



Estudio de la inhibición de cepas de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus* spp. con actividad antimicrobiana

TRABAJO FINAL DE GRADO



Rafael H. Quadrelli
Directora: Dra. Liliana Pascual
Codirectora: Dra. Lucila Barberis

17 de octubre de 2013

Río Cuarto, Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO FACULTAD
DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y
NATURALES DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E
INMUNOLOGIA

Trabajo final de Microbiología

**Estudio de la inhibición de cepas de *Staphylococcus aureus* por
Lactobacillus spp. con actividad antimicrobiana**

Autor: QUADRELLI, Rafael Hugo

Director: Dra. PASCUAL, Liliana

Codirector: Dra. BARBERIS, Lucila

Tribunal evaluador:

Dra. PASCUAL, Liliana

Dra. MAGNOLI, Carina

Dra. RODRÍGUEZ, Noemí

17 de octubre de 2013

Río Cuarto, Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNRC por brindarme todo lo necesario para poder cursar la carrera. Gracias a todos los profesores de la carrera de Microbiología por sus enseñanzas y su paciencia.

A todos los integrantes de la cátedra de Bacteriología por darme un lugar en el laboratorio, en especial a las Dras. Barberis y Pascual.

A mis amigos de toda la vida, Juan, Damián, José, César, Manuel, Hernán, Julián y Diego por estar siempre.

A los Sres. Sosa, Frola, López, Bueno y Rojo por haber sido parte estructural de este proceso y de mis últimos años de facultad.

A mi familia, a mi Madre y a mis Hermanos, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mi Padre...

INDICE

	Página
Resumen	3
1 Introducción	5
1.1 Bacterias ácido lácticas, características	5
1.2 Genero <i>Lactobacillus</i>	5
1.2.1 Características generales	5
1.2.2 Nicho ecológico	6
1.2.3 Sustancias antimicrobianas producidas por los lactobacilos	7
1.2.4 Las bacteriocinas, generalidades y clasificación	8
1.2.5 Modo de acción	9
1.2.6 Microbiota vaginal, acción protectora de <i>Lactobacillus</i>	10
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3.1 Factores de virulencia	13
1.3.2 Epidemiología de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.3.3 Resistencia antimicrobiana	17
2 Hipótesis	19
3 Objetivos	20
4 Materiales y métodos	21
4.1 Cepas utilizadas	21
4.2 Pruebas de familia <i>Staphylococcaceae</i>	22
4.3 Pruebas de genero	22
4.4 Pruebas de especie	23
4.5 Ensayo de actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre <i>S. aureus</i>	24
4.6 Análisis estadístico	25
5 Resultados y discusión	26
6 Conclusiones	35
6.1 Conclusión general	36
7 Bibliografía	37
8 Anexo estadístico	44

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1: Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	26
Tabla 2: Porcentajes y halos de inhibición del crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> por el empleo de lactobacilos no productores de H ₂ O ₂	28
Tabla 3: Porcentajes y halos de inhibición del crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> por el empleo de lactobacilos productores de H ₂ O ₂ .	29
Tabla 4: Halos promedio de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> por lactobacilos productores y no productores de H ₂ O ₂ .	32
Figura 1: Fotografía tinción de Gram (100x). B: microfotografía de barrido de <i>Staphylococcus aureus</i> (450x). Fuente: (http://phil.cdc.gov).	12
Figura 2: Esquema de siembra en placa de Petri utilizando la técnica de estrías cruzadas. Referencias: A: cepa de <i>Lactobacillus spp.</i> ; 1, 2, 3 y 4: cepas de <i>S. aureus</i> .	25
Figura 3: Promedio de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de cada grupo de lactobacilos productor y no productor de H ₂ O ₂ frente a <i>S. aureus</i> . Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05)	30
Figura 4: Comparación de la media de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del grupo de lactobacilos no productores de peróxido de hidrogeno. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05)	31
Figura 5: Comparación de la media de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del grupo de lactobacilos productores de peróxido de hidrogeno. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05)	31
Figura 6: Halos de inhibición promedio de las cepas de lactobacilos no productoras de H ₂ O ₂ frente a cada cepa de <i>S. aureus</i> .	33

Figura 7: Halos de inhibición promedio de las cepas de lactobacilos productoras de H₂O₂ frente a cada cepa de *S. aureus* 34

Resumen

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo formado por diferentes géneros bacterianos, entre ellos, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, y *Lactobacillus*. Algunas BAL, tales como las del género *Lactobacillus*, son capaces de sintetizar sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano como por ejemplo, diacetilo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂); biosurfactantes y bacteriocinas. Además, estas bacterias liberan ácido láctico al medio y disminuyen el pH hasta valores menores de 4,0 inhibiendo el crecimiento de bacterias competidoras. Los lactobacilos conforman en gran proporción la microbiota vaginal de mujeres sanas y en edad fértil, y desempeñan un rol clave en la protección y prevención de infecciones urogenitales provocadas por bacterias de diversos géneros, tales como, *Streptococcus*, Enterobacterias y *Staphylococcus*, entre otros. El efecto protector que los lactobacilos producen en la vagina se basa en dos mecanismos, la adherencia específica y colonización de *Lactobacillus* en el epitelio vaginal, formando biopelículas o “*biofilm*” y la producción de metabolitos activos. Esta actividad antagonista es un factor importante en la protección contra varias infecciones provocadas frecuentemente por *Staphylococcus aureus*. Las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*, son de gran importancia médica ya que son los patógenos que causan las principales infecciones nosocomiales. En la última década, las infecciones causadas por *S. aureus* han reemergido debido principalmente a que esta bacteria ha adquirido resistencia a los antibióticos que usualmente se emplean para su tratamiento. Por esta razón, es de suma importancia el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento basadas en la utilización de bacterias probióticas capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos. En el presente trabajo se estudió la capacidad de inhibición de diferentes cepas de *Lactobacillus* sobre cepas de *S. aureus*. Se utilizaron 10 cepas de lactobacilos vaginales productoras de bacteriocinas, 5 de ellas además productoras de H₂O₂: *L. acidophilus* (L24); *L. casei* sub *sp. rhamnosus* (L28); *L. rhamnosus* (L60); *L. paracasei* sub. *sp. paracasei* (L74) y *L. rhamnosus* (L160) y 5 cepas no productoras de H₂O₂: *L. fermentum* (L23); *L. fermentum* (L25); *L. paracasei* sub *sp. paracasei* (L47), *L. rhamnosus* (L56) y (L73)

las cuales fueron ensayadas sobre 30 cepas de *S. aureus* previamente aisladas del tracto urogenital de mujeres con síntomas y signos de enfermedad vulvovaginal. Los resultados encontrados en los ensayos de actividad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. sobre *S. aureus*, muestran que en el grupo de los lactobacilos no productores de H₂O₂, las cepas L23 y L47, fueron las que exhibieron los mayores porcentajes de inhibición en el crecimiento de las cepas de *S. aureus*, siendo significativamente superiores en comparación al resto de las cepas ensayadas, con valores del 100 y 96,6 %, respectivamente ($p < 0,05$). A diferencia de las cepas de lactobacilos no productoras de H₂O₂, la mayoría de las cepas productoras de este agente oxidante mostraron mayor capacidad inhibitoria. La mayoría de las cepas de lactobacilos analizadas inhibieron el crecimiento de la totalidad de las cepas patógenas. Las cepas L60 y L74, fueron las que presentaron la mayor capacidad antimicrobiana, siendo significativamente más eficientes ya sea en comparación con las cepas del mismo grupo como así también comparándolas entre las otras cepas de lactobacilos no productoras de peróxido. De esta manera, los resultados encontrados ponen en evidencia que los lactobacilos productores de H₂O₂ presentaron una actividad antimicrobiana más eficiente sobre cepas de *S. aureus* y constituirían una adecuada herramienta para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por patógenos del género *Staphylococcus*



1. Introducción

1.1. Bacterias ácido lácticas, características

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo de bacterias formado por diferentes géneros bacterianos pertenecientes al phylum Firmicutes. Entre los principales géneros que componen este grupo podemos citar: *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Aerococcus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Tetragenococcus spp.*, *Vagococcus spp.*, y *Weisella spp.* (Parras Huertas, 2010). Las BAL se caracterizan porque pueden adoptar la forma de bacilos largos o cortos, también cocos, produciendo, al dividirse, cadenas o tétradas. Estas bacterias generalmente son inmóviles y presentan escaso crecimiento en medios comunes (Bergey, 2009). Los carbohidratos son indispensables para su crecimiento y mediante la fermentación sintetizan diversos subproductos tales como ácido láctico, otros ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono (CO₂) (Koneman, 2006). Además, durante el metabolismo, algunas BAL, tales como las especies del género *Lactobacillus*, sintetizan sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano, tales como diacetilo, peróxido de hidrógeno (Balkus y col., 2012); biosurfactantes (Pérez-Leonard, 2007) y bacteriocinas (Pascual y col., 2008a, b; 2010).

1.2. Genero *Lactobacillus*

1.2.1. Características generales

Los lactobacilos pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*, crecen adecuadamente en medios ácidos, con pH inicial de 4,5 a 6,4 y con un pH óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Estas bacterias durante el desarrollo liberan ácido láctico al medio y disminuyen el pH hasta valores menores de 4,0 (Bergey, 2009).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o



anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO_2 (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo; 2000). La mayor parte son mesófilos (30 - 40°C), pudiendo crecer hasta una temperatura límite de 40°C (Bergey, 2009).

Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas como la superóxido dismutasa ni tampoco la catalasa (Bergey, 2009). Los miembros de este género metabolizan la glucosa, hexosas aldehídicas y alcoholes polihidroxicos, produciendo mediante homofermentación, ácido láctico. Los que producen metabolismo heterofermentativo sintetizan ácido láctico y otros productos finales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico. De esta manera, el ácido láctico constituye un 50% de los productos finales, el cual usualmente no es fermentado (Parras Huertas, 2010).

Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, donde por fermentación homoláctica, 1 mol de hexosa se convierte en 2 moles de ácido láctico y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO_2 , 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, a través de la fermentación heteroláctica. En cuanto a la producción de enzimas, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfoacetilasas, pero no fructosa di fosfato aldolasas (FDP aldolasas), mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfoacetilasas (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000).

1.2.2. Nicho ecológico

Los miembros del género *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas, que habitan regularmente en boca, tracto intestinal, tracto genital de humanos y animales (Srinivasan y Fredricks, 2008; Strus y col., 2012).

Una de las principales funciones es la de mantener bajo el número de bacterias patógenas presentes en el medio. Este efecto se logra debido a la acidificación del medio, principalmente por la producción de ácido láctico como metabolito primario, el cual con su aporte de protones al medio produce



desestabilización de las cargas a nivel de la membrana de las bacterias patógenas, trayendo como consecuencia la muerte celular. Sumado a esto, la producción de metabolitos secundarios tales como biosurfactantes, H_2O_2 y bacteriocinas, capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (Parras Huertas, 2010).

1.2.3 Sustancias antimicrobianas producidas por los lactobacilos

Los biosurfactantes son un grupo estructuralmente diverso de moléculas tensoactivas que presentan en general menos toxicidad y baja biodegradabilidad que los biosurfactantes sintéticos. Estos compuestos han logrado contrarrestar la adhesión y la formación de biofilm de microorganismos patógenos. Pueden interactuar con los ácidos grasos constituyentes de la membrana de los microorganismos patógenos, desencadenando importantes perturbaciones estructurales (Ortiz y col., 2011).

El H_2O_2 , precursor de especies reactivas del oxígeno que alteran la membrana celular, trae efectos nocivos sobre las funciones metabólicas normales de la célula bacteriana. El exceso de H_2O_2 puede inhibir o matar a otros microorganismos, principalmente a los grupos que carecen o tienen baja producción de peroxidasas. El efecto bactericida del H_2O_2 está determinado por su capacidad oxidante y la generación de metabolitos altamente reactivos como el radical hidroxilo OH^\cdot , capaz de dañar la integridad del ADN. Dicho efecto se potencia por la mieloperoxidasa y los radicales haluro, como el Cl^\cdot , los cuales son abundantes en las secreciones biológicas y cuya elevada concentración en el mucus uterino es especialmente alta durante la ovulación (Martínez y De Martinis, 2005; Martín y col., 2008). En este contexto, se ha encontrado que determinadas especies de lactobacilos productoras de H_2O_2 inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, entre ellos, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivia* y *Escherichia coli*. Más aún, se ha demostrado que la colonización vaginal con lactobacilos productores de H_2O_2 estaría asociada con una disminución en la aparición de la vaginosis bacteriana (Mastromarino y col., 2013).



1.2.4. Las bacteriocinas, generalidades y clasificación

Entre la variedad de sustancias con actividad inhibitoria producidas por el género *Lactobacillus* se encuentran las bacteriocinas, sustancias antimicrobianas que presentan un núcleo proteico, producidas por diversas especies de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, cuyos efectos son la formación de poros en la membrana (Gordon y col., 2007). De peso molecular y propiedades bioquímicas variables y son capaces de inhibir un amplio rango de microorganismos incluyendo especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y Enterobacterias (Parras Huertas, 2010).

Las bacteriocinas son proteínas o polipéptidos precursores que, en su forma activa, ejercen un efecto antibacterial contra bacterias estrechamente relacionadas y no relacionadas filogenéticamente (Guillor y col., 2008). Son de síntesis ribosomal, aunque algunas de ellas requieren de modificaciones postraduccionales para adquirir actividad. El gen estructural de la bacteriocina, lo mismo que los genes que codifican para la proteína implicada en el procesamiento y transporte de la misma, a menudo se encuentran en un plásmido o en un transposón y también los genes que codifican para su autoinmunidad protegiendo al microorganismo productor de su propia bacteriocina (Kjos y col., 2010). Dentro de las bacteriocinas se incluyen una diversidad de proteínas que en términos de tamaño, célula blanco, modo de acción y relación filogenética fueron divididas en dos grandes grupos: las producidas por bacterias Gram positivas y las producidas por bacterias Gram negativas (Gordon y col., 2007; Heng y col., 2007)

La producción de bacteriocinas en bacterias Gram-positivas está generalmente asociada al cambio en la fase de la curva de crecimiento del microorganismo. Este fenómeno se produce en el cambio de la fase logarítmica a la fase estacionaria (van Belkum y col., 2011). Las bacteriocinas de este grupo bacteriano poseen actividad antimicrobiana más diversa respecto a las producidas por las Gram negativas (Heng y col., 2007).

Las bacteriocinas producidas por las BAL han sido clasificadas en cuatro clases: La clase I, comprendida por las bacteriocinas modificadas



postraduccionalmente o también llamadas Lantibióticos, las cuales están subdivididas en tres grupos, entre ellas, las de tipo A, B y las que poseen dos componentes estructurales (Wiedemann y col., 2006). La clase II incluye las bacteriocinas termoestables y mínimamente modificadas IIa, IIb y IIc (Eijsnik y col., 2002; Drider y col., 2006). En cuanto a las de clase III, incluye una gran variedad de bacteriocinas termolábiles de gran tamaño molecular. Estas también se subdividen en dos subgrupos: IIIa y IIIb. Por último, las de clase IV, comprenden a bacteriocinas complejas que poseen en su estructura lípidos y carbohidratos indispensables para su actividad inhibitoria, las que adoptan una configuración cíclica, unidas por sus extremos carboxilo y amino terminal mediante un péptido unido covalentemente (Heng y col., 2007; van Belkum y col., 2011).

1.2.5. Modo de acción

El modo de acción de las bacteriocinas varía dependiendo de la clase a la cual pertenecen, por ejemplo, las de clase I subtipo A ejercen su acción contra la célula blanco, produciendo una despolarización de la membrana celular, debido a que ella misma es una proteína de carga positiva. Esta despolarización produce poros, permitiendo la liberación de los metabolitos celulares más pequeños (Nagao y col., 2006). Las pertenecientes a la clase I, subtipo B, interfieren en las reacciones enzimáticas involucradas en la formación de la pared celular de la célula blanco (Wiedemann y col., 2006). Las pertenecientes al último subgrupo de la clase I, basan su principio inhibitorio en una combinación de efectos de las bacteriocinas del tipo A y del tipo B. Esto se debe a que son bacteriocinas compuestas por dos péptidos, uno con función similar al péptido componente de la bacteriocina tipo A formadora de poros y otro con función similar al péptido de la bacteriocina tipo B el cual interfiere en la formación de la pared celular (Guillor y col., 2008).

Las pertenecientes a la clase II inducen la permeabilización de la membrana plasmática y la subsecuente pérdida de moléculas muy pequeñas del citoplasma de la célula blanco (Oppegard y col., 2007).



Las bacteriocinas de la clase III se clasifican en dos grupos, las que son enzimas bacteriolíticas que producen la muerte celular y otras que destruyen a la célula blanco por procesos no líticos (van Belkum y col., 2011).

El modo de acción de las bacteriocinas de la clase IV es poco conocido (Guillor y col., 2008)

1.2.6. Microbiota vaginal, acción protectora de *Lactobacillus*

En mujeres sanas y en edad fértil, la microbiota vaginal está compuesta predominantemente por lactobacilos, quienes desempeñan un rol importante en la protección, previniendo infecciones urogenitales (Liu y col., 2006). Además de lactobacilos, se encuentran otros microorganismos pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* no hemolíticos y Enterobacterias, entre otros (Martín y col., 2008).

Los lactobacilos se encuentran en una concentración de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/g de fluido vaginal; sin embargo, estudios previos señalan que la microbiota cambia constantemente y sólo el 22% de las mujeres tienen una microbiota lactobacilar normal en todo momento de su vida (Strus y col., 2005; Zárate y Nader-Macias, 2006; Pascual y col., 2008a; Spurbeck y Grove Arvidson, 2008).

Después de la menopausia entre el 25 y 30% de las mujeres presentan lactobacilos en la microbiota vaginal; estos pueden incrementar su número hasta en un 100% de su recuento inicial por efecto de una terapia de reemplazo hormonal. Esta terapia ha permitido, sobre todo en mujeres posmenopáusicas con alta prevalencia a contraer infecciones, restablecer el recuento de lactobacilos de la microbiota vaginal a valores normales y contrarrestar la aparición de infecciones urogenitales (Gramiño Arroyo y col., 2005; Lamont y col., 2011).

El efecto de protección que los lactobacilos producen en vagina se basa en dos mecanismos, la adherencia específica y colonización de *Lactobacillus* al epitelio vaginal, mediante la formación de biopelícula o “*biofilm*”, y la producción de metabolitos activos, incluyendo ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético), H_2O_2 , biosurfactantes y bacteriocinas (Ocaña y col., 1999a;



1999b; Juárez Tomás y col., 2002, 2005; Strus y col., 2005; Lima y col., 2007; Coudeyras y col., 2008; Martín y col., 2008).

Durante el período reproductivo, hay un gran aporte de glucógeno en las células epiteliales de la vagina, estimuladas por la presencia de estrógenos (Juárez Tomás y col., 2005). Este glucógeno es metabolizado por los lactobacilos para la formación de ácido láctico, el cual inhibe el crecimiento de otras especies bacterianas, especialmente patógenas, y constituye uno de los mecanismos de defensa local. Esta actividad antagonista es un factor importante en la protección contra varias infecciones. La producción de ácidos orgánicos por los lactobacilos mantiene el pH vaginal menor o igual a 4,5 (Parras Huertas, 2010).

1.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus forma parte de la familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies y más de 10 subespecies, muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. Las bacterias pertenecientes a este género, son de gran importancia médica y desde hace muchos años se las ha relacionado como uno de los microorganismos patógenos que causan las principales infecciones nosocomiales. Con respecto a la morfología, el género está formado por cocos Gram positivos, no formadores de esporas, pueden encontrarse solos, de a pares, en cadenas cortas o en racimos (Koulenti y col., 2005; Durlach y col., 2012), (Fig. 1). Son anaerobios facultativos, pero crecen mejor en condiciones aerobias. Producen catalasa, coagulasa y crecen rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas de incubación a 37°C (Koneman, 2006).

S. aureus posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de un gran número de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones más graves como osteomielitis y endocarditis; respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario asociadas a la

utilización de catéteres, por ello es considerado una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Durlach y col., 2012).

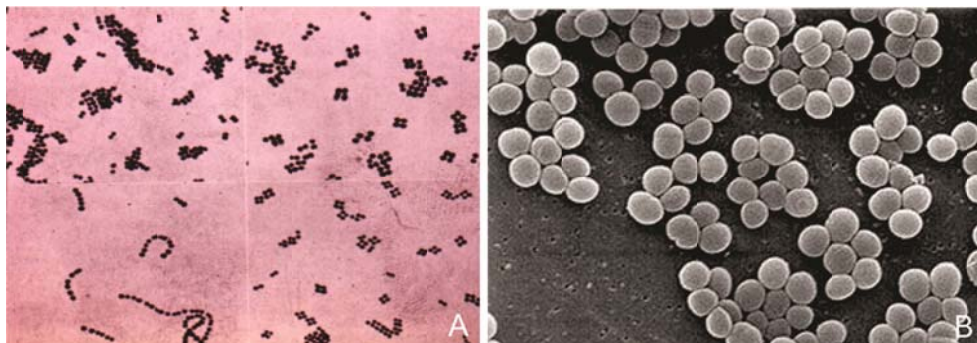


Figura 1 A: Fotografía tinción de Gram (100x). B: microfotografía de barrido de *Staphylococcus aureus* (450x). Fuente: (<http://phil.cdc.gov>).

Esta especie está asociada a intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia e impétigo (Velázquez-Meza, 2005).

Las infecciones por *S. aureus* comienzan por la llamada colonización de la zona infectada, la cual puede ocurrir tanto en niños como en adultos. La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel, y de estos sitios *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas. Si la piel o mucosas se rompen por trauma o cirugía, *S. aureus* puede acceder al tejido que circunda la herida provocando daño local o enfermedades de amplio espectro (Velázquez-Meza, 2005; Kanafani y Fowler, 2006). Históricamente, una bacteriemia causada por *S. aureus* producía mortalidad, en la actualidad, la tasa de mortalidad sigue siendo elevada (Durlach y col., 2012).

En la actualidad las infecciones por *S. aureus* han reemergido, esto se debe en parte a que la bacteria ha adquirido resistencia a los antibióticos con los que normalmente tratan las infecciones causadas por este microorganismo, razón por la cual se están buscando nuevos métodos de tratamiento, los cuales están basados en la utilización de nuevas sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (Bustos-Martínez y col., 2006).



1.3.1. Factores de virulencia

S. aureus produce una gran variedad de enzimas que contribuyen a su capacidad para colonizar los tejidos y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas. La función principal de estas proteínas es la de contribuir a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (ES), las toxinas exfoliativas (TEA y TEB) y la leucocidina (Bubeck Wardenburg y col., 2007). Estas proteínas participan en la adhesión a los tejidos y permiten la adquisición de nutrientes por parte del microorganismo, sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. Teniendo en cuenta lo antes expuesto, los factores de virulencia se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Panton-Valentine (LPV), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como las hemolisinas α , β , γ y δ (Velázquez-Meza, 2005; Bustos-Martínez y col., 2006).

La coagulasa producida por *S. aureus* existe en dos formas: una forma unida y una forma libre. La coagulasa unida a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina, este complejo transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca la agregación de los estafilococos. La coagulasa libre reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (FRC), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coagulo de fibrina. La coagulasa se utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas). La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad radica en que esta enzima causa la



formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis (Velázquez-Meza, 2005).

Las enterotoxinas estafilocócicas (ES), forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina-pirogénicos (STPAgs) ya que tienen actividad biológica de pirogenicidad y superantigenicidad. Se conoce una gran variedad de estas toxinas: en secuencia alfabética de ESA a ESE, de ESG a J, ESK, ESL, ESP, ESM y ESO. Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus*, las ES causan gastroenteritis, estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos que acompañan a la enfermedad gastrointestinal (Bustos-Martínez y col., 2006).

La toxina 1 del síndrome del shock tóxico de *S. aureus* suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial. La toxina actúa como superantígeno estimulando la liberación de varias citocinas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales producen los signos y síntomas del síndrome. Los síntomas típicos del síndrome del shock tóxico son: fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias y rash eritematoso. Otros síntomas incluyen meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, artralgia, irritabilidad, fatiga y dolor abdominal. En adultos puede producir síntoma de dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal. El síndrome del shock tóxico puede ser menstrual (por coincidir con el periodo menstrual) y está asociado con el uso de tampones. O bien ser no menstrual en cuyo caso se pueden producir abscesos, celulitis, bursitis, infecciones posparto, procedimientos post-quirúrgicos e infecciones vaginales (Nawrotek y col., 2005).

La LPV es producida en menos del 5% de las cepas de *S. aureus*. La leucocidina es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano. La leucocidina es una proteína que forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos ocasiona la liberación de mediadores de la inflamación,



con una consecuente respuesta inflamatoria grave (Saïd-Salim y col., 2005; Bubeck Wardenburg y col., 2007).

La hemolisina α produce hemólisis total de los glóbulos rojos ya que tiene especificidad por ellos, es considerada como el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros. Es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales. La toxina α es secretada por *S. aureus* y se integra en la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariotas mediante la formación de poros. Estos poros permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente desencadenan la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas, exocitosis de plaquetas y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y prostaciclina activa los mecanismos de vasoconstricción. Además, al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedero es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria (Montgomery y col., 2008). La toxina α es dermonecrótica y neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales (Adhikari y col., 2012).

La hemolisina β produce hemólisis parcial, se hace total después de ser incubada a 4°C durante toda la noche, tiene actividad de fosfolipasa c, la cual es específica para la esfingomielina y liso-fosfatidilcolina. La diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemolisina β se debe al diferente contenido de esfingomielina en los eritrocitos. Su función durante la enfermedad no está determinada claramente, sin embargo, se ha comprobado que produce una ventaja selectiva a la bacteria (Bustos-Martínez y col., 2006).

La hemolisina γ afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. Se desconoce hasta el presente, si induce la liberación de mediadores de la inflamación (Saïd-Salim y col., 2005).

La hemolisina δ producida por el 97% de las cepas de *S. aureus* es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos. Esta toxina hidroliza eritrocitos y otras células, así como estructuras



subcelulares rodeadas por membrana como esferoplastos y protoplastos. Tiene actividad dermonecrótica y puede ser letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas. Se ha propuesto que la hemolisina δ actúa como un surfactante disgregando la membrana celular (Barretti y col., 2009; Miller y Cho, 2011).

Los genes que codifican factores de virulencia como las enterotoxinas desde la A hasta la I, TSST-1, las toxinas exfoliativas A y B y las proteínas asociadas a la superficie, como la proteína de unión al colágeno, se encuentran localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (SaPIs), los cuales se transfieren horizontalmente entre las cepas. Otros genes, como los que codifican para la LPV, se localizan en bacteriófagos lisogénicos. Los genes que codifican algunos factores asociados con la supresión de la inmunidad innata como las proteínas inhibidoras de quimiotaxis y la estafilocinasa se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano. La expresión de los genes de virulencia en *S. aureus* está controlada por genes reguladores como el *agr* ("*accessory gene regulator*"). El movimiento horizontal de los elementos genéticos que codifican los factores de virulencia ocurre posiblemente *in vivo*, por lo que la presencia de estos elementos genéticos accesorios en una cepa puede influir en la adquisición o pérdida de otros elementos que codifican factores de virulencia (Moore y Lindsay, 2001; Bronner y col., 2004).

1.3.2. Epidemiología de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una de las bacterias patógenas más importantes a nivel mundial. Se ha demostrado que aproximadamente un cuarto de la población porta alguna de las cepas de estafilococos en alguna etapa de su vida (Johnson y col., 2006).

Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *S. aureus* por todo el mundo. Estos se han detectado principalmente en hospitales, centros de atención y clínicas y, en los últimos años, en la comunidad (Kanafani y Fowler, 2006). Actualmente, estos brotes se dividen en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad (Johnson y col., 2006).



1.3.3. Resistencia antimicrobiana

En la actualidad, las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS) (Kanafani y Fowler, 2006).

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus*, logró controlar de manera importante las enfermedades ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, un año después de su utilización ya se hallaron cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina. En el año 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente un 60% de las cepas aisladas de estafilococos fueron resistentes a la penicilina y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia. Los primeros aislamientos de *S. aureus* multirresistentes fueron informados en 1957. A principios de los 60' los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles (Velázquez-Meza, 2005).

Debido a la resistencia de las cepas de *S. aureus*, a finales de los años 50 se introdujeron cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre éstas podemos citar la meticilina como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus*. Esta droga fue introducida en Europa en 1959 y un año después se detectó la primera cepa *S. aureus* meticilina resistente ("methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", MRSA). Más tarde, en 1963, se informó el primer brote nosocomial causado por cepas MRSA. Desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* multirresistentes en todo el mundo (Velázquez-Meza, 2005; Kanafani y Fowler, 2006). En Argentina el porcentaje de prevalencia de cepas de *S. aureus* MRSA aisladas de infecciones nosocomiales es del 1,13%, valor que triplica al de países como Irlanda o es similar al observado en Inglaterra (Durlach y col., 2012). Es por eso que surge la necesidad del desarrollo de nuevos conocimientos acerca del potencial de ciertas especies bacterianas, tales como aquellas pertenecientes



al género *Lactobacillus*, capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, sobre todo, teniendo en cuenta que este microorganismo patógeno puede adquirir resistencia a los antimicrobianos de síntesis química.



2. Hipótesis

La actividad antimicrobiana producida por lactobacilos vaginales inhibe a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas del tracto urogenital.



3. Objetivos:

General

General: Estudiar la inhibición de cepas de *Staphylococcus aureus* por diferentes cepas de *Lactobacillus spp.*

Objetivos Específicos

- Aislar e identificar las cepas de *Staphylococcus aureus* a partir del tracto urogenital femenino.
- Detectar la actividad antimicrobiana de las diferentes cepas de lactobacilos.
- Estudiar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por lactobacilos con actividad antimicrobiana.



4. Materiales y Métodos

4.1. Cepas utilizadas:

Lactobacillus spp: Se utilizaron 10 cepas de lactobacilos vaginales productoras de bacteriocinas, 5 de ellas productoras de H₂O₂: *L. acidophilus* (L24); *L. casei* sub sp. *rhamnosus* (L28); *L. rhamnosus* (L60); *L. paracasei* sub. sp. *paracasei* (L74) y *L. rhamnosus* (L160) y 5 cepas no productoras de H₂O₂: *L. fermentum* (L23); *L. fermentum* (L25); *L. paracasei* sub sp *paracasei* (L47), *L. rhamnosus* (L56) y (L73). Estas cepas forman parte del cepario de la orientación Bacteriología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la UNRC, las cuales han sido aisladas, identificadas y caracterizadas en sus propiedades antimicrobianas benéficas y probióticas (Pascual, 2004; Pascual y col., 2008b;).

Las cepas bacterianas fueron conservadas mediante incubación en caldo MRS (“Man, Rogosa and Sharpe”) durante 18h a 37°C en microaerofilia. Posteriormente se les agregó glicerol al 30% y se guardaron a -20°C. Para su utilización las cepas fueron descongeladas a temperatura ambiente, se tomó un inóculo de cada una de ellas, se sembraron en caldo MRS y se incubaron en microaerofilia (5 % de CO₂) a 37°C por 48h. Luego se las aisló en agar MRS y se las incubó a 37°C en microaerofilia por 24h. Este procedimiento se repitió cada treinta días.

Escherichia coli: Se utilizó una cepa de *E. coli* perteneciente a la colección de la cátedra de Bacteriología (UNRC). Esta cepa bacteriana se cultivó en caldo nutritivo a 37°C en aerofilia por 24h.

Para su conservación se realizó un cultivo de 24h a 37°C en caldo nutritivo, se le agregó glicerol al 30% y se congeló a -20°C.

Staphylococcus aureus: Se utilizaron 30 cepas de *S. aureus* previamente aisladas por el grupo de investigación a partir del tracto urogenital de mujeres que asistieron al Hospital San Antonio de Padua, con síntomas y signos de enfermedad vulvovaginal. A las colonias aisladas se les practicó la tinción de Gram y posteriormente fueron identificadas por las pruebas bioquímicas aconsejadas por diversos autores Koneman (2006); Bergey (2009).

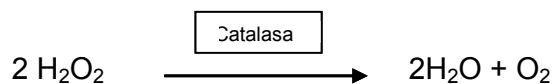


Para la conservación de las cepas identificadas como *S. aureus* y *E. coli*, se procedió de la siguiente manera: se sembraron en caldo nutritivo incubándose en aerobiosis a 37°C durante 24h. Posteriormente se les agregó glicerol al 30% y se guardaron a -20°C. Para su utilización se tomó un inóculo de cada una de las cepas previamente descongeladas a temperatura ambiente, se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron en aerobiosis a 37°C por 12h. A partir de este caldo se sembraron en agar nutritivo y se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 12h, procedimiento que se realizó cada treinta días a fin de asegurar la viabilidad de la cepa.

4.2. Pruebas de Familia *Staphylococcaceae*

Catalasa: es una hemoproteína cuyo grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente por molécula. Esta enzima se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. En general, los organismos que no poseen sistema de citocromos carecen de esta enzima. La actividad enzimática de las catalasas consiste en catalizar la descomposición del H_2O_2 a moléculas de agua con liberación de O_2 .

Para poner en evidencia la actividad catalasa, se adicionó H_2O_2 al 30 % sobre el crecimiento bacteriano. La liberación de O_2 visualizado mediante la formación de burbujas indicó la actividad de esta enzima, según la siguiente reacción:



4.3. Pruebas de Género

OF glucosa: para diferenciar las bacterias que fermentan de las que oxidan la glucosa, se utilizó un medio de cultivo (agar sólido) base con el agregado de un indicador de pH y D-glucosa al 1 % (P/V). Se sembraron dos tubos para cada microorganismo a estudiar, uno de esos tubos fue sellado con 1 ml de vaselina estéril para observar el metabolismo fermentativo; el otro se dejó en



contacto con el O_2 (sin sellar). Ambos fueron incubados a $37^\circ C$ durante 24h. La producción de ácidos acidifica el medio y produce un viraje del indicador.

Sensibilidad a la bacitracina: permite diferenciar el género *Micrococcus* de *Staphylococcus*, ya que las pertenecientes a este último género muestran resistencia a la bacitracina. Esta técnica se realizó tomando con un ansa una colonia aislada proveniente del cultivo, se la colocó en un tubo conteniendo 1 ml de caldo tripticasa soya hasta lograr una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml), se embebió un hisopo en la solución y se sembró en una placa con agar Müller Hinton cubriendo toda la superficie de la misma y se le colocó un disco de bacitracina (0.04 U). Después de incubar la placa a $37^\circ C$ durante 24h se visualizó el halo de inhibición alrededor del disco, indicando susceptibilidad de la bacteria al antibiótico.

Tolerancia al NaCl al 15 %: El fundamento de esta técnica está dado por la tolerancia del género *Staphylococcus* a altas concentraciones de esta sal. Se realizó esta técnica tomando con un ansa una colonia aislada proveniente del cultivo de la muestra del paciente y se la sembró en una placa de Petri que contenía medio de cultivo con NaCl al 15%. Esta prueba se considera positiva cuando se observa crecimiento en el medio de cultivo.

4.4. Pruebas de Especie

Coagulasa en tubo: Esta prueba permite evidenciar la presencia de la enzima coagulasa capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina (es el mayor índice de virulencia de *Staphylococcus*). Se realizó la técnica de coagulasa en tubo (evidencia coagulasa libre) de la siguiente manera: se sembró una ansada de una colonia aislada proveniente del cultivo de la muestra del paciente en un tubo conteniendo 0.5 ml de plasma. Se incubó a $37^\circ C$ por 24h en estufa y se observó la formación de coagulo (reacción positiva)

Fermentación del manitol: Se utilizó medio base con el agregado de manitol a una concentración del 1% y un indicador de cambio de pH. La fermentación del manitol produce un cambio de color en el medio. Esta técnica se realizó sembrando una ansada de una colonia aislada en el tubo de cultivo, se selló



con vaselina y se incubó a 37°C por 24h. La mayoría de las *S. aureus* fermentan el manitol.

Reducción de nitratos: Las bacterias que reducen nitratos tienen la capacidad de obtener oxígeno de los nitratos produciendo nitritos y otros productos de reacción. Esta reducción tiene lugar generalmente bajo condiciones anaeróbicas. Para poner en evidencia la reacción de reducción, se agregó el reactivo alfa-naftilamina al 1%, ácido sulfanílico y ácido tartárico al 89%. Si hay un viraje de color en el medio de cultivo al rojo al cabo de 1 ó 2 min, la reacción se considera positiva. Cuando no se produce el cambio de color al rojo en el medio al agregar el reactivo, debe espolvorearse con zinc en polvo y agitar bien; si al cabo de esto el tubo se mantiene incoloro es porque no ha quedado nitrato para que el zinc pueda reducirlo a nitrito, por lo tanto los microorganismos han reducido nitrato a nitrito y a nitrógeno y la reacción es considerada positiva. En caso contrario, si al agregar el polvo de zinc aparece color rojo, la reacción es negativa, ya que aún queda nitrato en el medio de cultivo que en presencia del metal zinc se reduce a nitrito permitiendo observar la coloración rojiza en el tubo.

Utilización aeróbica de hidratos de carbono; se emplearon: maltosa, D-trehalosa, D-manitol, D-xilosa, xilitol, D-celobiosa, sacarosa, D-furanosa, D-manosa, D-ribosa, rafinosa, alfa lactosa y beta-D-fructuosa, bajo condiciones de aerobiosis. Esta técnica permitió diferenciar metabólicamente la especie bacteriana en cuestión. El ensayo se realizó en un medio líquido base (Hugh y Leifson) al que se le agregó el hidrato de carbono al 1% (P/V) y rojo de fenol como indicador del cambio de pH. Se sembró en el medio base una colonia crecida en agar nutritivo y una coloración amarilla se consideró reacción positiva.

4.5. Ensayo de actividad inhibitoria de *Lactobacillus spp.* sobre *S. aureus*

Los lactobacilos a ensayar se dividieron en dos grupos, uno formado por los lactobacilos productores de H₂O₂ y otro por los no productores de H₂O₂.

Para comprobar la capacidad inhibitoria de los lactobacilos, sobre las diferentes cepas de *S. aureus*, se realizó la técnica de estrías cruzadas (Ruiz y col., 2009). Se sembró una estría central del lactobacilo (incubado previamente

toda la noche en caldo MRS), en agar MRS incubándose a 37°C durante 24-48h en microaerofilia. Posteriormente, se inactivó con vapores de cloroformo durante diez minutos y se sembraron las cepas de *S. aureus* y del control positivo (*E. coli*) en forma de estrías perpendiculares y de ambos lados respecto a la estría central realizada con el lactobacilo (Figura 2). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h en aerobiosis. Se midieron los halos de inhibición (mm) del crecimiento bacteriano producido para cada una de las cepas de *S. aureus*.

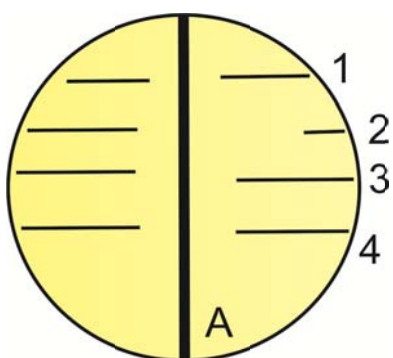


Figura 2: Esquema de siembra en placa de Petri utilizando la técnica de estrías cruzadas. Referencias: A: cepa de *Lactobacillus spp.*; 1, 2, 3 y 4: cepas de *S. aureus*.

4.6. Análisis estadístico

Las diferencias entre las medias de los valores de inhibición obtenidos entre las cepas de *Staphylococcus* y las cepas *Lactobacillus*, fueron analizadas usando el software INFOSTAT/Profesional versión 2.0 (2004). Una característica de las cepas BAL (producción o no de peróxido de hidrógeno) fue incluida como variable en el modelo de análisis. El análisis usado para comparar las medias fue ANOVA y las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas, cuando el *p-valor* fue <0.05 . (Ver anexo estadístico).

5. Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la identificación de las 30 cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio. Estas cepas fueron identificadas mediante determinadas pruebas bioquímicas aconsejadas en el manual de Bergey (2009) y Koneman (2006).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Números de cepas	Pruebas metabólicas																		
	Catalasa	OF glucosa	Bacitra.	CINa 15%	coagulasa	Fer. manitol	Red. nitratos	Maltosa	D-trehalosa	D-xilosa	Xilitol	D-celobiosa	Sacarosa	D-furanosa	D-manosa	D-ribosa	Rafinosa	α lactosa	β -D-fructuosa
23	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
31	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
38	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
40	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
56	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
59	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
62	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
63	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
64	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
65	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
66	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
76	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
80	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
85	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
87	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
89	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
91	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
92	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
93	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
94	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
95	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
104	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
106	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
108	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
109	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
110	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
111	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
168	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
169	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
175	+	F	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+

Referencias: (+) Prueba positiva; (-) prueba negativa; (R) resistente; (F) fermenta.

Las diferentes cepas de *S. aureus* identificadas y provenientes del tracto urogenital femenino, fueron empleadas para estudiar la actividad



antimicrobiana de los dos grupos de lactobacilos. En el grupo de los lactobacilos no productores de H_2O_2 , las cepas de lactobacilos L23 y L47 fueron las que mostraron los mayores porcentajes de cepas inhibidas de *S. aureus*, siendo estos valores del 100 y 96,6 %, respectivamente. Mientras que las cepas L25, L56 y L73, mostraron menor capacidad para inhibir el crecimiento de *S. aureus* con porcentajes del 66,6; 76,6 y 46,6 %, respectivamente (Tabla 2).

Por otro lado, a diferencia de las cepas de lactobacilos no productoras de H_2O_2 , la mayoría de las cepas productoras de H_2O_2 mostraron mayor capacidad inhibitoria (Tabla 3). Se pudo determinar que a excepción de L24 y L28, las cuales inhibieron un 90% de las cepas de *S. aureus*, el resto de las cepas de lactobacilos analizadas inhibieron la totalidad de las cepas de *S. aureus* (Tabla 3). Resultados similares a los nuestros en relación al tamaño de los halos de inhibición, también fueron encontrados por diferentes grupos de investigación, entre ellos, Elkins y col. (2008) quienes utilizaron 39 cepas de lactobacilos y 10 cepas de *S. aureus* (*productores de síndrome de shock toxico*). Hallazgos semejantes fueron obtenidos por Ruiz y col (2009) los cuales mostraron inhibición sobre el crecimiento de distintas especies de *Staphylococcus* y otros microorganismos patógenos, por dos de las cepas utilizadas en este estudio (L23 y L60). Por su parte, Seok Lim y col (2009) aislaron 5 cepas de lactobacilos de heces de infantes y las enfrentaron a *S. saprophyticus* obteniendo halos de inhibición de 18 mm de diámetro. Más aún, se ha demostrado que cepas del genero *Lactobacillus* (CRL 1724 y CRL 1716), aisladas de leche de vaca, manifestaron inhibición de todas las cepas de *Staphylococcus* ensayadas, con halos entre 1 y 18 mm de diámetro (Frola y col., 2011).

La marcada diferencia que existe en los porcentajes de inhibición en el crecimiento de las cepas patógenas entre los dos grupos de lactobacilos pone de manifiesto la importancia del peróxido de hidrogeno como agente inhibitorio del crecimiento bacteriano, sumado a la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y biosurfactantes por parte de los Lactobacilos estudiados.



Tabla 2. Porcentajes y halos de inhibición del crecimiento de cepas de *S. aureus* por el empleo de lactobacilos no productores de H₂O₂ .(\pm DE: desviación estándar)

S. aureus n=30	lactobacilos				
	23	25	47	56	73
	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE
23	4,67 \pm 2,12	0,00 \pm 0,00	8,33 \pm 1,41	1,67 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
31	7,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	7,00 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
38	6,00 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	9,00 \pm 0,71	2,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00
40	9,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	8,67 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
56	7,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	7,00 \pm 2,12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
59	13,33 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	14,33 \pm 2,83	6,00 \pm 0,71	5,67 \pm 1,41
62	6,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	7,67 \pm 2,83	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
63	9,33 \pm 2,12	4,00 \pm 0,71	10,00 \pm 1,41	4,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00
64	7,67 \pm 1,41	6,67 \pm 2,12	7,67 \pm 2,12	4,33 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
65	6,00 \pm 1,41	6,33 \pm 0,71	7,67 \pm 1,41	3,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00
66	18,00 \pm 2,83	5,00 \pm 0,71	9,33 \pm 0,71	2,00 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00
76	20,67 \pm 2,12	19,67 \pm 2,12	20,33 \pm 2,12	21,00 \pm 1,41	21,30 \pm 1,41
80	6,33 \pm 0,71	3,33 \pm 0,00	9,67 \pm 1,41	5,67 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00
85	7,33 \pm 2,12	6,00 \pm 0,71	10,67 \pm 0,71	8,33 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00
87	19,33 \pm 2,12	16,00 \pm 1,41	16,33 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	10,00 \pm 1,41
89	9,67 \pm 1,41	3,67 \pm 0,71	12,33 \pm 2,12	11,00 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00
91	21,67 \pm 1,41	21,33 \pm 2,12	20,00 \pm 0,71	22,67 \pm 2,12	21,30 \pm 0,71
92	9,00 \pm 0,71	9,67 \pm 0,71	10,67 \pm 0,71	9,33 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00
93	10,00 \pm 1,41	6,33 \pm 0,00	10,00 \pm 2,12	4,67 \pm 0,71	8,33 \pm 0,71
94	19,67 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	15,33 \pm 2,12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
95	12,00 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	3,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
104	10,00 \pm 2,83	5,00 \pm 1,41	13,33 \pm 2,12	10,00 \pm 1,41	13,3 \pm 2,12
106	22,00 \pm 2,83	0,00 \pm 0,00	20,67 \pm 2,83	17,33 \pm 2,12	19,30 \pm 1,41
108	20,00 \pm 2,83	15,00 \pm 2,83	22,00 \pm 0,71	14,67 \pm 0,71	6,00 \pm 1,41
109	13,33 \pm 1,41	10,00 \pm 0,71	2,67 \pm 0,71	5,00 \pm 1,41	2,67 \pm 0,71
110	24,33 \pm 2,12	16,33 \pm 2,12	21,00 \pm 2,83	19,67 \pm 0,71	9,67 \pm 0,71
111	9,33 \pm 1,41	5,67 \pm 1,41	14,67 \pm 0,71	10,67 \pm 2,83	0,00 \pm 0,00
168	10,33 \pm 2,12	7,00 \pm 0,71	0,00 \pm 0,00	6,33 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
169	12,67 \pm 3,54	10,00 \pm 0,71	4,67 \pm 0,00	19,67 \pm 1,41	4,67 \pm 0,00
175	8,67 \pm 2,12	13,67 \pm 1,41	3,33 \pm 2,12	5,67 \pm 0,00	2,67 \pm 0,71
%cepas inhibidas	100	66,6	96,6	76,6	46,6

Es por eso que los porcentajes de inhibición de cada grupo sean tan variables; la producción de peróxido de hidrogeno estaría asegurando un porcentaje de inhibición superior al 90%, mejorando la actividad antimicrobiana de la cepa.

Tabla 3. Porcentajes y halos de inhibición del crecimiento de cepas de *S. aureus* por el empleo de lactobacilos productores de H₂O₂. (\pm DE: desviación estándar)

<i>S. aureus</i> n=30	lactobacilos				
	24	28	60	74	160
	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE	X \pm DE
23	3,67 \pm 0,71	10,33 \pm 1,41	20,33 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	3,33 \pm 0,00
31	8,33 \pm 2,12	13,33 \pm 0,71	20,67 \pm 0,71	19,67 \pm 2,12	5,33 \pm 0,71
38	8,33 \pm 0,00	13,33 \pm 0,71	20,33 \pm 1,41	20,33 \pm 0,71	4,67 \pm 1,41
40	4,33 \pm 1,41	4,33 \pm 1,41	20,00 \pm 2,12	21,33 \pm 1,41	8,67 \pm 0,00
56	3,67 \pm 1,41	4,33 \pm 0,00	20,33 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	8,33 \pm 0,00
59	4,33 \pm 1,41	4,33 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	20,33 \pm 0,71	7,33 \pm 0,71
62	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,71	20,00 \pm 0,71	6,00 \pm 0,71
63	5,00 \pm 0,71	5,00 \pm 0,71	14,67 \pm 2,12	20,00 \pm 0,00	11,33 \pm 2,12
64	3,00 \pm 1,41	3,00 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	21,33 \pm 1,41	5,33 \pm 0,00
65	6,00 \pm 0,71	5,33 \pm 0,71	16,00 \pm 1,41	22,67 \pm 2,83	8,00 \pm 0,71
66	2,33 \pm 0,71	2,33 \pm 0,71	20,00 \pm 0,71	22,33 \pm 1,41	10,00 \pm 0,71
76	20,33 \pm 1,41	20,33 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	20,33 \pm 0,00	20,33 \pm 1,41
80	2,67 \pm 0,00	4,33 \pm 1,41	10,33 \pm 2,12	20,33 \pm 0,71	20,67 \pm 0,71
85	7,00 \pm 2,83	13,00 \pm 1,41	20,00 \pm 2,12	21,00 \pm 1,41	6,00 \pm 0,71
87	11,67 \pm 0,71	13,00 \pm 1,41	20,33 \pm 1,41	23,00 \pm 1,41	8,33 \pm 1,41
89	12,00 \pm 1,41	15,00 \pm 1,41	20,67 \pm 0,71	20,67 \pm 0,71	8,00 \pm 0,71
91	20,67 \pm 0,71	20,33 \pm 1,41	21,00 \pm 0,00	21,67 \pm 1,41	20,33 \pm 1,41
92	11,33 \pm 0,71	21,00 \pm 1,41	20,33 \pm 1,41	21,33 \pm 0,71	4,33 \pm 1,41
93	6,67 \pm 1,41	19,67 \pm 1,41	15,33 \pm 1,41	21,00 \pm 1,41	4,67 \pm 1,41
94	10,67 \pm 2,83	20,33 \pm 0,00	10,00 \pm 1,41	23,33 \pm 2,83	20,33 \pm 0,00
95	3,33 \pm 0,00	4,33 \pm 1,41	6,33 \pm 0,71	23,00 \pm 1,41	4,33 \pm 1,41
104	4,33 \pm 0,00	5,00 \pm 0,71	8,00 \pm 0,71	23,33 \pm 1,41	5,33 \pm 1,41
106	5,67 \pm 0,71	6,33 \pm 0,71	12,67 \pm 0,71	23,00 \pm 1,41	10,33 \pm 0,71
108	10,33 \pm 1,41	20,00 \pm 0,71	19,00 \pm 0,71	21,00 \pm 0,71	6,00 \pm 0,71
109	8,33 \pm 0,00	19,67 \pm 1,41	14,67 \pm 2,12	20,33 \pm 1,41	7,67 \pm 0,71
110	8,67 \pm 0,71	20,00 \pm 0,71	13,67 \pm 1,41	20,00 \pm 0,71	8,33 \pm 1,41
111	8,33 \pm 0,00	8,00 \pm 0,71	12,67 \pm 0,00	20,67 \pm 0,71	10,33 \pm 2,12
168	4,67 \pm 0,71	4,67 \pm 0,71	9,00 \pm 1,41	22,33 \pm 1,41	8,67 \pm 0,71
169	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	8,00 \pm 0,71	21,00 \pm 0,71	7,00 \pm 0,71
175	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	12,33 \pm 0,71	21,33 \pm 0,71	5,67 \pm 1,41
%cepas inhibidas	90	90	100	100	100

En la Figura 3, se observa que el tamaño de los halos de crecimiento promedio de las cepas de lactobacilos no productoras y productoras de H₂O₂ fueron de 8,13 y 12,6 mm, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

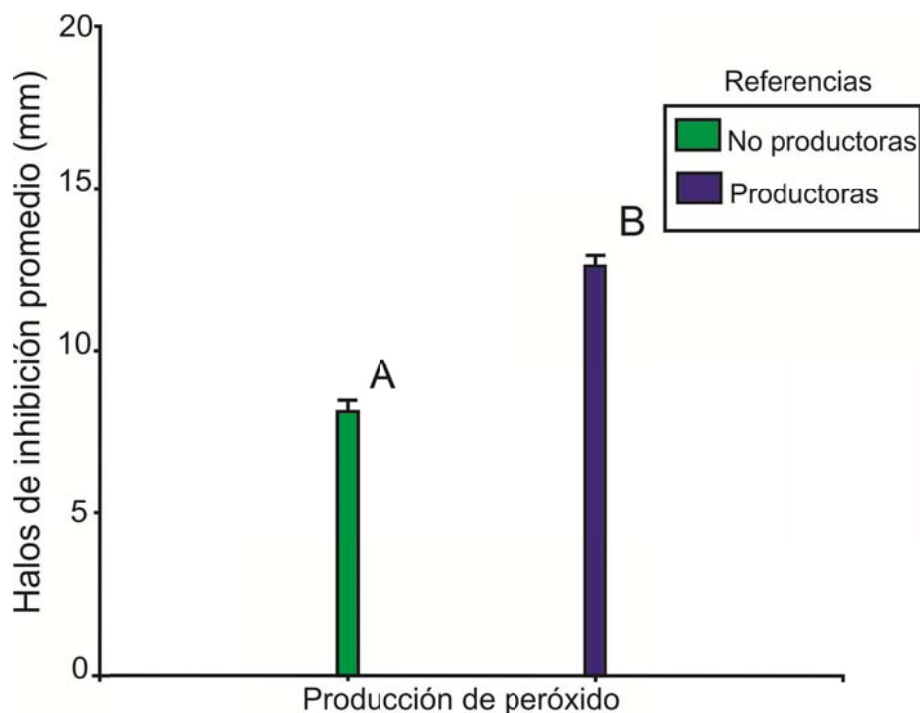


Figura 3: Promedio de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de cada grupo de lactobacilos productor y no productor de H_2O_2 frente a *S. aureus*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

En el presente trabajo se determinó que las cepas L23 y L47 pertenecientes al grupo de no productores de H_2O_2 , mostraron los mayores halos de inhibición, siendo significativamente superiores al resto de las cepas ensayadas (Figura 4).

También se halló que L60 y L74 pertenecientes al grupo de las cepas productoras del agente oxidante, fueron las que presentaron la mayor capacidad inhibitoria, siendo significativamente más eficientes (Figura 5). Para el caso particular del grupo productor, la cepa L74 supera los 20 milímetros de halo promedio. Estos hallazgos coinciden con los resultados informados por Elkins y col (2008), Pascual y col (2008b), Seok Lim y col (2009); Frola y col (2011), quienes a pesar de usar diferentes BAL, obtuvieron porcentajes de inhibición similares. Además, dentro del grupo de las cepas productoras de H_2O_2 , la cepa L74 no solo mostró la mayor capacidad inhibitoria sobre la mayoría de las cepas patógenas ensayadas, sino también que produjo los halos de inhibición de mayor tamaño (Tabla 4).

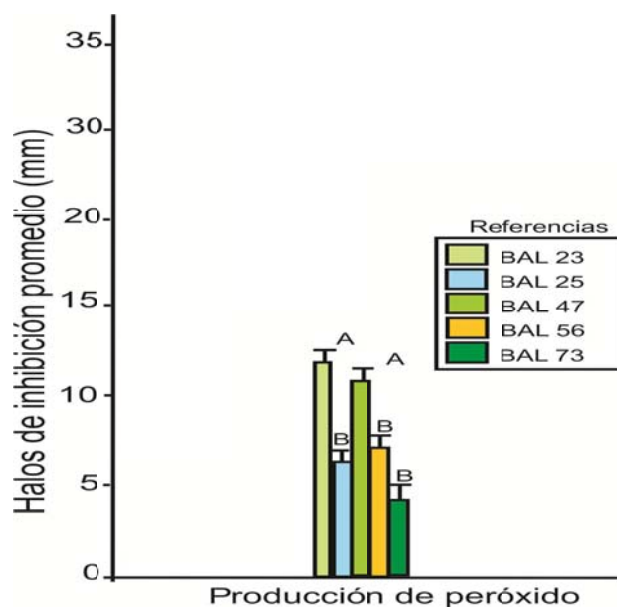


Figura 4: Comparación de la media de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del grupo de lactobacilos no productores de peróxido de hidrogeno. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

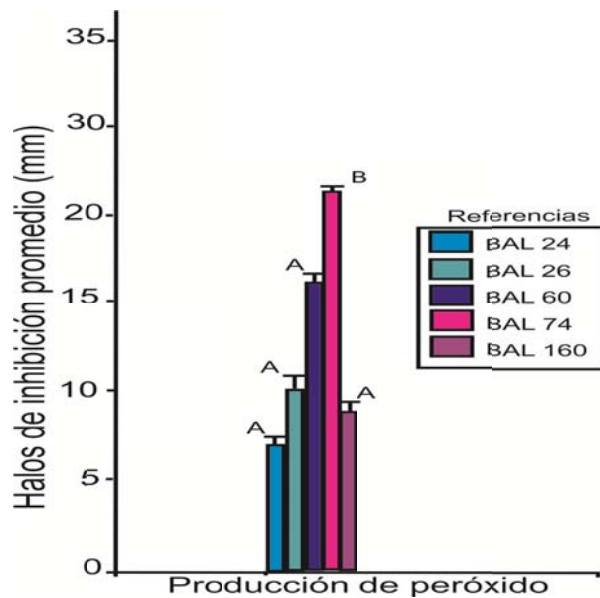


Figura 5: Comparación de la media de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del grupo de lactobacilos productores de peróxido de hidrogeno. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

De esta manera, se demuestra que la actividad inhibitoria del H_2O_2 actúa potenciando o mejorando notoriamente la actividad antimicrobiana de otros



metabolitos producidos por los lactobacilos como por ejemplo bacteriocinas y ácidos orgánicos.

Tabla 4. Halos promedio de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* por lactobacilos productores y no productores de H₂O₂.

	Productores de H ₂ O ₂					No productores de H ₂ O ₂				
Lactobacilos	23	25	47	56	73	24	28	60	74	160
Halos										
promedios	11,94	6,34	10,91	7,16	4,28	6,86	10,02	16,06	21,24	8,84
(mm)	±2.69	±2.69	±2.69	±2.69	±2.69	±2.16	±2.16	±2.16	±2.16	±2.16

Referencia: ±desviación estándar

Cabe destacar que en el presente trabajo, se estudiaron 30 cepas de *S. aureus* aisladas del tracto urogenital femenino y 10 cepas de lactobacilos productores y no productores de H₂O₂, mientras que en los estudios realizados por diferentes grupos de investigación, entre ellos, Elkins y col. (2008), Seok Lim y col. (2009) y Frola y col. (2011), las cepas patógenas no fueron necesariamente especies del género *Staphylococcus*. Los resultados hallados en esta tesina coinciden parcialmente con los informados por Wysocki-Karska y col. (2010), quienes si bien obtuvieron buena actividad inhibitoria de 2 especies de lactobacilos sobre *S. aureus*, el número de cepas patógenas ensayadas fue muy inferior a las de este estudio.

Por otro lado, se pudo observar que en general las cepas de lactobacilos utilizadas inhibieron el crecimiento del 80% de las cepas de *S. aureus* ensayadas (Figuras 6 y 7).

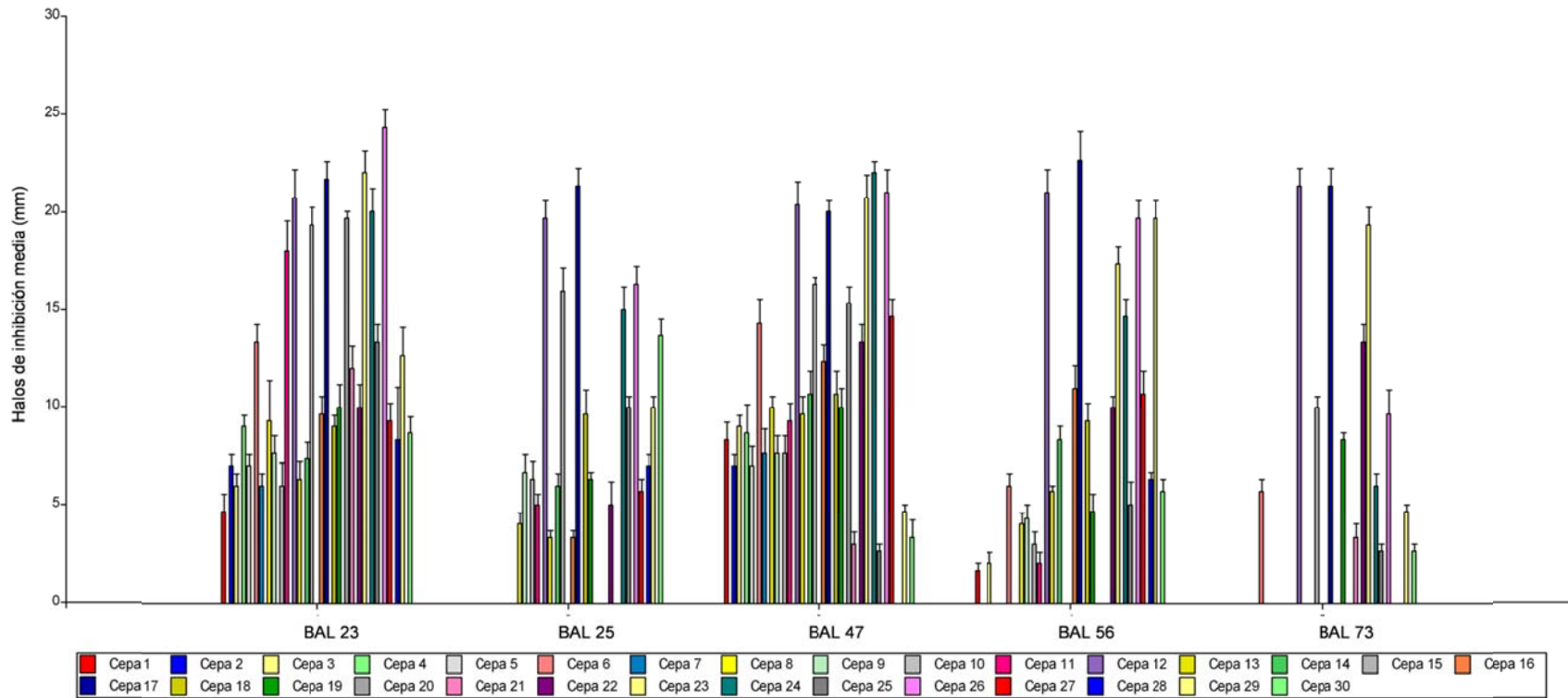


Figura 6: Halos de inhibición promedio de las cepas de lactobacilos no productoras de H₂O₂ frente a cada cepa de *S. aureus*.

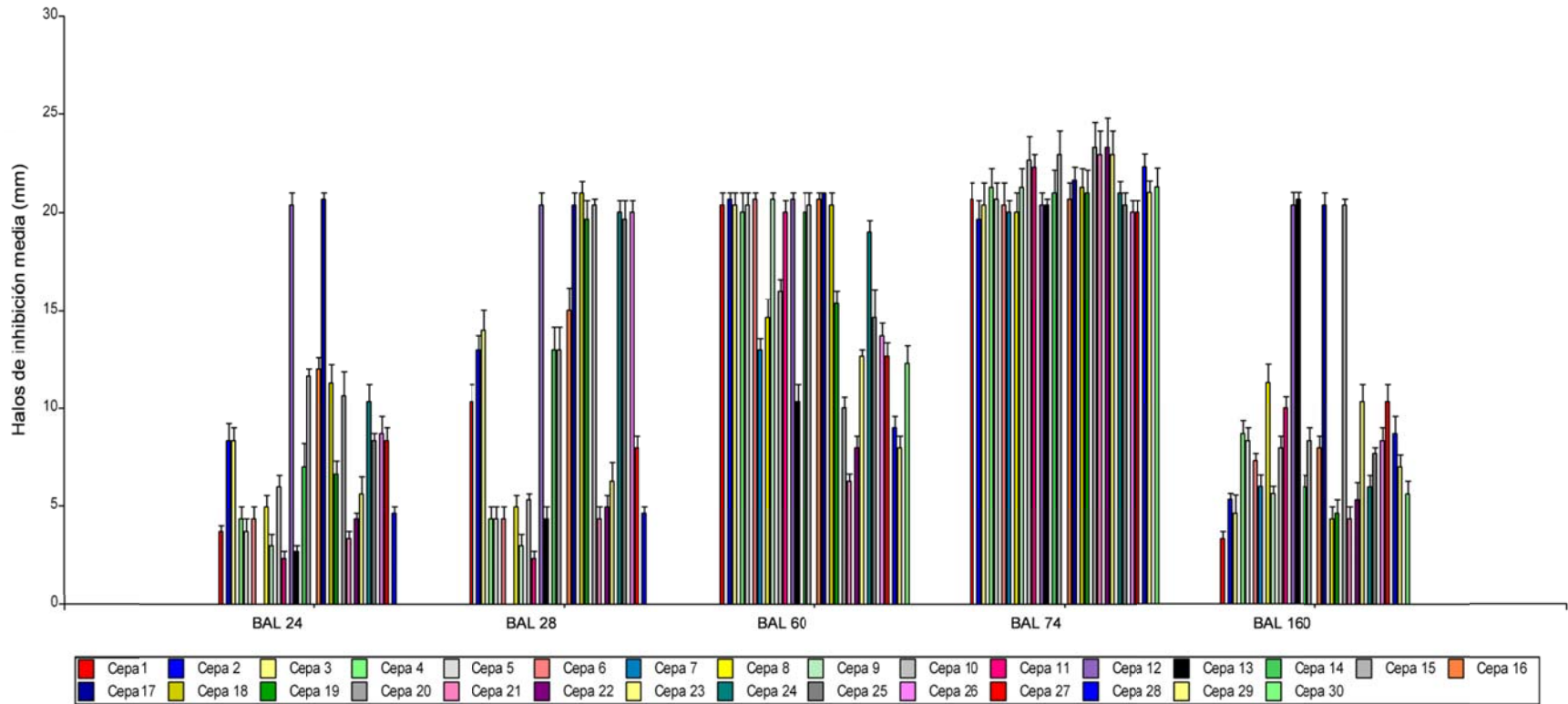


Figura 7: Halos de inhibición promedio de las cepas de lactobacilos productoras de H₂O₂ frente a cada cepa de *S. aureus*.



6. Conclusiones

- Los lactobacilos inhibieron en un alto porcentaje a las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*.
- Dentro del grupo de lactobacilos no productores de peróxido de hidrógeno la cepa L23 (*L. fermentum*) fue la única que inhibió a todas las cepas de estafilococos.
- Las cepas de lactobacilos L60 (*L. rhamnosus*) y L74 (*L. paracasei* sub. *sp. paracasei*) productoras de peróxido de hidrógeno inhibieron a la totalidad de las bacterias patógenas.
- Los mayores halos de inhibición del crecimiento bacteriano fueron producidos por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus paracasei* sub. *sp. paracasei* L74.
- El grupo de lactobacilos que mostró significativamente mejor capacidad de inhibición frente a distintas cepas de *Staphylococcus aureus* fue el conformado por los productores de peróxido de hidrogeno.



6.1. Conclusión general

Debido a que los tratamientos con antibióticos producen un desbalance en la microbiota surge la necesidad de implementar estrategias inocuas y eficaces a la hora de tratar las infecciones bacterianas a estafilococos. Los resultados encontrados en este trabajo muestran la importante actividad antimicrobiana de estos lactobacilos sobre distintas cepas de *Staphylococcus aureus*, demostrando la capacidad bioterapéutica de los mismos. Esto constituye una alternativa interesante en el control y prevención de las infecciones a *Staphylococcus aureus* en el nicho ecológico vaginal.



7. Bibliografía

- **Adhikari, R.P.**; Ajao, A.O.; Aman, M.J.; Karauzum, H.; Sarwar, J.; Lydecker, A.D.; Johnson, J.K.; Nguyen, C.; Chen, W.H.; Roghman, M.C. 2012. Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. *J. Infec. Dis.*; 206:915-923.
- **Balkus, J.E.**; Mitchell, C.; Agnew, K.; Liu, C.; Fiedlre, T.; Cohn, S.; Luque, A.; Coombs, R.; Fredericks, D.N.; Hitti, J. 2012. Detection of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in the vagine: a comparison of culture and quantitative PCR among HIV-1 seropositive women. *Infect. Dis.*; 12:188.
- **Barretti, P.**; Montelli, A.C.; Batalha, J.E.; Caramori, J.C.; Cunha Mde, L. 2009. The role of virulencefactors in the outcome of staphylococcal peritonitis in capd patients. *BMC Infect. Dis.*; 9: 212.
- **Bergey's Manual for determinative Bacteriology**, 2009. Buchaman, R. and Gibbons, N., Williams and Wilkins C. Vol. III.p.405. Baltimore
- **Bronner S.**; Monteil H; Prévost G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*; 28:183-200.
- **Bubeck Wardenburg, J.**; Bae, T.; Otto, M.; Deleo, F.R.; Schneewind, O. 2007. Poring over pores: Alpha-hemolysin and panton-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.*; 13: 1405–1406.
- **Bustos-Martínez J.A.**; Hamdan-Partida A.; Gutiérrez-Cárdenas M., 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Depto. de Atención a la Salud, Depto. de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D.F., México.
- **Coudeyras, S.**; Jugie, G.; Vermerie, M.; Forestier, M. 2008. Adhesion of Human Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and



interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infec. Dis. in Obstet. and Gynec.*; doi:10.1155/2008/549640.

- **Dridler, D.**; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L.M.; Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 70:564-582.
- **Durlach R.**; McIlvenny G.; Newcombe R.G.; Reid G.; Doherty L.; Freuler C.; Rodriguez V.; Duse A. G.; Smyth E. T. M.. 2012. Prevalence survey of health care-associated infections in Argentina; comparison with England, Wales, Northern Ireland and South Africa. *J. hosp. Infect.*; DOI:10.1016/j.jhin.2011.12.001.
- **Eijsink, V.G.**; Axelsson, L.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S.; Holo, H.; Nes, I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *A. Van Leeuwenhoek*; 81:639-654.
- **Elkins, C.**; Muñoz, M.E.; Mullis, L.; Stingley, R.; Hart, M. 2008. *Lactobacillus*-mediated inhibition of clinical shock syndrome *Staphylococcus aureus* strains and its relation to acid and peroxide production. *Clin. Microbiol. Anaerobe*; 14:261-267.
- **Frola, I.**; Pellegrino, M.; Espeche, M.; Giraudo, J.; Nader-Macias, M.; Bogni Cristina, I. 2011. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL 1724 in lactating cows'udders. *J. Dairy Research*; 79:1-9. DOI: 10.1017/S0022029911000835.
- **Gordon, D.M.**; Oliver, E.; Littlefield-Wyer, J. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley, MA. ; Chavan, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*, p.5-18.
- **Gramiño Arroyo, A.E.**; Barrios Ceballos, M.P.; Cárdenas de la Peña, L.; Amaya Velázquez, F.; Padilla Vaca, F. 2005. Flora normal, probióticos y salud humana. *Act. Univ.* 15:34-40.
- **Guillor O.**; Etzion A.; Riley M. A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* ; 81: 591-606.



- **Heng, N.C.K.**; Wescombe, P.A.; Burton J.P.; Jack, R.W.; Tagg J.R. 2007. In: Riley, MA. ; Chavan, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*, 1:45-92.
- **INFOSTAT, 2004.** InfoStat, versión 2004. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- **Johnson, D.R.P**; Howden, P.B; Bennett, C.M., 2006 *Staphylococcus aureus: a guide for the perplexed*. Med. J. Aust.; 184:374-5
- **Juarez Tomás, M.S.**; Bru, E.; Wiese, B.; de Ruiz Holgado, A.A.P.; Nader-Maciá, M.E. 2002. Influence of pH, temperature and culture media on growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Appl. Microbiol.; 93:714-724.
- **Juarez Tomás, M.S.**; Wiese, B.; Nader-Maciá, M.E. 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. J. Appl. Microbiol.; 99:1383–1391
- **Kanafani, ZA**; Fowler, VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. ; 24:182-93.
- **Kjos, M.**; Snipen, L.; Salehian, Z.; Nes, I.F.; and Diep, D.B. 2010. The abi proteins and their involvement in bacteriocina self-immunity. J. Bacteriol.; 2068-2076.
- **Koneman** Diagnóstico microbiológico, texto y atlas color; sexta edición. 2006. 12:593-638.
- **Koulenti D**; Koulentia, D; Myrianthefsa, P; Dimopoulosb, G; Baltopouloa, G. 2005. Neumonía nosocomial causada por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Enf. Inf. Microbiol. Clin.; 23(Supl. 3): 37-45.
- **Lamont R.F.**; Sobel J.D.; Akins R.A.; Hassan S.S.; Chaiworapongsa T.; Kusanovic J.P.; Romero R. (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG*.;118:533-549.
- **Lima, E.T.**; Andreatti Filho, R.L.; Okamoto, A.S.; Noujaim, J.C.; Barros, M.R.; Crocci, A.J. 2007. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced



by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canad. J. Vet. Research.*; 7:103–107

- **Liu, X.**; Lagenaur, L.A.; Simpson, D.A.; Essenmacher, K.P.; Frazier-Parker, C.L.; Liu, Y.; Tsai, D.; Rao, S.S.; Hamer, D.H.; Parks, T.P.; Lee, P.; Xu, Q. 2006. Engineered vaginal *Lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor Cyanovirin-N. *Antimicrob. Agent. Chemother.*; 50:3250-3259.
- **Martín, R.**; Soberón, N.; Vanechoutte, M.; Vazquez Camino, F; Suárez, J.E. 2008. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidate. *Span. Soc. Microbiol.*; 11:261-266.
- **Martínez, R.C.R.** and De Martinis, E.C.P. 2005. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* against *Listeria monocytogenes* media growth and hemolytic activity. *Braz. J. Microbiol.*; 36:83-87.
- **Mastromarino P.**; Vitali B.; Sessa R.; Mosca L. 2013. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *News microbiol.*; 36: 229-238.
- **Miller, L.S.**; Cho, J.S. 2011. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat. Rev. Immunol.*; 11: 505–518.
- **Montgomery, C.P.**; Boyle-Vavra, S.; Adem, P.V.; Lee, J.C.; Husain, A.N.; Clasen, J.; Daum, R.S. 2008. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes usa300 and usa400 in a rat model of pneumonia. *J. Infect. Dis.*; 198: 561–570.
- **Moore, P.C.L** and Lindsay, J.A. 2001. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.*; 39:2760-2767.
- **Nagao, J.I.**; Asaduzzaman, S.M.; Okuda, K.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: Insight and foreshigt for new paradigm. *J. Bioschi. Bioeng.*; 201:139-149.
- **Nawrotek P.**; Borkowski J.; Boroń-Kaczmarek A.; Furowicz AJ. The characteristics of staphylococcal enterotoxins produced by strains isolated from



- mastitic cows, including epidemiological aspects. Review. 2005. *Przegl. Epidemiol.*; 59: 891-902.
- **Ocaña, V.S;** Pesce de Ruiz Holgado, A.A.; Nader-Macías, M.E 1999a. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. CERELA, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. *Curr. Microbiol.*; 38: 279-284.
 - **Ocaña, V.S.;** Pesce de Ruiz Holgado, A.A.; Nader-Macías M.E. 1999b. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl. Env. Microbiol.*; 65: 5631-5635.
 - **Oppegard, C.;** Rogne, P.; Emanuelsen, L.; Kristiansen, P.E.; 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.
 - **Ortiz, A.;** Teruel, J. A; Manresa A., Espuny, M. J., Marqués A., Aranda F. J. 2011. Effects of a bacterial trehalose lipid on phosphatidylglycerol membranes. *Bioch. et Biophys. Acta* 1808: 2067–2072.
 - **Parras Huertas, R.A.** 2010. Review. Bacterias Ácido Lácticas: papel fundamental en los alimentos. *Rev. Bio. Agro* Vol.8 n°.1: 45-54.
 - **Pascual, L.M.** 2004. Bacteriocinogenia en el género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
 - **Pascual, L.M.;** Daniele, M.B.; Giordano, W.; Pájaro, M. C.; Barberis, I.L. 2008a. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *C. Microbiol.*; 56:397-402.
 - **Pascual, L.M.;** Daniele, M.B.; Ruiz, F.; Giordano, W.; Pájaro, C.; Barberis, L. 2008b. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potencial probiotic isolated from human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiol.*; 54:141-148.
 - **Pascual, L. M.;** Ruiz, F.; Giordano, W. and Barberis, L. 2010. Vaginal colonization and activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal tract infection. *J. Med. Microbiol.*; 59: 360-364.



- **Pérez-Leonard, H.** 2007. *Lactobacillus* Probióticos: sustancias naturales bioactivas para la prevención de infecciones urogenitales. Rev. Soc. Mex. Biotec. Bioing.; vol. 11- num. 1: 458-462.
- **Ruiz, F.O.;** Gerbaldo, G.; Asurmendi, P.; Pascual, L.M.; Giordano, W.; Barberis, I.L. 2009. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. C. Microbiol.; DOI 10.1007/s00284-009-9465-0.
- **Saïd-Salim, B;** Mathema,B; Braughton, K; Davis, S; Sinsimer, D; Eisner, W. 2005. Differential distribution and expression of Pantón-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol.; 43:3373-3379.
- **Samaniego Fernández, L.M.** and Sosa del Castillo, M. 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Ciudad de Matanzas: Ed. Univ., 1-21 p.
- **Seok Lim;** Seok Lee; Yong Kim, W. 2009. The effect of lactic acid bacteria isolated on the urinary tract pathogens to infants *in vitro*. J. Korean Med. Sci.;1:57-62. DOI:103346/jkms.2009.24.SI.S57.
- **Spurbeck, R.R.** and Grove Arvidson, C. 2008. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell interactions by vaginal *Lactobacillus* species. Infect. Immun.; 76:3124-3130.
- **Strus M.;** Chmiecarczyk A.; Kochan P.; Adamski P.;Chelmickil Z.; Chelmickil A.; Palucha A.; Heczko P.B. 2012. Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*; 163, 210-215.
- **Strus, M.;** Kucharska, A.; Kukla, G.; Brzychczy-Wloch, M.; Maresz, K.; Heczko, P.B. 2005. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. Inf. Diseases Obstet. Gynecol.; 13(2):69–75.



- **Srinivasan S.**; Fredricks D.N. 2008. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008; 750479.
- **van Belkum M.J.**; Martin-Visscher L.A.; Vederas J.C. 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. Review. *Trends Microbiol.*; 19 (8):411-418.
- **Velázquez-Meza ME.** 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx.*; 47: 381-387.
- **Wiedemann, I.**; Bottigger, T.; Bonelli, R.R.; Wiese, A.; Hagge, S.O.; Gutschmann, T.; Seydel, U.; Deegan, L.; Hill, C.; Ross, P.; Sahl, H.G. 2006. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147- a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.*; 61:285-296.
- **Wysocki-Karska, B.**; Bazo, M.; Smoragiewicz, W. 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol. Research*; 165: 674-686.
- **Zárate, G.** and Nader-Macias, M.E. 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letts. Appl. Microbiol.*; 43: 174-180.



8. Anexo estadístico.

Análisis de la varianza

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	Inhibición	90	0,93	0,90	16,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2975,39		29	102,60	27,32 <0,0001
Staphylococcus	2975,39		29	102,60	27,32 <0,0001
Error	225,33	60	3,76		
Total	3200,72		89		

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=6,53094

Error: 3,7556 gl: 60

Staphylococcus Medias n

Staphylococcus	Medias	n								
1	4,67	3	A							
3	6,00	3	A	B						
7	6,00	3	A	B						
10	6,00	3	A	B						
13	6,33	3	A	B	C					
2	7,00	3	A	B	C	D				
5	7,00	3	A	B	C	D				
14	7,33	3	A	B	C	D				
9	7,67	3	A	B	C	D				
28	8,33	3	A	B	C	D				
30	8,67	3	A	B	C	D				
4	9,00	3	A	B	C	D				
18	9,00	3	A	B	C	D				
27	9,33	3	A	B	C	D				
8	9,33	3	A	B	C	D				
16	9,67	3	A	B	C	D				
19	10,00	3	A	B	C	D				
22	10,00	3	A	B	C	D				
21	12,00	3		B	C	D	E			
29	12,67	3			C	D	E			
25	13,33	3				D	E	F		
6	13,33	3				D	E	F		
11	18,00	3					E	F	G	
15	19,33	3						F	G	
20	19,67	3						F	G	
24	20,00	3						F	G	
12	20,67	3							G	
17	21,67	3							G	
23	22,00	3							G	
26	24,33	3							G	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	Inhibición	90	0,98	0,97	17,89



Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3576,99		29	123,34	95,70 <0,0001
Staphylococcus	3576,99		29	123,34	95,70 <0,0001
Error	77,33	60	1,29		
Total	3654,32		89		

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=3,82601

Error: 1,2889 gl: 60

StaphylococcusMedias n

	Medias	n							
4	0,00	3	A						
3	0,00	3	A						
1	0,00	3	A						
2	0,00	3	A						
23	0,00	3	A						
21	0,00	3	A						
20	0,00	3	A						
5	0,00	3	A						
6	0,00	3	A						
7	0,00	3	A						
13	3,33	3	A	B					
16	3,33	3	A	B					
8	4,00	3		B					
22	5,00	3		B					
11	5,00	3		B					
27	5,67	3		B					
14	6,00	3		B	C				
10	6,33	3		B	C	D			
19	6,33	3		B	C	D			
9	6,67	3		B	C	D			
28	7,00	3		B	C	D			
18	9,67	3			C	D			
25	10,00	3				D	E		
29	10,00	3				D	E		
30	13,67	3					E	F	
24	15,00	3						F	
15	16,00	3						F	G
26	16,33	3						F	G
12	19,67	3							G
17	21,33	3							H

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	Inhibición	90	0,95	0,93	14,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3009,96		29	103,79	42,85 <0,0001
Staphylococcus	3009,96		29	103,79	42,85 <0,0001
Error	145,33	60	2,42		
Total	3155,29		89		



Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=5,24500

Error: 2,4222 gl: 60

Staphylococcus	Medias	n	
28	0,00	3	A
25	2,67	3	A B
21	3,00	3	A B
30	3,33	3	A B C
29	4,67	3	A B C D
2	7,00	3	B C D E
5	7,00	3	B C D E
10	7,67	3	B C D E F
9	7,67	3	B C D E F
7	7,67	3	B C D E F
1	8,33	3	C D E F G
4	8,67	3	D E F G
3	9,00	3	D E F G
11	9,33	3	D E F G H
13	9,67	3	D E F G H I
8	10,00	3	E F G H I
19	10,00	3	E F G H I
18	10,67	3	E F G H I J
14	10,67	3	E F G H I J
16	12,33	3	F G H I J K
22	13,33	3	G H I J K
6	14,33	3	H I J K
27	14,67	3	I J K
20	15,33	3	J K L
15	16,33	3	K L M
17	20,00	3	L M N
12	20,33	3	L M N
23	20,67	3	M N
26	21,00	3	M N
24	22,00	3	N

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	Inhibición	90	0,98	0,97	17,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4322,49	29	149,05	93,81	<0,0001
Staphylococcus	4322,49	29	149,05	93,81	<0,0001
Error	95,33	60	1,59		
Total	4417,82	89			



Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=4,24801

Error: 1,5889 gl: 60

StaphylococcusMedias n

4	0,00	3	A
2	0,00	3	A
21	0,00	3	A
20	0,00	3	A
7	0,00	3	A
5	0,00	3	A
15	0,00	3	A
1	1,67	3	A B
3	2,00	3	A B C
11	2,00	3	A B C
10	3,00	3	A B C D
8	4,00	3	A B C D
9	4,33	3	B C D E
19	4,67	3	B C D E
25	5,00	3	B C D E
13	5,67	3	B C D E F
30	5,67	3	B C D E F
6	6,00	3	C D E F G
28	6,33	3	D E F G
14	8,33	3	E F G H
18	9,33	3	F G H
22	10,00	3	G H
27	10,67	3	H I
16	11,00	3	H I
24	14,67	3	I J
23	17,33	3	J K
29	19,67	3	K L
26	19,67	3	K L
12	21,00	3	K L
17	22,67	3	L

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5	Inhibición	90	0,99	0,99	18,93

Rafael H. Quadrelli



Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3872,72		29	133,54	203,71 <0,0001
Staphylococcus	3872,72		29	133,54	203,71 <0,0001
Error	39,33	60	0,66		
Total	3912,06		89		

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=2,72862

Error: 0,6556 gl: 60

StaphylococcusMedias n

Medias n	SC	gl	CM	F	p-valor				
4	0,00	3	A						
3	0,00	3	A						
1	0,00	3	A						
2	0,00	3	A						
11	0,00	3	A						
10	0,00	3	A						
20	0,00	3	A						
18	0,00	3	A						
28	0,00	3	A						
5	0,00	3	A						
27	0,00	3	A						
7	0,00	3	A						
9	0,00	3	A						
8	0,00	3	A						
16	0,00	3	A						
13	0,00	3	A						
14	0,00	3	A						
25	2,67	3	A	B					
30	2,67	3	A	B					
21	3,33	3		B	C				
29	4,67	3		B	C				
6	5,67	3			C	D			
24	6,00	3			C	D			
19	8,33	3				D	E		
26	9,67	3					E		
15	10,00	3					E		
22	13,33	3						F	
23	19,33	3							G
17	21,33	3							G
12	21,33	3							G

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
6	Inhibición	90	0,97	0,95	16,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2210,46		29	76,22	62,94 <0,0001
Staphylococcus	2210,46		29	76,22	62,94 <0,0001
Error	72,67	60	1,21		
Total	2283,12		89		



Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=3,70878

Error: 1,2111 gl: 60

StaphylococcusMedias n

30	0,00	3	A																	
29	0,00	3	A																	
7	0,00	3	A																	
11	2,33	3	A	B																
13	2,67	3	A	B																
9	3,00	3	A	B	C															
21	3,33	3	A	B	C	D														
1	3,67	3	A	B	C	D														
5	3,67	3	A	B	C	D														
22	4,33	3		B	C	D														
4	4,33	3		B	C	D														
6	4,33	3		B	C	D														
28	4,67	3		B	C	D	E													
8	5,00	3		B	C	D	E	F												
23	5,67	3		B	C	D	E	F												
10	6,00	3		B	C	D	E	F												
19	6,67	3			C	D	E	F	G											
14	7,00	3				D	E	F	G	H										
3	8,33	3					E	F	G	H	I									
2	8,33	3					E	F	G	H	I									
27	8,33	3					E	F	G	H	I									
25	8,33	3					E	F	G	H	I									
26	8,67	3						F	G	H	I									
24	10,33	3							G	H	I									

Rafael H. Quadrelli



20	10,67	3				H	I
18	11,33	3					I
15	11,67	3					I
16	12,00	3					I
12	20,33	3					J
17	20,67	3					J

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
7	Inhibición	90	0,98	0,97	11,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4739,96	29	163,45	114,03	<0,0001
Staphylococcus	4739,96	29	163,45	114,03	<0,0001
Error	86,00	60	1,43		
Total	4825,96	89			

Test: Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=4,04264

Error: 1,4333 gl: 60

Staphylococcus Medias n

Medias	n	Letter
30	0,00	3 A
7	0,00	3 A
29	0,00	3 A
11	2,33	3 A B
9	3,00	3 A B
4	4,33	3 B C
13	4,33	3 B C
6	4,33	3 B C
5	4,33	3 B C
21	4,33	3 B C
28	4,67	3 B C
22	5,00	3 B C
8	5,00	3 B C
10	5,33	3 B C
23	6,33	3 B C D
27	8,00	3 C D D
1	10,33	3 D E
15	13,00	3 E F
2	13,00	4 E F F
14	13,00	3 E F F
3	14,00	2 E F F
16	15,00	3 F
25	19,67	3 G
19	19,67	3 G
26	20,00	3 G
24	20,00	3 G

Rafael H. Quadrelli



12	20,33	3	G
20	20,33	3	G
17	20,33	3	G
18	21,00	3	G

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	Inhibición	90	0,96	0,94	7,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2032,06		29	70,07	52,12 <0,0001
Staphylococcus	2032,06		29	70,07	52,12 <0,0001
Error	80,67	60	1,34		
Total	2112,72		89		

Test: Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=3,90760

Error: 1,3444 gl: 60

Staphylococcus Medias n

Medias	n	Significance Letters
21	6,33 3	A
29	8,00 3	A B
22	8,00 3	A B
28	9,00 3	A B C
20	10,00 3	A B C D
13	10,33 3	B C D
30	12,33 3	C D E
27	12,67 3	C D E
23	12,67 3	C D E
7	13,00 3	D E
26	13,67 3	D E
25	14,67 3	E
8	14,67 3	E
19	15,33 3	E F
10	16,00 3	E F
24	19,00 3	F G
11	20,00 3	G
14	20,00 3	G
4	20,00 3	G
5	20,33 3	G
15	20,33 3	G
3	20,33 3	G
18	20,33 3	G
1	20,33 3	G
6	20,67 3	G
12	20,67 3	G
9	20,67 3	G
2	20,67 3	G
16	20,67 3	G
17	21,00 3	G

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)



BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
9	Inhibición	90	0,42	0,13	7,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	109,96	29	3,79	1,47	0,1038
Staphylococcus	109,96	29	3,79	1,47	0,1038
Error	154,67	60	2,58		
Total	264,62	89			

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=5,41080

Error: 2,5778 gl: 60

StaphylococcusMedias n

	Medias	n	
2	19,67	3	A
8	20,00	3	A
7	20,00	3	A
27	20,00	3	A
26	20,00	3	A
25	20,33	3	A
12	20,33	3	A
13	20,33	3	A
3	20,33	3	A
6	20,33	3	A
16	20,67	3	A
5	20,67	3	A
1	20,67	3	A
19	21,00	3	A
29	21,00	3	A
24	21,00	3	A
14	21,00	3	A
9	21,33	3	A
18	21,33	3	A
4	21,33	3	A
30	21,33	3	A
17	21,67	3	A
11	22,33	3	A
28	22,33	3	A
10	22,67	3	A
15	23,00	3	A
21	23,00	3	A
23	23,00	3	A
20	23,33	3	A
22	23,33	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)



BAL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
10	Inhibición	90	0,97	0,95	12,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2196,49		29	75,74	61,97 <0,0001
Staphylococcus	2196,49		29	75,74	61,97 <0,0001
Error	73,33	60	1,22		
Total	2269,82		89		

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=3,72575

Error: 1,2222 gl: 60

StaphylococcusMedias n

1	3,33	3	A							
18	4,33	3	A	B						
21	4,33	3	A	B						
3	4,67	3	A	B	C					
19	4,67	3	A	B	C					
2	5,33	3	A	B	C	D				
22	5,33	3	A	B	C	D				
30	5,67	3	A	B	C	D				
9	5,67	3	A	B	C	D				
7	6,00	3	A	B	C	D				
14	6,00	3	A	B	C	D				
24	6,00	3	A	B	C	D				
29	7,00	3	A	B	C	D	E			
6	7,33	3		B	C	D	E			
25	7,67	3		B	C	D	E	F		
16	8,00	3		B	C	D	E	F		
10	8,00	3		B	C	D	E	F		
26	8,33	3			C	D	E	F		
15	8,33	3			C	D	E	F		
5	8,33	3			C	D	E	F		
28	8,67	3				D	E	F		
4	8,67	3				D	E	F		
11	10,00	3					E	F		
27	10,33	3					E	F		
23	10,33	3					E	F		
8	11,33	3						F		
20	20,33	3							G	
17	20,33	3							G	
12	20,33	3							G	
13	20,67	3							G	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)



Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=2,69982

Error: 41,2140 gl: 445

BAL	Medias	n			
5	4,28	90	A		
2	6,34	90	A	B	
4	7,16	90		B	
3	10,91	90			C
1	11,94	90			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Prod. peróxido	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	Inhibición	450	0,52	0,51	40,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12637,35	4	3159,34	119,59	<0,0001
BAL	12637,35	4	3159,34	119,59	<0,0001
Error	11756,24	445	26,42		
Total	24393,59	449			

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=2,16156

Error: 26,4185 gl: 445

BAL	Medias	n			
6	6,86	90	A		
10	8,84	90	A	B	
7	10,02	90		B	
8	16,06	90			C
9	21,24	90			D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inhibición	900	0,09	0,09	69,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4511,36	1	4511,36	87,22	<0,0001
Prod. peróxido	4511,36	1	4511,36	87,22	<0,0001
Error	46447,37	898	51,72		
Total	50958,73	899			

Test:Bonferroni Alfa:=0,05 DMS:=0,94099

Error: 51,7231 gl: 898

Prod. peróxido	Medias	n		
0	8,13	450	A	
1	12,60	450		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)



INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO ESTADÍSTICO