeruginosa* a partir de diferentes muestras clínicas y determinaron el comportamiento frente a varios antibióticos obteniendo un 37,1% de sensibilidad frente a amicacina, 39,3% de sensibilidad frente a ciprofloxacina y coinciden parcialmente con los resultados de sensibilidad a piperacilina/tazobactama (80,4%) observados por los mismos autores.

Los resultados de este trabajo no coinciden con los obtenidos por Luján-Roca y col. (2008), los cuales estudiaron la sensibilidad a antibióticos de 144 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de orina y vías respiratorias, y obtuvieron valores de sensibilidad más bajos que los nuestros: cefepime: 47%, meropenem: 73%, amicacina: 48% y ciprofloxacina: 43%.

Se encontró relación con los datos obtenidos por Guerrero y col. (2003), los cuales encontraron un 90% de sensibilidad a ciprofloxacina y un 96,8% de sensibilidad a amicacina.

Mientras que los resultados del presente estudio coinciden con los logrados por Gamero Delgado y col. (2007) ya que la sensibilidad frente a los antibióticos analizados de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes intrahospitalarios fueron similares:

piperacilina/ tazobactama 91,2%, cefepime: 83,4%, meropenem: 92,8%, ampicilina: 83,3% y ciprofloxacina: 79,2%.

No se encontró coincidencias con los resultados de Ferrero y col. (2009), quienes analizaron 86 cepas de *P. aeruginosa* intrahospitalarias aisladas del Hospital Escuela "José de San Martín" de la provincia de Corrientes y obtuvieron valores inversos a los expuestos en este trabajo: resistencia de 92,8% de las cepas a ampicilina y 94,6% a ciprofloxacina, y sensibilidad de 16,1% a meropenem.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Hill y col. (2005), los cuales a partir de muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística realizaron el patrón de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas y obtuvieron un 25% de sensibilidad frente a cefepime y frente a meropenem, valores muy bajos en comparación con los obtenidos en este estudio; y obtuvieron 100% de resistencia frente a ampicilina y ciprofloxacina, por lo tanto son valores opuestos a los obtenidos aquí.

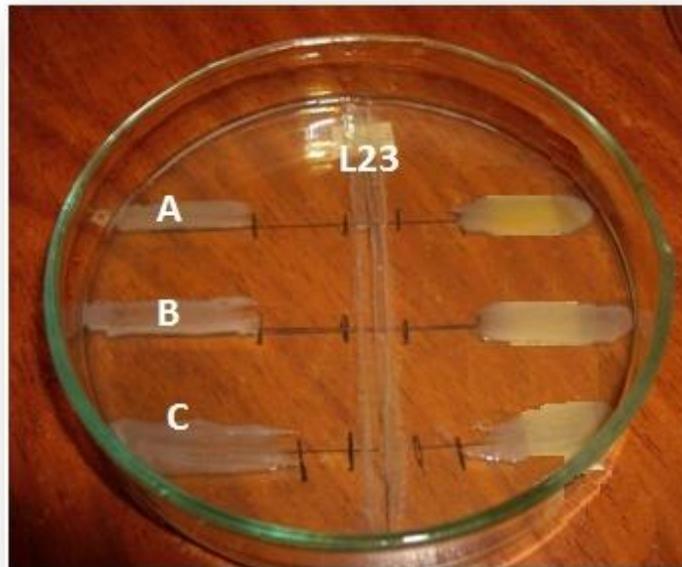
El comportamiento frente a ciprofloxacina coincide con los resultados obtenidos por Pérez Monraz y col. (2006), los cuales para este antibiótico encontraron un 94,6% de sensibilidad.

Si bien se considera a las cepas de *P. aeruginosa* como resistentes a muchos de los antibióticos utilizados comúnmente en clínica, las cepas estudiadas aquí parecen no mostrar ese comportamiento. Al igual que los estudios realizados por Gamero Delgado y col. (2007) y Guerrero y col. (2003), para estudiar correctamente la resistencia a antimicrobianos se debería realizar un análisis de la evolución de la resistencia en función del tiempo y observar la respuesta de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras biológicas frente a antimicrobianos utilizados comúnmente en la clínica, para conocer el mecanismo por el cual estas cepas presentan fluctuaciones en su resistencia.

#### **5.4 Detección de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.**

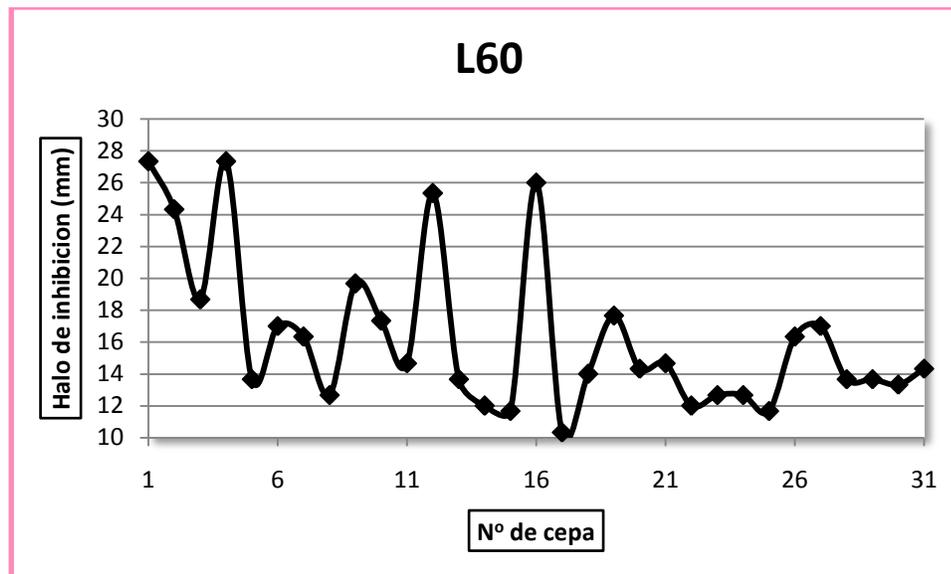
Mediante la técnica de estrías cruzadas efectuada a cepas de *P. aeruginosa* se valoró la actividad inhibitoria de los lactobacilos productores de las bacteriocinas L23 y L60 (figura 8). Para evaluar los resultados obtenidos se midieron en milímetros las zonas de inhibición. De las 31 cepas de *P. aeruginosa*, el 100% mostró halos de inhibición del crecimiento frente a los lactobacilos. Para el caso de *L. fermentum* L23, el rango de tamaño de halo estuvo entre 11,0 y 28,6 mm, con un promedio de  $19,0 \pm 5,0$  mm y para

*L. rhamnosus* L60 el rango estuvo entre 10,5 y 27,3 mm con un promedio de  $16,3 \pm 4,8$ mm. Los resultados se observan en las figuras 9 y 10.

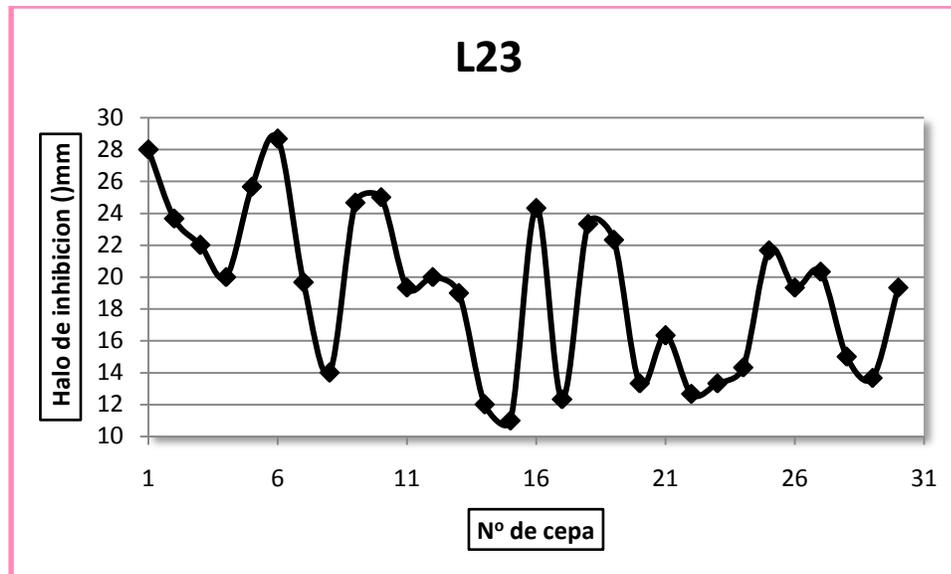


**Figura 8.** Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio MRS.

Ref.: A, B y C: cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.  
L23: *Lactobacillus fermentum* L23



**Figura 9.** Gráfico de dispersión donde se representan los valores de los halos de inhibición obtenidos por la técnica de estrías cruzadas entre *Lactobacillus rhamnosus* L60 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.



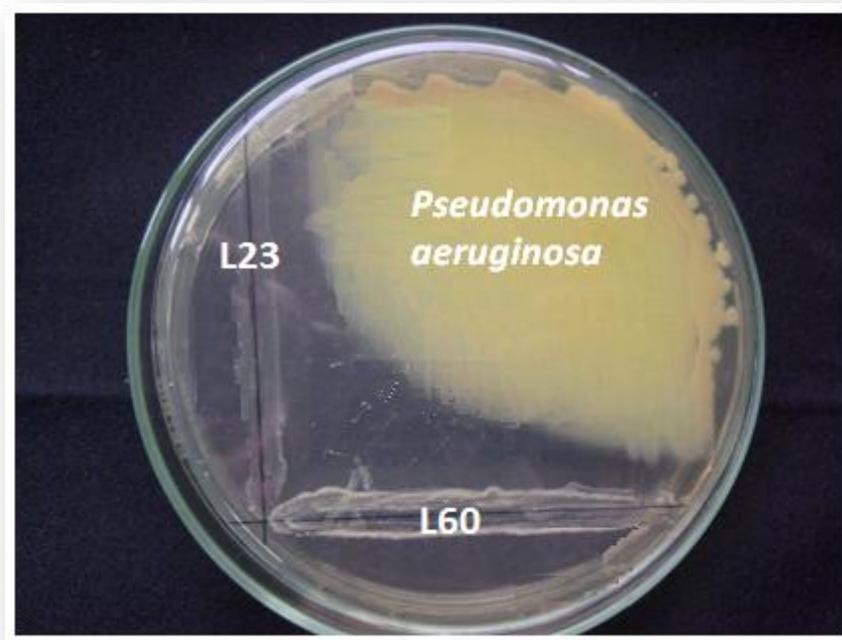
**Figura 10.** Gráfico de dispersión donde se representan los valores de los halos de inhibición obtenidos por la técnica de estrías cruzadas entre *Lactobacillus fermentum* L23 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizó el análisis estadístico One Way ANOVA el cual concluyó en que el tamaño de los halos de inhibición promedio producidos por la cepa *L. fermentum* L23 es estadísticamente mayor que el producido por la cepa *L. rhamnosus* L60 con un valor  $p < 0.01$ .

Los resultados de este estudio concuerdan con los publicados por Pascual y col. (2008<sub>a</sub>), los cuales obtuvieron por la técnica de pozos en agar un 100% de inhibición de microorganismos uropatógenos, incluidos *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* al enfrentarlos con *L. rhamnosus* L60. Estos resultados concuerdan con los publicados por Kullisaar y col. (2002), los cuales si bien estudiaron como microorganismo patógeno varias cepas de *Salmonella typhimurium*, encontraron por ésta técnica un 100% de inhibición utilizando dos cepas de *L. fermentum* aislados de la microbiota intestinal de niños sanos. Este grupo de investigación continuó sus estudios con una de las cepas, *L. fermentum* ME-3 a la cual por la misma técnica evaluaron el antagonismo contra *E. coli*, *S. entérica* y *Shigella sonnei* encontrando similares resultados a los obtenidos aquí (Hütt y col., 2006). Es de destacar que los hallazgos de este trabajo concuerdan con los de Kullisaar y col. (2002) y Hütt y col., (2006) en que las cepas de lactobacilos estudiadas son capaces de inhibir a microorganismos patógenos, siendo éstos diferentes en cuanto al tipo de infección que producen.

### 5.5 Ensayo de interacción entre *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se evaluó por la técnica de estrías perpendiculares la actividad inhibitoria conjunta de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 frente a cepas de *P. aeruginosa* (figura 11). Se obtuvo efecto sinérgico entre las dos cepas de lactobacilos y las 31 cepas de *P. aeruginosa* evaluadas, observándose que el halo de inhibición del crecimiento bacteriano en la zona de interacción entre ambos lactobacilos fue mayor que los de cada uno independientemente.

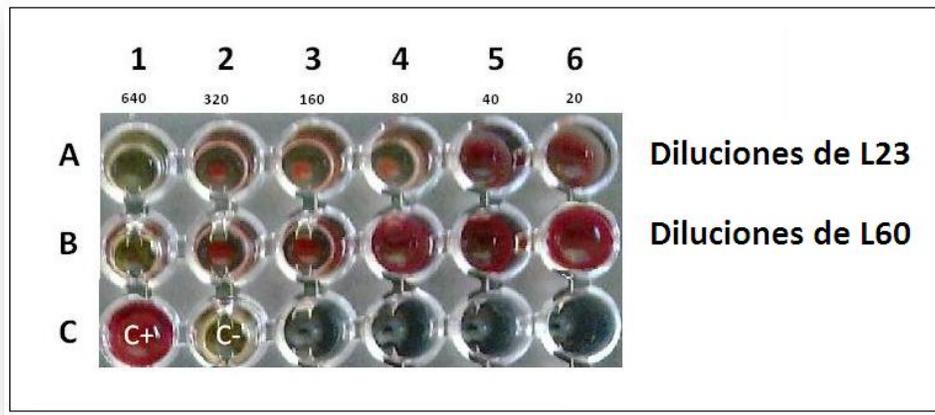


**Figura 11.** Ensayo de interacción entre *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 frente a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la búsqueda bibliográfica realizada no se encontraron trabajos con los que se pudieran discutir estos resultados. De allí la comparación con los resultados obtenidos por Ruíz y col. (2009). Estos autores mediante la misma técnica evaluaron la interacción entre las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 frente a diferentes microorganismos patógenos urogenitales como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. saprophyticus*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, entre otros y obtuvieron en términos generales un 68,6% de efecto sinérgico entre las bacteriocinas.

## 5.6 Concentración inhibitoria mínima (CIM).

Se determinó la concentración mínima de las bacteriocinas L23 y L60 necesarias para inhibir el crecimiento de las 5 cepas de *P. aeruginosa* (Figura 12).



**Figura 12:** CIM de las bacteriocinas L23 y L60 frente a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la figura 12 se observa que la máxima dilución de la bacteriocina L23 que inhibe el crecimiento microbiano corresponde al pozo A4, cuya actividad es de 80 UA/ml. La CIM de la bacteriocina L60 se observa en la fila 2 y corresponde a 160 UA/ml.

En la tabla 15 se observan los resultados en donde para el 60% de las cepas de *P. aeruginosa* la CIM de la bacteriocina L23 fue de 80 UA/ml y la CIM de L60 fue de 160 UA/ml.

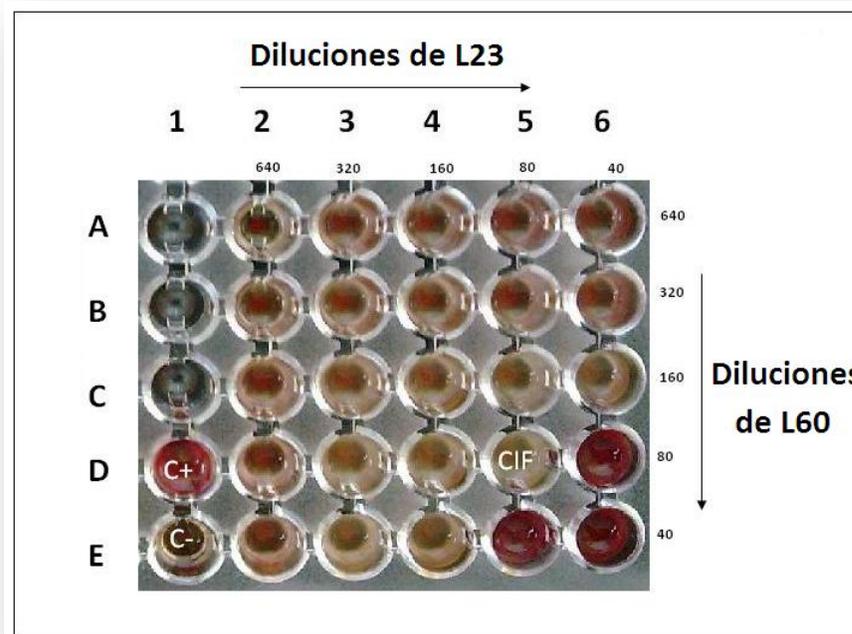
Mota-Meira y col. (2000) determinaron la CIM de la mutacina B-Ny266 producida por una cepa de *Streptococcus mutans* con el fin de comparar el efecto inhibitorio de esta bacteriocina con el obtenido con la nisina A y los antibióticos vancomicina y oxacilina frente a diferentes microorganismos patógenos. Obtuvieron un amplio espectro de actividad antimicrobiana de la bacteriocina mutacina B-Ny266 a valores bajos de CIM.

**Tabla 15.** Resultados de CIM de las bacteriocinas L23 y L60 frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	CIM L23 (UA/ml)	CIM L60 (UA/ml)
1	80	160
2	160	320
3	160	320
4	80	160
5	80	160

### 5.7 Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF).

Se realizó la técnica CIF para evaluar el resultado combinado de las bacteriocinas L23 y L60 frente a 5 cepas de *P. aeruginosa*. Por medio de esta prueba se obtiene un valor numérico denominado CIF el cual permite determinar si el efecto conjunto de las bacteriocinas es sinérgico ( $CIF < 0.5$ ), parcialmente sinérgico ( $0.51 < CIF < 0.99$ ), indiferente ( $1 < CIF < 1.99$ ) o antagónico ( $CIF > 2$ ). En la figura 13 se observa el resultado del estudio frente a una cepa de *P. aeruginosa*.



**Figura 13.** Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria de las bacteriocinas L23 y L60 frente a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la interacción conjunta entre bacteriocinas, se observa que la máxima dilución que impide el desarrollo de una cepa del microorganismo patógeno está en el pozo D5, en el cual las concentraciones de las bacteriocinas se determinan de la siguiente manera: cada pozo en la policubeta tiene un volumen final de 175µl (75µl de la bacteriocina L23, 75µl de la bacteriocina L60 y 25µl de inóculo). La dilución de la bacteriocina L23 que se sembró en el pozo D5 fue de 80UA/ml, por lo tanto la concentración en este volumen final es de 34,3UA/ml. Por lo mismo, la dilución utilizada de la bacteriocina L60 en D5 es de 80UA/ml, equivalente a una concentración de 34,3UA/ml. Con éstos datos más los obtenidos en la determinación de la CIM se reemplaza la siguiente fórmula; donde A es la bacteriocina L23, B es la bacteriocina L60 y AB hace referencia a la mezcla, obteniéndose así el valor de CIF:

$$\begin{aligned}
 \text{CIF} &= \frac{\text{CIM A en AB}}{\text{CIMA}} + \frac{\text{CIM B en AB}}{\text{CIM B}} \\
 &= \frac{34.3 \text{ UA/ml}}{80 \text{ UA/ml}} + \frac{34.3 \text{ UA/ml}}{160 \text{ UA/ml}} \\
 &= 0.64
 \end{aligned}$$

Dado que el valor obtenido en este ejemplo está comprendido entre 0,51 y 0,99, la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 frente a esta cepa de *P. aeruginosa* es parcialmente sinérgica.

De esta forma se procesaron los resultados de las 5 cepas evaluadas, apreciándose en todas ellas un efecto sinérgico o parcialmente sinérgico entre las bacteriocinas y *P. aeruginosa*. Los datos se observan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados de CIF entre las bacteriocinas L23 y L60 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	CIF	EFECTO
1	0,64	Sinergismo parcial
2	0,85	Sinergismo parcial
3	0,64	Sinergismo parcial
4	0,48	Sinergismo
5	0,45	Sinergismo

Esta técnica fue diseñada para evaluar el efecto entre antibióticos, por lo que no se encuentra disponible suficiente material bibliográfico que permita comparar el efecto combinado de dos bacteriocinas frente a *P. aeruginosa*.

MacLeod y col. (2009) analizaron el efecto sinérgico entre fosfomicina y tobramicina por esta técnica utilizando 17 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística hallando efecto sinérgico en sólo una de ellas, resultados que no coinciden con los obtenidos en este estudio debido a que la totalidad de las cepas ensayadas en el presente estudio presentó sinergismo.

En este estudio los hallazgos no coinciden con los resultados obtenidos por Visalli y col (1998), los cuales analizaron el efecto de varios antibióticos de uso clínico por esta técnica utilizando 124 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras biológicas y obtuvieron sólo un 20.2% de actividad sinérgica.

No se encontraron similitudes con los resultados del grupo de investigación conformado por Cappelletty y Rybak (1996), los cuales evaluaron el efecto conjunto de varios antibióticos utilizados en clínica frente a cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras patológicas y obtuvieron un 100% de indiferencia por esta técnica.

Es de destacar que los resultados de sinergismo hallados en este estudio con bacteriocinas son superiores a los descritos en la literatura utilizando antibióticos. Además, no se detectó con las bacteriocinas utilizadas en este trabajo interacciones de indiferencia.

Los resultados hallados en este trabajo son muy promisorios, alentadores y representan una nueva estrategia de prevención y tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos.

## 6 Conclusiones.

- 1) Todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron resistentes a cefalotina.
- 2) Todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudiadas fueron inhibidas por la bacteriocina L23.
- 3) El tamaño de halos de inhibición promedio de la bacteriocina L23 fue mayor que el de la bacteriocina L60.
- 4) La bacteriocina L60 inhibió a todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ensayadas.
- 5) Al estudiar las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 se detectó sinergismo sobre todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 6) No se detectaron interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 de tipo antagónicas e indiferentes sobre el microorganismo patógeno estudiado.
- 7) Las bacteriocinas L23 y L60 en aplicación conjunta podrían ser una excelente alternativa para el tratamiento de diferentes infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa*.
- 8) Las bacterias *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 podrían ser utilizadas como cepas probióticas urogenitales.

El efecto inhibitorio que mostraron las bacteriocinas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 cuando fueron ensayadas conjuntamente *in vitro* fue mayor que cuando se probaron individualmente. Resultados alentadores que sumados a los obtenidos en trabajos previos realizados por el grupo de investigación, hacen a la importancia de la utilización de ambas cepas de lactobacilos como probióticos para el tratamiento y prevención de infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

## 7 Anexo.

### I- Composición de los medios de cultivo utilizados.

#### Agar Rogosa (MRS)

COMPUESTO	CANTIDAD
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Glucosa	20g
Acetato de sodio	15g
Citrato de amonio	2g
Fosfato de potasio	6g
Sulfato de magnesio	0.575g
Sulfato de manganeso	0.12g
Sulfato ferroso	0.034g
Tween 80	1g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 5.5**

#### Agar tripticasa soya

COMPUESTO	CANTIDAD
Peptona-caseína	17g
Peptona-harina de soya	3g
D(+)-glucosa	2.5g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato dipotásico	2.5g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

## Caldo tripticasa soya

COMPUESTO	CANTIDAD
Peptona-caseína	17g
Peptona-harina de soya	3g
D(+)-glucosa	2.5g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato dipotásico	2.5g
Agua destilada	1000ml

## Medio Base para la fermentación de azúcares por *Lactobacillus* spp.

COMPUESTO	CANTIDAD
Púrpura de Bromocresol	0.08g
Polipeptona	10g
Extracto de levadura	5g
Fosfato dipotásico	2g
Acetato de sodio	5g
Sulfato de magnesio.7H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfato de magnesio.4H <sub>2</sub> O	0.05g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 5-5.5**

## Medio API 50 CHL

COMPUESTO	CANTIDAD
Polipeptona	10g
Extracto de levadura	5g
Tween 80	1ml
Fosfato dipotásico	2g
Acetato de sodio	5g
Citrato de amonio	2g
Sulfato de magnesio	0.2g
Sulfato de manganeso	0.05g
Purpura de bromocresol	0.17g
Agua desmineralizada	1000ml

### Medio KING A

COMPUESTO	CANTIDAD
Bacto peptona	20g
Glicerol	10ml
Cl <sub>2</sub> Mg (anh)	1.4ml
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (anh)	10g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 7.2**

### Medio KING B

COMPUESTO	CANTIDAD
Proteasa N <sup>0</sup> 3	20g
Glicerol	10ml
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	1.5g
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	1.5g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 7.2**

### Medio Clark- Lubs

COMPUESTO	CANTIDAD
Peptona	7g
Glucosa	5g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	5g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 6.9**

## Agar Cetrimide

COMPUESTO	CANTIDAD
Gelatina peptona	16g
Hidrolizado de caseína	10g
SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	10g
Cl <sub>2</sub> Mg	1.4g
Cetrimide	0.2g
Ac. nalidixico	0.015g
Agar N <sup>0</sup> 1	10g
Agua destilada	1000ml

**pH final: 7.1**

## II- Pruebas metabólicas para la identificación de microorganismos.

- Catalasa.

Mediante esta técnica se puede confirmar la presencia de la enzima catalasa la cual es capaz de desdoblar el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ . Para ello se colocó una colonia de la cepa a estudiar sobre un portaobjetos junto con una gota de  $H_2O_2$ . La reacción positiva se evidencia por el desprendimiento de burbujas de  $O_2$  al colocar el reactivo.

- Reducción de nitratos.

Permite evaluar la capacidad del microorganismo de reducir el nitrato a nitrito o a nitrógeno mediante la presencia de la enzima nitrato reductasa. Este proceso es típico del metabolismo anaeróbico, en el cual los microorganismos obtienen  $O_2$  del nitrato, que funciona como un aceptor de electrones. Para esta prueba se inoculó un caldo nitrato con los microorganismos a ensayar, se incubó 24 h en estufa a  $37^\circ C$  en microaerobiosis, y luego se reveló la prueba con el agregado de los reactivos alfa-naftilamina al 1%, ácido sulfanílico al 10% y ácido tartárico al 89%. Estos compuestos detectan la presencia de nitritos.

La interpretación se realiza por observación del cambio de color del tubo. Si aparece una coloración roja al cabo de 1 o 2 minutos de agregados los reactivos, es porque el microorganismo posee la enzima, y en el tubo hay acumulo de nitrito, por lo tanto la prueba es positiva. Si el tubo no presenta color rojo no hay nitratos en la suspensión y esto puede ser debido a que la reducción no ocurre (prueba negativa) o a que la reducción dio otro/s producto/s final/es (prueba positiva). Entonces, para confirmar la prueba, se agrega zinc en polvo, el cual reduce los nitratos a nitritos. Si ahora aparece color rojo, es porque el microorganismo no tiene la capacidad de reducir el nitrato ya que estaba intacto en la muestra y confirma una prueba negativa; si no aparece color rojo, es porque el nitrato fue reducido a un compuesto distinto a nitrito, como amoníaco, nitrógeno, óxido nítrico o nitroso y/o hidroxilamina, y es confirmatorio de una prueba positiva.

- Reacción del indol.

Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, piruvato y amoníaco. Para revelar la

reacción, a una suspensión bacteriana desarrollada durante 24 h en agua peptonada se le agrega el reactivo de Kovacs (p-dimetilamino benzaldheído, alcohol isoamílico y ácido clorhídrico) el cual detecta la presencia de indol. Si se desarrolla un halo color fucsia en la interface entre en el reactivo y el caldo, es una prueba positiva. La ausencia de halo indica prueba negativa y ausencia de la enzima.

Para realizar la prueba bioquímica identificatoria de *Lactobacillus* spp se realizó una modificación de la técnica ajustando el pH hasta 5.5 con HCl 1N.

- Hidrólisis de gelatina.

Por medio de esta técnica se detecta la presencia de la enzima gelatinasa, la cual licúa la gelatina. Para ello se inoculan 2 tubos con caldo y gelatina al 15%. A uno de ellos se lo incuba a 37°C y al otro se lo deja a temperatura ambiente. Al cabo de aproximadamente 24 h se colocaron ambos tubos a 4°C durante 30 min. Si el medio se encuentra solidificado, entonces la gelatina no fue licuada, indicando ausencia de la enzima y prueba negativa. Una prueba positiva se observa como un medio no solidificado. Para la identificación de lactobacilos se adapto la técnica utilizando caldo MRS con gelatina al 15% y se ajusto el pH a 5.5.

- Producción de SH<sub>2</sub>.

Evidencia la presencia de enzimas bacterianas que permiten la liberación de sulfuro a partir del tiosulfato de sodio. Para visualizar la reacción se utilizó hierro, el cual se acompleja con el sulfato dando un precipitado de color negro. Para esta prueba se sembró el medio comercial SIM (sulfato-indol-movilidad) modificando el pH a 5.5. Se interpreta como prueba positiva si aparece un precipitado negro, de lo contrario es negativa.

- Arginina dehidrolasa.

Permite detectar la enzima microbiana que es capaz de utilizar la arginina produciendo una amina, la cual da viraje de color en el medio de cultivo. Para ello, se inocularon 2 tubos, uno con arginina y otro control sin el aminoácido. Ambos se sellaron con una capa de vaselina estéril y se incubó durante 2 o 3 días, observándose diariamente. La alcalinización del medio da una coloración púrpura por viraje del indicador, y este

aumento de pH es debido a la descarboxilación de la arginina, lo que confirma una prueba positiva. La reacción negativa se observa como el testigo, de color amarillo.

- Gas glucosa.

Para realizar esta técnica se inocula un medio de cultivo con glucosa como fuente fermentable y se coloca la campana de Durham. Se incuba a 37°C por 24 h y se observa la producción de gas. La reacción es positiva si aparece una burbuja de aire dentro de la campana de Durham, de lo contrario es negativa.

- Desarrollo a 45°C.

Para evaluar la capacidad de desarrollo del microorganismo a esta temperatura se lo siembra en un tubo de hemólisis con caldo MRS y se incuba a 45°C durante 24 h. La presencia de turbidez en el tubo determina una prueba positiva, y se consideraron negativos aquellos tubos con caldo límpido.

- Fermentación del gluconato y ribosa.

Permite diferenciar microorganismos que fermentan éstos compuestos de otros que no lo hacen. Como resultado de la fermentación se producen ácidos los cuales modifican el pH dando viraje del indicador. Se utiliza un medio base al que se le agrega gluconato y ribosa, se siembran con el inóculo y se sellan con vaselina estéril. Después de 24-48 h de incubación a 37°C se interpretaron los resultados. Es positiva la cepa que presenta color amarillo, y negativa si se observa azul.

- Fermentación de hidratos de carbono.

Se prepara el medio de fermentación agregando al medio base el azúcar a evaluar al 1%. Se siembra cada uno de los tubos a ensayar con una ansada de caldo fresco microbiano y se coloca 0.2ml de vaselina estéril. Se incuba durante 24 h a 37°C y se observa el viraje del indicador púrpura de bromocresol. La utilización del azúcar se manifiesta como coloración amarilla.

- Prueba de la oxidasa.

Esta prueba permite detectar la enzima citocromo oxidasa, la cual se encuentra en microorganismos aerobios y en algunos aerobios facultativos como último eslabón de la cadena transportadora de electrones. Su presencia es indicio de utilización de oxígeno por la cepa como último aceptor. Generalmente la presencia de la oxidasa esta acompañada de la presencia de catalasa, ya que la reducción de oxígeno molecular puede producir peróxido de hidrógeno el cual es tóxico para la célula.

Para el ensayo se utilizan discos comerciales (Britania) que contienen oxalato de dimetil-para-fenilendiamina. En presencia de la enzima y oxígeno atmosférico, se oxida esta sustancia a un compuesto color rojo-fucsia. Se realiza una suspensión a partir de un cultivo fresco del microorganismo a ensayar en agua destilada y se le coloca un disco del reactivo que se deja a temperatura ambiente por 1 minutos. Al cabo de este tiempo aquellos tubos con coloración rojo-fucsia ya sean en el disco como en la suspensión se consideran positivos. Una reacción lenta, pasado los 2 min, debe considerarse negativa al igual que aquellos tubos sin cambio de coloración.

- OF-glucosa.

Esta técnica permite determinar si el comportamiento frente al azúcar es de tipo fermentativo u oxidativo. Para ello se prepararan 2 caldos base semisólidos con glucosa al 1% para cada microorganismo a ensayar. Se siembra con un cultivo fresco utilizando un ansa en punta y a uno de los tubos se lo sella con vaselina o la mezcla vaselina- parafina estéril. Se incuban durante 24 h a 37°C y se observa la utilización del sustrato como viraje del indicador azul de bromotimol desde un color azul inicial a amarillo. Si los dos tubos

aparecen amarillos indican que el microorganismo es capaz de fermentar y oxidar el azúcar, si el tubo abierto aparece amarillo y el cerrado con vaselina azul, entonces la cepa sólo utiliza oxidativamente el azúcar y si el tubo cerrado es el único que aparece amarillo, la cepa tiene un metabolismo estrictamente fermentativo.

- Rojo de metilo.

La técnica permite identificar microorganismos que fermentan los azúcares mediante la vía metabólica ácida mixta en la cual a partir de ácido pirúvico se produce gran cantidad de ácidos como para mantener el pH del medio por debajo de 4.4. Este valor de pH es el límite ácido de viraje del indicador rojo de metilo, por lo tanto a estos valores de pH el indicador vira a rojo.

Para realizar esta prueba se debe sembrar la cepa a estudiar en medio Clark y Lubs e incubar durante 24 h a 37°C en aerofilia. Luego de este tiempo se agregó al medio unas gotas de rojo de metilo. Se considera positiva a la cepa si aparece en el medio una coloración roja. Si el medio continúa siendo amarillo, entonces la cepa no posee esta vía fermentativa.

- Reacción de Voges-Proskauer.

Identifica la vía fermentativa butilenglicólica, en la cual los microorganismos que tienen el sistema enzimático necesario utilizan el ácido pirúvico con producción de acetilmetilcarbinol (acetoína) el cual es un producto neutro, junto con una baja cantidad de ácidos mixtos. En presencia de O<sub>2</sub> atmosférico y KOH al 40% la acetoína pasa a diacetilo que se convierte en un compuesto de coloración roja por acción del reactivo alfa-naftol.

Para la realización de la técnica se inocula un tubo que contiene medio Clark y Lubs y se incuba durante 24 h en aerobiosis a 37°C. Pasado este tiempo se agregan 2 gotas de alfa-naftol y 2 gotas de KOH. Se incuba en estufa a 37°C durante 30 min antes de leer los resultados.

Se considera positiva a la cepa que al cabo de este tiempo desarrolla coloración rosa en el tubo. Si no hay cambio de color, la cepa no posee esta vía metabólica.

- Crecimiento a 42°C.

Para esta técnica se inocula un caldo no selectivo como por ejemplo caldo tripteína soya con una ansada de un cultivo fresco de la cepa a testear y se incuba en baño de agua a 42°C durante 48 h. Se considera positiva a aquella cepa que presenta desarrollo en estas condiciones.

- Tolerancia al cetrimide.

Esta sustancia actúa a modo de detergente en las bacterias sensibles rompiendo la pared celular. Las bacterias que son resistentes a esta sustancia son *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. pútida* y desarrollan colonias en medios de cultivo agarizados que contengan este compuesto. Para la realización de esta técnica se siembran placas de agar cetrimide comercial a partir de un cultivo de 24 h de la cepa a estudiar y se incuba 24 h a 37°C en aerobiosis.

- Hidrólisis del almidón.

Para evidenciar la presencia de la enzima amilasa (degrada el almidón) se prepara el medio de cultivo que posee agar nutritivo y almidón al 1% y se inocula con la cepa a estudiar. Se incuba 24 h a 37°C en aerobiosis y luego se revela la placa mediante el agregado de yodo o lugol. Esta sustancia junto con el almidón forma un complejo de color azul oscuro. Entonces, si se observa un halo de transparencia es debido a la acción de la enzima y la consecuente ausencia de almidón y se considera una prueba positiva. Si la cepa no posee la enzima, la presencia de almidón en el medio se observa como un halo oscuro alrededor de la colonia.

- Producción de pigmentos.

Para esta técnica se realiza la siembra de las cepas en medios KING A y KING B, los cuales poseen cada uno determinada concentración y tipo de peptonas que son

insustituibles. Los medios de cultivo se inoculan con una ansada de cultivo fresco de la cepa a estudiar y se incuban: el medio KING A a 37°C en aerobiosis durante 48 h o más tiempo a temperatura ambiente y el medio KING B a 37°C en aerobiosis durante 24 h o 2 a 3 días a temperatura ambiente.

El medio KING A favorece (por su composición determinada) la mayor producción de piofianina, el cual es un pigmento de color azul, y se evidencia por la presencia de este color al cabo del tiempo de incubación. De la misma forma, el medio King B favorece la producción de pioverdina, de color verde. Estos pigmentos se observan mejor con luz ultravioleta.

## 8 Bibliografía.

- Andreu, A.; Planells, I. y Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. 2010. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicéntrico. Med. Clin. (Barc). 130:481-486.
- Backhed, F.; Ley, R.; Sonnenburg, J.; Peterson, D. y Gordon J. 2005. Host- bacterial mutualism in the human intestine. Science. 307: 1915-1920.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standatized single disc method. J. Clin. Pathol. 45:493-494.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994, 9<sup>th</sup> Edition. Ed. by Holt, John G, Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 91, 149, 532, 552.
- Borchert, D.; Sheridan, L.; Papatsoris, A.; Faruquz, Z.; Barua, J.; Junaid, I.; Pati, Y.; Chingewundohn, F. y Buchholz, N. 2008. Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: Review and research perspective. Indian. J. Urol. 24:134-144.
- Cappelletty, D. y Rybak, M. 1996. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents. Chemother. 40:677-683.
- Carr, F.; Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbiol. 28: 281-370.
- Cascales, E.; Buchanan, S.; Postle, K.; Duche, D.; Riley, M.; Slatin, S.; Lloubé's. S. y Cavard, D. 2007. Colicin biology. Am. Soc. for Microbiol. 71: 158-219.
- Castro, L. y de Rovetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica. Colomb. Med. 37:308-314.
- Collado Amores, M. C. 2004. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.
- Cribby, S.; Taylor, M. y Reid, G. 2008. Vaginal Microbiota and use of Probiotics. Hindawi Publish. Cor. Article ID256490:1-9.
- Czeructa, D., Piche, T. y Rampal, R. 2007. Review Article: yeast as probiotics- *Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther. 26:767-778.
- Cheigh C. y Pyun Y. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnol. Lett. 27:1641-1648.
- De Roos, N. y Katan, M. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. Am. J. Clin. Nutr. 71:405-411.

- Dobson, A.; Sanozky-Dawes, R. y Klaenhammer, T. 2007. Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. J. Appl. Microbiol. 103:1766–1778.
- Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L. y Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:564–582.
- Driscoll, J.; Brody, S. y Kollef, M. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs. 67:351-368.
- Dufour, A.; Hindre, T.; Haras, D. y Le Pennec, J. 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. FEMS Microbiol. Rev. 31:134–167.
- Estela, W.; Rylzoch, M; Melzoch, K.; Quillama, E. y Egoavil, E. 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Rev. Peru. Biol. 14: 271-275.
- Falagas, M.; Betsi, G. y Athanasiou, S. 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Infect. 13: 657–664.
- Ferrero, S.; Gomez Capará, L.; Reparaz, M. 2009. Vigilancia de los mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Nacional del Nordeste. [www.unne.edu.ar/investigación/com2009/CM-073.pdf](http://www.unne.edu.ar/investigación/com2009/CM-073.pdf) . Fecha de acceso: Julio de 2010.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of powdered milk and live lactic acid bacteria. Geneva, Switz: Foods and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report; 2001. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>. Fecha de acceso: Julio de 2010
- Forestier, C.; Guelon, D.; Cluytens, V.; Gillart, T.; Sirot, J. y De Champs, C. 2008. Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. Crit. Care. 12:1-10.
- Foxman, B. 2002. Epidemiology of urinary tract infection: incidence, morbidity and economic cost. Dis Mon. 49:53-70.
- Foxman, B.; Barlow, R. y D'Arcy, H. 2000. Candida Vaginitis: self-reported incidence and associated cost. Sex transm Dis. 27:230-235.
- Gamero Delgado, M.; García-Mayorgas, A.; Rodríguez, F.; Ibarra, A. y Casal, M. 2007. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. Rev. Esp .Quimioterap. 20:230-233.
- Garneau, S.; Martin, N. y Vederas J. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84:577–592.

- Garritty, G.; Brenner, D.; Krieg, N. y Staley, J. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. [http://bergeys.org/outlines/Bergeys\\_Vol\\_3\\_Outline.pdf](http://bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf).2005. fecha de acceso: Julio de 2010.
- Gillor, O; Etzion, A. y Riley, M.A. 2008a. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81:591–606.
- Gillor, O.; Vriezen, J. y Riley, M. 2008b. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. Microbiol. 154:1783-1792
- Guerrero, C.; Cesteros, R.; Miranda, A.; Menasalvas, A.; Blazquez, R. y Segovia, M. 2003. Sensibilidad a antimicrobianos de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Murcia. Rev. Esp. Quimioterap. 16: 444-446.
- Hamilton-Miller J. 1997. Living in the 'post-antibiotic era': could the use of probiotics be an effective strategy? Clin. Microbiol. Infect. 3:2–3.
- Han, K.; Kim, Y.; Kim, S. y Oh, S. 2007. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. J. Microbiol. Biotechnol. 17:774–783.
- Hatakka, K.; Savilahti, E.; Pönkä, A.; Meurman, J.; Poussa, T.; Näse, L.; Saxelin, M. y Ko, R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: Double blind, randomised trial. Br. Med. J. 322: 1327-1329.
- Hechard, Y y Sahl, H. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie. 84:545–557.
- Heng, N.; Wescombe, P.; Burton, J.; Jack, R. y Tagg, J. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. Springer. p. 45-92.
- Hill, D.; Rose, B.; Pajkos, A.; Robinson, M.; Bye, P.; Bell, S.; Elkins, M.; Thompson, B.; MacLeod, C.; Aaron, S. y Harbourd, C. 2005. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. Am. Soc. of Microbiol. 42:5085-5090.
- Hütt, P.; Shchepetova, J.; Livukene, K. y Mikelsaar, M. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens. J. Appl. Microbiol. 100:1324–1332.
- Hyman, W.; Fukushima, M.; Diamond, L.; Kumm, J.; Giudice, L. y David, R. 2005. Microbes on the human epithelium. PNAS. 102:7952-7957.
- Jangho, H.; Annsung, H.; Deokkim, M. y Whakim, C. 2008 Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*. Process. Biochem. 43:225-228.
- Jiménez, E.; Delgado, S.; Arroyo, R.; Fernández, L. y Rodríguez, J. 2009. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado. Acta Pediatr. Esp. 67:125-132.
- Johnson, H.; Gordonpour, M.; Tompkins, T. y Sherman, P. 2007. Surface-layer protein extract from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157H7 adhesion to epithelial cell. Cell. Microbiol. 9:356-367.

- Kalliomaki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P. y Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 357: 1076-1079.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. y Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1589-1597.
- Krogstad, D. y Moellering, J. 1980. Combinations of antibiotics, mechanisms of interactions against bacteria. *Antib. in Labor. Med.* Ed. Lorian. V. 5º ed. Balltimore Williams & Wilkins.
- Kullisaar, T.; Zilmer, M.; Vihalemm, T.; Annuk, H.; Kairane, C. y Kilk, A. 2002. Two antioxidative *Lactobacillus* strains as promising probiotics. *J. of Food. Microbiol.* 72:215 – 224.
- Le Nicolle y AMMI Canada Guidelines Committee. 2005. Complicated urinary tract infection in adults. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 16:349-360.
- Lebeer, S; Vanderleyden, J; Keersmaecker, S. 2008. Genes and molecules of Lactobacilli supporting Probiotics action. *Am. Soc. for Microbiol.* 72:728-764.
- Luján-Roca, D.; Ibarra-Trujillo, J. y Mamani-Huamán, E. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. *Rev. Biomed.* 19:156-160.
- Mack, D.; Ahrne, S.; Hyde, L.; Wei, S. y Halingsworth. 2003. Extracellular MUC3 mucine secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut.* 52:827-833.
- Mackie, R.; Sghir, I. y Gaskins, H. 1999. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S-1045S.
- MacLeod, D.; Barker, L.; Sutherland, J.; Moss, S.; Gurgel, J.; Kenney, T.; Burns, J. y Baker, W. 2009. Antibacterial activities of a fosfomicin/tobramycin combination: a novel inhaled antibiotic for bronchiectasis. *J. of Antim. Chem.* 64:829–836.
- Madigan, M.T; Martinko, J y Parker, J. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. Octava edición. Prentice Hall.
- Makarova, K.; Slesarev, A.; Sorokin, A; Wolf, Y; Mirkin, B.; Pavlov, A; Koonin, E. ; Pavlova, N; Karamuchev, V. y col. 2006. Comparative genomics of the lactic acid Bacteria. *PNAS.* 103:15611-15616.
- Makarova, K; Koonin, E. 2007. Evolutionary Genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 189:1199-1208.
- Martin, F.; Wang, Y.; Sprenger, N.; Yap, Lundstedt, T.; Lek, P.; Rezzi, S.; Ramadan, Z.; van Bladeren, P.; Fay, L.; Kochhar, S.; Lindon, J.; Holmes, E. y Nicholson, J. 2008. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 4: 157.

- Martin, N.; Sprules, T.; Carpenter, M.; Cotter, P.; Hill, C. Ross, R. y Vederas, J. 2004. Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochem. (Mosc)*. 43:3049–3056.
- Martin, R.; Soberón, N.; Vázquez, F. y Suárez, J. 2008. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 26(3):160-7.
- Martínez, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su Resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral. [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/\\_params/id/32122681.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/_params/id/32122681.html). fecha de acceso: Julio de 2010
- Meurman, J.H. y Stamatova, I. 2007. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis*. 13: 443-451.
- Miller, N. y Wettwrstrom, W.2000. The Cambridge world history of foods. Eds Kiple K, Ornelas K. (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK). 1123-1139.
- Monroy Dosta, M.; Castro Barrera, T.; Fernández Perrino, F. y Mayorga Reyes, L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*. 73:63-72.
- Morency, H.; Mota-Meira, M.; LaPointe, G.; Lacroix, C. y Lavoie, M. 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can. J. Microbiol*. 47:322–331.
- Mota-Meira, M.; Le Lapointe, G.; Lacroix, C. y Lavoie, M. 2000. MICs of Mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antim. Ag. and Chemoth.*, 44:24–29.
- Muñoz- Rojas, J. 2003. Bacteriocinas: Una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_03/Capitulo03.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf). Fecha de acceso: Julio de 2010.
- Murillo-Llanes, J; Sosa-Quintera, LS y Lopez-Castro Garamond, M. 2009. Patrón de Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital General de Culiacán. *Soc. Méd.del Hosp. de Cul. “Dr. Bernardo J. Gastélum”*. 3:6-11. [www.hgculiacan.com](http://www.hgculiacan.com) .
- Nagao, J.; Asaduzzaman, S.; Aso, Y.; Okuda, K.; Nakayama, J. y Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng*. 102:139-149.
- Nes, I.; Diep, D.; Havarstein, L.; Brurberg, M.; Eijsink, V. y Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 70:113–128.

- Normas CLSI-NCCLS. 2005. Tabla de interpretación de los resultados, método de difusión en agar. <http://www.brizuela-lab.com.ar/tablan.htm>. Fecha de acceso: Julio de 2010.
- Oppegård, C.; Rogne, P.; Emanuelsen, L.; Kristiansen, P.; Fimland, G.; Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210– 219.
- Oxman, T.; Shapira, M.; Klein, R.; Avazov, N. y Rabinowitz, B. 2001. Oral administration of *Lactobacillus* induces cardioprotection. *J. Altern. Complement. Med.* 7:345-354.
- Pascual, L; Daniele, M; Ruíz, F; Giordano, W; Pajaro, C y Barberis, L. 2008a. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potencial probiotic isolated from the human vagina. *Rev. J. of gen. and Appl. Microbiol.* 54:141-148.
- Pascual, L.; Daniele, M.; Ruíz, F.; Giordano, W.; Pajaro, C y Barberis, L. 2008b. Purification and partial characterization of Novel Bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr. Microbiol.* 56:397-402.
- Pérez Monraz, M.; Almodovar, M.; Hernandez, J. y Hernandez, A. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. *Rev. Cubana Med. Trop.* 58:0375-0760.
- Picard, C.; Fioramonti, J.; Francois, A.; Robinson, T. Neant, F. y Matuchansky, C. 2005. Review Article: *Bifidobacteria* as probiotic agent-physiological effect and clinical benefit. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22:495-512.
- Reid, G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infections. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:437S-443S.
- Reid, G y Bruce A. 2003. Urogenital infections in women: can probiotics help? *Posgrad. Med. J.* 79:428-432.
- Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M. y McCormick, J. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658-672.
- Reid, G y Hammond, J. 2005. Probiotics. *CME.* 51: 1487-1493.
- Riley, M. y Wertz, J. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* 84:357–364.
- Riley MA y Wertz JE. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117–137.
- Riverón, F.; Hernández, J.; Ponce Martínez, L. y Machado Betarte, C. 2003. Resistencia bacteriana. *Rev. Cubana. Med. Milit.* 32:44-8.
- Rook, G. y Brunet, L. 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut.* 54:317320.
- Ruíz, F.; Gerbaldo, G.; Asurmendi, P.; Pascual, L.; Giordano, W. y Barberis, L. 2009. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic

interactions between *Lactobacillus* strains. Curr. Microbiol. DOI 10.1007/s00284-009-9465-0.

- Sánchez Ruiz, J. 2008. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococos aislados de Ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Santos, F.; Vander Heijden, R.; Valdéz, G.; Devoz, W.; Sesma, F. y Hugenholtz, J. 2008. The complete coenzima B12 biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. Microbiol. 154:81-93.
- Sartor, R.B. 2003. Targering enteric bacteria in treatment of inflammatory bowel diseases: why, how, and when. Cur. Opin. Gastroenterol. 19: 358-364.
- Savadogo, A.; Ouattara, C.; Bassole, I. y Traore, S. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. Af. J. Biotechnol. 5: 678-683.
- Seija, V.; Frantchez, V.; Pintos, M.; Bataglino, M.; Torales, M.; Díaz, A. y Dufrechou, C. 2010. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. Rev. Med. Urug. 26: 14-24.
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS. Microbiol. Rev. 28: 405–440.
- Tabibian, J.; Gornbein, J.; Heidari, A.; Dien, S.; Lau, V.; Chahal, .P y Churchill, B. 2008. Uropathogens and host characteristics. J. clin. Microbiol. 46: 3980-3986.
- Todar, K. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's online textbook of bacteriology. [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net). Fecha de acceso: Julio de 2010.
- Twomey, D.; Ross, R.; Ryan, M; Meaney, B. y Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 165–185.
- Vásquez, S.; Suarez, H. y Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas para la conservación de la carne. Rev. chil. nutr. 36: 64-71.
- Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; Vandekinderen, I. y Debevere, J. 2006. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. Food Microbiol. 23: 511–518.
- Visalli, M.; Jacobs, M. y Appelbaum, P. 1998. Determination of activities of levofloxacin, alone and combined with gentamicin, ceftazidime, cefpirome, and meropenem, against 124 strains of *Pseudomonas aeruginosa* by checkerboard and time-kill methodology. Antimicrob. Agents and Chemother. 42:953–955.

- White, R.; Burgess, D.; Manduru, M. y Bosso, J. 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-Kill, Checkerboard and E-test. *Am. Soc. of Microbiol.* 40: 1914-1918.
- Zhou, X; Brown, C.J.; Abdo, Davis, C.C.; Hansmann, M.A.; Joyce, P.; Foster, J.A. y Forney, L.J. 2007. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy caucasian and black women. *ISME J.* 1: 121-133.