



*Inhibición de la formación de  
biofilm de  
Streptococcus agalactiae por  
lactobacilos probióticos*

Trabajo Final de Grado

Maria M. Nardi

Directora: Dra. Liliana Pascual

Codirectora: Dra. Lucila Barberis

15 de agosto de 2013

Río Cuarto, Córdoba

El presente trabajo fue realizado en la Cátedra de Bacteriología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requerimiento para optar por el título de Microbiólogo.

Directora: Dra. Liliana Myriam Pascual

Codirectora: Dra. Isabel Lucila Barberis

Miembros del jurado: Dra. Liliana Myriam Pascual

Dra. Cecilia Farnochi

Dra. Carla Barberis

Río Cuarto, 15 de agosto de 2013

---

## AGRADECIMIENTOS:

Gracias Dios mío por regalarme la vida y todas las cosas bellas que la acompañan. Gracias por cuidarme y acompañarme siempre.

Gracias mami por darme de vos siempre lo mejor: tu mejor consejo, tu mejor sonrisa, tus mejores valores. Gracias por estar a mi lado, por interesarte en saber más de microbiología, por aprenderte los nombres de las materias y por rezar siempre que iba a rendir.

Gracias amor mío por aguantarme y por intentar comprender un poquito de todas esas cosas raras que te conté. Gracias por soñar conmigo. Gracias por darme fuerzas y acompañarme siempre.

Gracias Laurita por mostrarme siempre que las espinas pueden tener flores y por enseñarme a ser optimista y pensar positivamente.

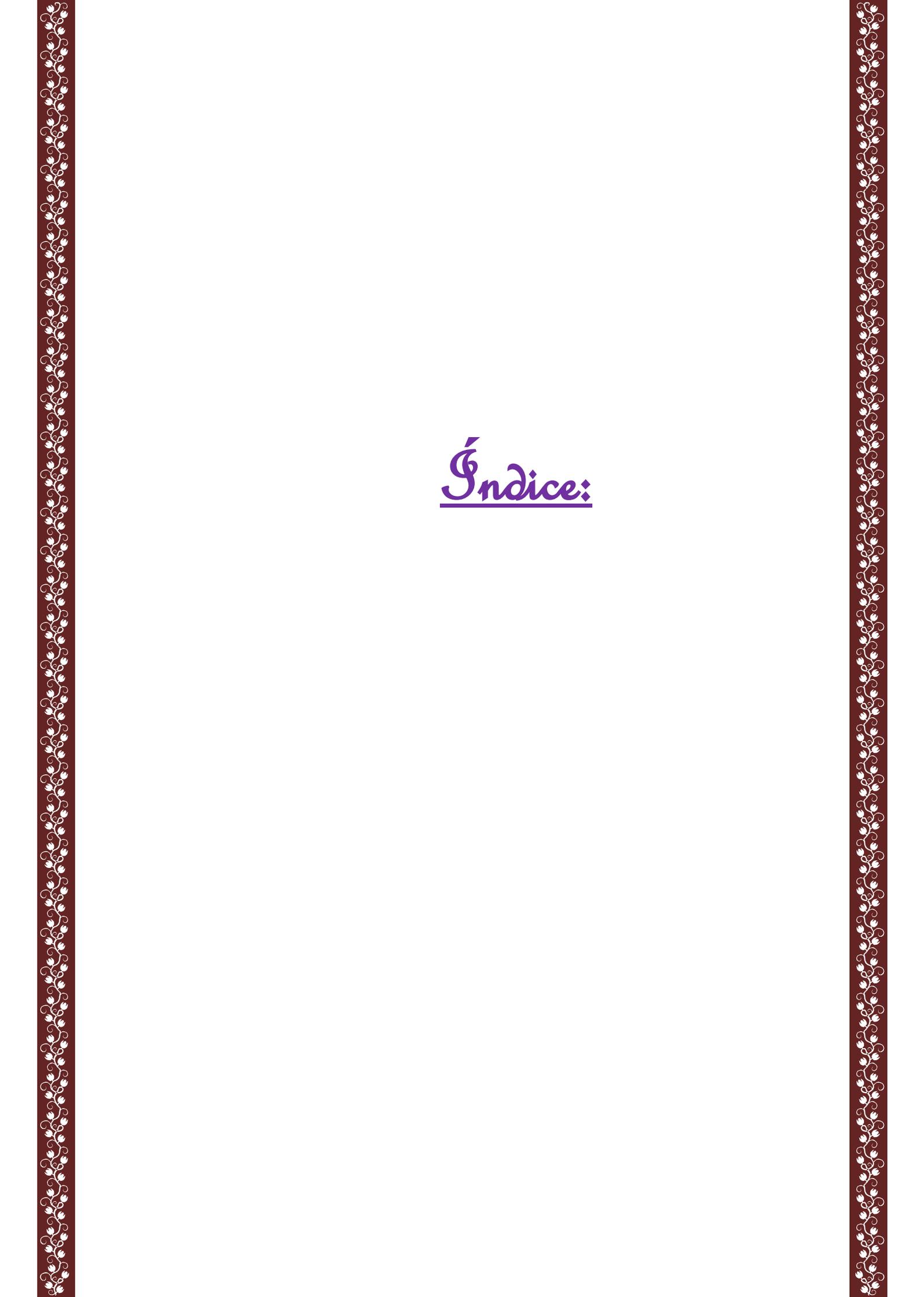
Gracias Mariana por contagiarme esa fuerza que tenés, capaz de afrontar cualquier dificultad, sin importar lo que sea y seguir siempre para adelante.

Gracias Rocío por darme un ejemplo a seguir de perseverancia, de nunca rendirse y esforzarse al máximo para conseguir lo que quieras.

Gracias chicas por haberme dado la oportunidad de conocerlas, por haber compartido una parte importante de mi vida. Aprendí muchas cosas de ustedes y no quiero perderlas nunca. Prometan que nunca jamás vamos a dejar de estar en contacto.

Gracias Dras. Liliana y Lucila por darme un lugar en el laboratorio y por todas las cosas que me enseñaron. Gracias por compartir su experiencia conmigo. Gracias Paula, Jose y Francisco por responder siempre mis dudas y darme una mano cada vez que lo necesité.

Gracias a la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme todo lo necesario durante estos cinco años para poder cursar la carrera. Gracias a todos los profesores de la carrera de Microbiología por sus enseñanzas y por su paciencia.



# Índice:

## ÍNDICE:

	Página:
Resumen	iv
<b><u>1. Introducción</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>1.1. Características generales de <i>Streptococcus agalactiae</i></u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1.2. Factores involucrados en la formación de biofilm y adhesión celular	2
1.1.3. Enfermedades causadas por <i>S. agalactiae</i>	3
1.1.3.1. Enfermedades invasivas en adultos	3
1.1.3.2. Enfermedades neonatales	4
<b><u>1.2. Generalidades de los biofilms bacterianos</u></b>	<b><u>6</u></b>
1.2.1. Comunicación intercelular	8
1.2.2. Resistencia debida al biofilm	9
<b><u>1.3. Generalidades de los probióticos</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>1.4. Generalidades del género <i>Lactobacillus</i></u></b>	<b><u>11</u></b>
1.4.1. Sustancias producidas por lactobacilos	12
1.4.1.1. Bacteriocinas	12
1.4.1.2. Biosurfactantes	13
1.4.1.3. Peróxido de hidrógeno	15
1.4.1.4. Ácidos orgánicos	15
<b><u>2. Hipótesis</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>3. Objetivos</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b><u>4. Materiales y métodos</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>4.1. Cepas bacterianas</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>4.2. Producción de biofilm de <i>Streptococcus agalactiae</i></u></b>	<b><u>21</u></b>

<b>4.3. Obtención de sobrenadante libre de células de lactobacilos</b>	<b>21</b>
<b>4.4. Producción de biofilm de <i>S. agalactiae</i> tratado con SLC de lactobacilos neutralizado y sin neutralizar</b>	<b>22</b>
<b>4.5. Análisis estadístico</b>	<b>22</b>
<b>4.6. Composición de los medios de cultivo</b>	<b>23</b>
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Producción de biofilm de SGB</b>	<b>26</b>
<b>5.1.1. Inhibición de la producción de biofilm de <i>S. agalactiae</i> empleando sobrenadante libre de células de <i>L. fermentum</i> cepa L23 neutralizado y sin neutralizar</b>	<b>30</b>
<b>5.1.2. Inhibición de la producción de biofilm de <i>S. agalactiae</i> empleando sobrenadante libre de células de <i>L. rhamnosus</i> cepa L60 neutralizado y sin neutralizar</b>	<b>37</b>
<b>5.1.3. Inhibición de la producción de biofilm de <i>S. agalactiae</i> tratado con SLC de ambos lactobacilos</b>	<b>41</b>
<b>6. Conclusiones:</b>	<b>45</b>
<b>Conclusión general:</b>	<b>46</b>
<b>7. Bibliografía:</b>	<b>47</b>
<b>8. Anexo estadístico:</b>	<b>55</b>

# Resumen:

## Resumen:

*Streptococcus agalactiae* (Streptococcus Grupo B, SGB) es un patógeno Gram positivo que causa severas infecciones neonatales invasivas, como neumonía, meningitis y septicemia. Sin embargo *S. agalactiae* es un colonizador oportunista que se encuentra en el tracto gastrointestinal y genitourinario del 30% de las personas sanas. *S. agalactiae* es capaz de formar biofilm sobre distintas superficies, propiedad que está relacionada a la presencia de distintas estructuras, como pilis y proteínas en la superficie celular. La formación de biofilm ha sido reconocida como un importante factor de virulencia que permite la colonización del ambiente vaginal por parte de *S. agalactiae*. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son consumidos en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico a la salud. Los lactobacilos son microorganismos probióticos generalmente reconocidos como seguros para el consumo humano y se ha demostrado su capacidad de producir distintos efectos benéficos a la salud. En la vagina humana son los principales colonizadores y contribuyen a mantener la salud y evitar infecciones. En el presente trabajo se investigó la capacidad de inhibición de la formación de biofilm de *S. agalactiae* por *L. fermentum* y *L. rhamnosus* utilizando las distintas fracciones del sobrenadante libre de células. Ambas cepas de lactobacilos fueron capaces de inhibir la formación de biofilm de todas las cepas de *S. agalactiae* por la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. La producción promedio de biofilm de *S. agalactiae* mostró una reducción estadísticamente significativa al tratar el cultivo con ambas fracciones del SLC de L23 y L60. Los resultados presentados en el presente trabajo sugieren que *L. rhamnosus* y *L. fermentum* inhiben la formación de biofilm de *S. agalactiae* *in vitro*.



# Introducción:

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Características generales de *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* es un coco Gram positivo, capsulado, perteneciente al grupo B de Lancefield, que presenta actividad  $\beta$  hemolítica en agar sangre de carnero. Debido a dicha característica, este microorganismo también es conocido como estreptococo  $\beta$  hemolítico del grupo B o *Streptococcus* Grupo B (SGB). *S. agalactiae* fue primeramente reconocido como un microorganismo patógeno, causante de mastitis en animales, de donde deriva su nombre. Luego en 1935, a partir del trabajo de Fry, quien reportó tres casos fatales de sepsis puerperal resaltando su infrecuencia, fue reconocido como patógeno humano (Lancefield, 1932; Fry, 1938; Olson y col., 2002; Lindahl y col., 2005; Melchior y col., 2006; Rodríguez Fernández y col., 2008; Rinaudo y col., 2010).

La cápsula de polisacáridos de *S. agalactiae* es un importante factor de virulencia que impide la fagocitosis por parte de las células del sistema inmune y es de gran interés para el desarrollo de vacunas, ya que se ha visto que los anticuerpos contra el polisacárido capsular protegen de la infección a ratones. Se diferenciaron diez serotipos de *S. agalactiae* basados en las reacciones antigénicas del polisacárido capsular: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX. Los serotipos Ia, Ib, II, III y V son los principales responsables de las enfermedades neonatales, mientras que, sólo el serotipo V es el principal causante de enfermedades invasivas en adultos (Farley, 2001; Lindahl y col., 2005; Dramsi y col., 2012; Ho y col., 2012).

La formación de biofilm tiene un papel importante en la patogenicidad de *S. agalactiae*. Debido a que el microorganismo no crece a pH menor a 4.5, el pH normal de la vagina, dentro del biofilm se formaría un microambiente que permitiría la supervivencia de *S. agalactiae* y la colonización del epitelio vaginal, aunque la pérdida de lactobacilos y el consecuente aumento del pH vaginal también contribuirían a la colonización de este microorganismo. Se ha comprobado que SGB puede formar biofilms en dispositivos intrauterinos junto con otras especies bacterianas y, en microplacas en ensayos de laboratorio. También ha sido demostrada su capacidad de adhesión a células vaginales y otras líneas celulares *in vitro* (Donlan y Costerton, 2002; Zárate y Nader-Macias, 2006; Kaur y col., 2009; Konto-Ghiorghi y col., 2009; Rinaudo y col., 2010; Borges y col., 2012; Yang y col., 2012).

### 1.1.2. Factores involucrados en la formación de biofilm y adhesión celular

La formación de biofilm y la capacidad de adhesión a las células humanas son características muy importantes involucradas en la patogénesis de *S. agalactiae*. Dichas propiedades están relacionadas con diversas estructuras presentes en la superficie celular, como son los pilis y las proteínas de superficie.

Se han identificado tres tipos de pili presentes en *S. agalactiae* (pili tipo 1, pili tipo 2a y pili tipo 2b) y cada cepa expresa uno o dos tipos en su superficie. Estas estructuras se han relacionado a la adhesión al epitelio humano, la adhesión e invasión de las células endoteliales de los capilares cerebrales y la promoción de la migración transepitelial. Sin embargo, la formación de biofilm de SGB se ha relacionado a la presencia de pili tipo 2a. Éstos, tienen una proteína accesoria en su extremo, PilA, que permite la adhesión de *S. agalactiae* a las células del epitelio vaginal y está involucrada en la adhesión a células del endotelio de los capilares cerebrales. Además, PilA contiene un dominio homólogo al Factor de Von Willebrand tipo A que se une específicamente al colágeno de los vasos sanguíneos durante la agregación plaquetaria. Se demostró que el dominio homólogo al factor de Von Willebrand es esencial para las propiedades adhesivas de PilA a las células epiteliales, pero no para la adhesión a superficies inertes (Konto-Ghiorghi y col., 2009; Rinaudo y col., 2010; Tazi y col., 2011; Dramsi y col., 2012; Ho y col., 2012).

En cuanto a las proteínas de superficie, éstas son variadas y cumplen con diversos roles. La proteína Lmb es una lipoproteína de la superficie celular expresada por la mayoría de las cepas de *S. agalactiae*. Existe evidencia que demuestra que esta proteína es capaz de unirse a la laminina y participar en la adhesión y/o invasión del epitelio dañado. Como está presente en la superficie celular de todas las cepas, es de interés para el desarrollo de vacunas (Lindahl y col., 2005). Otra proteína, denominada Srr-1, se encuentra en la mayoría de las cepas pertenecientes a los serotipos Ia, Ib, V y algunas cepas serotipo III. Esta proteína es extensamente modificada de forma postraduccional por medio de la glicosilación y se ha demostrado que interfiere en la adhesión e invasión celular por interactuar con keratina 4, un componente del citoesqueleto de las células epiteliales humanas. Se ha demostrado que Srr-1 contribuye a atravesar la barrera hematoencefálica en infecciones producidas en modelos animales (Sheen y col., 2011; Tazi y col., 2011). La enzima C5a peptidasa es una serín proteasa localizada en la superficie celular, cuya función principal es clivar el C5a producido durante la activación del complemento e inhibir el reclutamiento de neutrófilos. Se ha demostrado que puede unirse a la fibronectina y promover la

invasión bacteriana a las células epiteliales. Además, los genes que codifican la C5a peptidasa han sido encontrados en todos los aislamientos de origen humano, pero en muy pocos aislamientos de origen bovino (Lindahl y col., 2005).

*S. agalactiae* no solo es capaz de adherirse a distintas células humanas, sino que también es capaz de invadir células epiteliales, endoteliales e incluso macrófagos en cultivos celulares *in vitro* y el microorganismo podría también sobrevivir en el interior de dichas células. Sin embargo, *S. agalactiae* no ha sido reconocido como un patógeno intracelular, ya que sólo puede sobrevivir intracelularmente en ciertos estados de la infección y existe muy poca evidencia de su capacidad de replicación intracelular, a diferencia de *Listeria monocytogenes* la cual es un reconocido patógeno intracelular (Lindahl y col., 2005; Sheen y col., 2011).

### 1.1.3. Enfermedades causadas por *S. agalactiae*

#### 1.1.3.1. Enfermedades invasivas en adultos

Se ha visto que SGB puede afectar a adultos no gestantes con enfermedades de base como diabetes mellitus, cirrosis, cáncer de mama, radioterapia y úlceras decúbito. También se observó que la incidencia de enfermedades invasivas por *S. agalactiae* es mayor en ancianos, principalmente en residentes de geriátricos, y aquellos postrados en camas o sillas de ruedas. Las manifestaciones clínicas frecuentemente reportadas son muy variadas y, debido a que *S. agalactiae* puede colonizar la piel y las mucosas, ha sido aislado de sitios infectados junto con otros microorganismos cuestionando su rol en la patogénesis. Sin embargo, su aislamiento de sitios normalmente estériles confirmó que *S. agalactiae* era el agente etiológico de muchos síndromes clínicos.

Infecciones de la piel y tejidos blandos: son los síndromes clínicos más reportados. Se presentan como celulitis, úlceras, infecciones de heridas y quemaduras e infecciones de úlceras en los pies (principalmente en pacientes diabéticos), que pueden complicarse con osteomielitis.

Infecciones de huesos y articulaciones: osteomielitis y artritis séptica son las manifestaciones más frecuentes. El microorganismo generalmente procede de un foco infeccioso cercano.

Neumonía: ocurre principalmente en ancianos con daños neurológicos, demencia o senilidad.

Infecciones urinarias: se observa en ancianos residentes en geriátricos y personas con enfermedades prostáticas.

Meningitis: es la manifestación más rara pero la más importante en mujeres después del parto, ancianos y adultos jóvenes con enfermedades de base. La bacteriemia se observa en el 80% de los casos.

Endocarditis: ocurre en adultos con un promedio de edad de 50 años, no necesariamente con daños cardíacos anteriores. Puede complicarse con pericarditis, miocarditis y aneurisma micótico.

Otras manifestaciones clínicas: bacteriemia sin foco séptico evidente, infecciones relacionadas a catéteres, síndrome de shock tóxico, fascitis necrotizante (Farley, 2001; Camisassa y Fando, 2011).

#### 1.1.3.2. Enfermedades neonatales

*S. agalactiae* ha merecido mucha atención por su asociación con enfermedades neonatales. SGB es principalmente un microorganismo colonizador asintomático del tracto gastrointestinal humano y la vagina de mujeres sanas. Las tasas de colonización varían en los diferentes grupos étnicos, área geográfica y edad. En nuestro país dicha tasa varía entre 1.4% y 11.65%. Generalmente, *S. agalactiae* coloniza la vagina junto con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias aeróbicas cuando los lactobacilos son escasos o ausentes, condición que ha sido nombrada por algunos autores como vaginitis aeróbica. La denominación de vaginitis viene dada por la respuesta inflamatoria observada, lo que marca la diferencia con la vaginosis bacteriana. En los casos de vaginitis aeróbica se observó una elevada producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. La producción de IL-1 $\beta$  está inversamente asociada con el número de lactobacilos presentes, mientras que IL-6 e IL-8 se relacionaron a efectos adversos en el embarazo. De esta forma, la presencia de vaginitis aeróbica y la respuesta inflamatoria que se desarrolla, es un factor de riesgo para el parto pretérmino (Barcaite y col., 2011; Camisassa y Fando, 2011; Donders y col., 2011).

Por su ubicación estratégica en el canal de parto, este microorganismo puede ser transferido de la madre a su hijo durante el nacimiento. Sin embargo, *S. agalactiae* puede ascender por la vagina y alcanzar el cérvix, desde donde puede atravesar las membranas intactas y multiplicarse en el líquido amniótico. A continuación, el microorganismo puede colonizar el tracto respiratorio del feto o la colonización del

---

líquido amniótico puede llevar al parto pretérmino y/o muerte fetal (Sad Larcher y col., 2005; Lindahl y col., 2005; Ruíz y col., 2011; Sheen y col., 2011).

En los neonatos se presentan dos formas de la enfermedad por *S. agalactiae*: la enfermedad neonatal temprana y la enfermedad neonatal tardía. En la mayoría de los neonatos se presenta la forma temprana, dentro de los primeros 7 días de vida, adquiriéndose el microorganismo por inhalación de líquido amniótico o secreciones vaginales contaminadas con SGB. Los pulmones son el portal de entrada de *S. agalactiae* al organismo, debido a que los mecanismos de defensa innatos de los recién nacidos no están tan desarrollados como en los adultos o niños mayores. Primeramente se desarrolla neumonía y luego la bacteria puede alcanzar el torrente sanguíneo originando septicemia, meningitis y osteomielitis. Los serotipos más frecuentemente aislados son la, III y V (Farley, 2001; Lindahl y col., 2005; Konto-Ghiorghi y col., 2009; Dramsi y col., 2012).

La enfermedad neonatal tardía es menos frecuente, pero se está volviendo paulatinamente más importante dado que su incidencia no ha declinado con la implementación de la profilaxis antibiótica intraparto. La enfermedad se desarrolla entre 8 días y 3 meses luego del nacimiento y se presenta como meningitis y septicemia sin un foco de infección, siendo adquirida por transmisión vertical de la madre o por el personal de enfermería al recién nacido y la vía de entrada es comúnmente el intestino. Los serotipos asociados a la enfermedad neonatal tardía son los serotipos III y V (Lindahl y col., 2005; Sheen y col., 2011; Tazi y col., 2011).

Un importante aspecto de la enfermedad neonatal es la presencia de secuelas en los sobrevivientes. Más del 50% de los pacientes presenta pérdida de audición, ceguera y problemas de aprendizaje. Debido a estas secuelas, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta recomienda la búsqueda de *S. agalactiae* en todas las mujeres embarazadas entre las semanas 35 y 37 de gestación. En nuestro país, desde la implementación de la Ley Nacional N° 26.369 en el año 2008, se realiza la búsqueda rutinaria de este microorganismo y, en caso de madres colonizadas, se aplica profilaxis intraparto con penicilina o ampicilina (Lindahl y col., 2005; Rodríguez Fernández y col., 2008; Camisassa y Fando, 2011; Tazi y col., 2011).

## 1.2. Generalidades de los biofilms bacterianos

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando comunidades complejas conocidas como biofilms. Los biofilms bacterianos consisten en densos grupos de células adheridas a una superficie inerte o tejido vivo, que crecen embebidas en una matriz extracelular formada por carbohidratos, exopolisacáridos, proteínas y ADN. Las células dentro del biofilm son muy diferentes de aquellas que crecen de forma platótica, ya que muestran un fenotipo alterado en relación a la expresión genética y la tasa de crecimiento (Watnik y Kolter, 2000; Donlan y Costerton, 2002; Olson y col., 2002; Stoodley y col., 2002; Cvitkovitch y col., 2003; Melchior y col., 2006; Kaur y col., 2009; Arif, 2010; Rinaudo y col., 2010; Li y Tian, 2012).

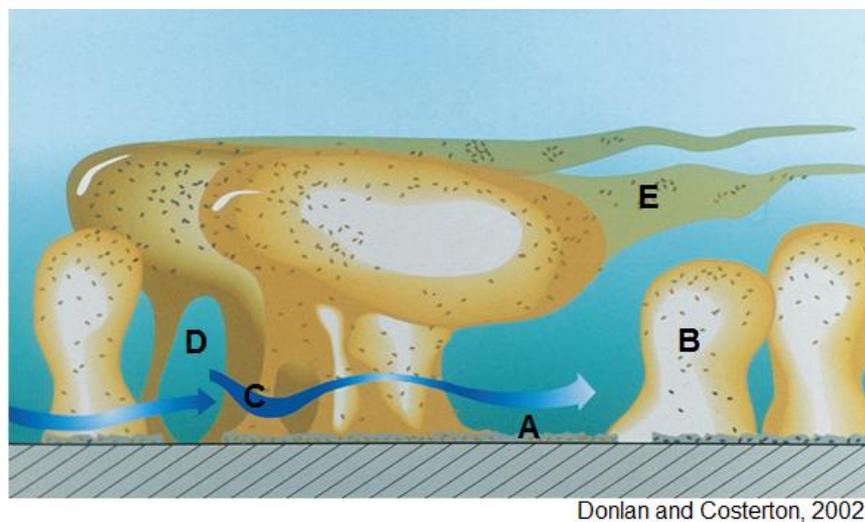
Los biofilms son un problema importante para la salud humana, particularmente aquellos biofilms que se encuentran asociados a superficies inertes, incluyendo dispositivos médicos de uso interno o externo. El CDC estima que el 65% de las infecciones humanas involucra la formación de algún tipo de biofilm (Rinaudo y col., 2010; Bordi y de Bentzman, 2011).

Los biofilms se forman gradualmente a través del tiempo, en un proceso que se lleva a cabo en etapas sucesivas coordinadas por comunicación intercelular:

- I. Primero las bacterias se acercan a una superficie moviéndose lentamente y establecen una asociación transitoria con ella o con otras bacterias. Durante esta etapa las células son capaces de moverse independiente por medio de los pili y pueden abandonar la superficie. La asociación transitoria es mantenida por adhesinas asociadas a la pared celular e interacciones inespecíficas, como fuerzas de van der Waals, interacción ácido-base y atracción electrostática.
- II. Luego esta asociación se vuelve más fuerte por la participación de adhesinas y pili o fimbrias localizadas en la superficie bacteriana. En esta etapa se observan cambios en el patrón de expresión genética. Los genes relacionados a la producción de exopolisacáridos son sobreexpresados y los vinculados a los pili son silenciados. De esta manera, las células quedan rodeadas por la matriz extracelular y ancladas a la superficie. La matriz provee soporte y contribuye a la resistencia del biofilm a los antimicrobianos.
- III. En una tercera etapa, el biofilm madura y comienzan a formarse microcolonias. Los biofilms poseen una estructura tridimensional. Las células no se disponen formando capas superpuestas, sino que crecen formando microcolonias o agrupaciones celulares, se extienden formando torres gomosas y se mueven

con la corriente del fluido que las rodea. Para llevar nutrientes a todas las células dentro del biofilm y eliminar sus desechos, existen canales libres por los que se mantiene el flujo constante de líquido. Las células cercanas a estos canales coordinan la producción de exopolisacáridos, de manera de no obstruir la luz del canal. También existen dentro de la masa del biofilm espacios vacíos, carentes de células. Todo esto demuestra el grado de complejidad estructural que posee un biofilm bacteriano.

- IV. En la cuarta etapa las microcolonias o células individuales pueden desprenderse de la matriz para comenzar el proceso nuevamente (figura 1). Esta etapa esencial en el desarrollo del biofilm contribuye a la dispersión biológica, la supervivencia celular y la transmisión de enfermedades. La separación del biofilm puede dividirse en dos grandes categorías: separación activa (iniciada por las mismas células) y pasiva (separación por fuerzas externas, como abrasión o intervención humana) (Watnik y Kolter, 2000; Donlan y Costerton, 2002; Stoodley y col., 2002; Melchior y col., 2006; Kaplan, 2010).



**Figura 1:** Esquema de la estructura de un biofilm.

Referencias: **A:** células asociadas transitoriamente con la superficie, **B:** microcolonia, **C:** corriente de fluido rodeando las microcolonias, **D:** canales para la circulación de fluidos, **E:** células desprendidas de la microcolonia.

### 1.2.1. Comunicación intercelular

El biofilm microbiano ha sido considerado como una comunidad compleja, más que como la suma de células individuales, en la cual se observan comportamientos sociales. Dichos comportamientos están mediados por un sistema de comunicación intercelular, llamado Quórum Sensing. En las bacterias Gram positivas el sistema de Quórum Sensing comprende tres componentes: la molécula señal (péptido autoinductor, cuya función en parte es regular su propia síntesis) y un sistema de transducción de señales de dos componentes: un receptor que se une específicamente al péptido autoinductor y un regulador de respuesta intracelular que responde al péptido autoinductor por medio de la regulación de la expresión genética. La acumulación de autoinductor fuera de la célula refleja la creciente densidad celular, y una vez alcanzada la concentración umbral, se regulan distintos genes en respuesta al estímulo que disparó la producción del autoinductor (Williams y col., 2007; Bordi y de Betzman, 2011; Li y Tian, 2012).

Los péptidos autoinductores poseen una secuencia de aminoácidos en el rango comprendido entre 5 y 34 y son modificados postraduccionalmente. Su producción ocurre durante ciertos estados de crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a cambios ambientales y se acumulan en el medio extracelular. Una vez que son reconocidos por un receptor específico se genera una respuesta celular que procede a través de cambios fisiológicos (Cvitkovitch y col., 2003).

También se ha demostrado un segundo tipo de Quórum Sensing en algunos estreptococos, particularmente los pertenecientes a los grupos piogénicos, *salivarius*, *mutans* y *bovis*. Este sistema llamado ComRS utiliza una feromona conocida como XIP, la cual es internalizada por el sistema de transporte ABC. Una vez en el interior de la célula activa la transcripción de un factor sigma X, el cual a su vez, activa genes para la competencia genética (Li y Tian, 2012). Los biofilm, en la naturaleza, están formados por distintas especies de microorganismos, los cuales deben poder comunicarse entre ellos para coordinar las actividades y comportamientos sociales observados en los biofilms. El sistema de Quórum Sensing llamado Autoinductor 2 ha sido descrito en organismos Gram positivos y Gram negativos y se ha considerado como un “lenguaje universal” que permite la comunicación entre células pertenecientes a distintas especies (Li y Tian, 2012).

Las actividades que son coordinadas mediante Quórum Sensing son diversas y reflejan las necesidades específicas de una comunidad en particular. Como ejemplos se pueden mencionar la producción de toxinas y factores de virulencia, formación de

biofilm y ubicación de las células dentro del mismo, producción de exopolisacáridos, formación de cuerpos fructíferos, competencia genética, producción de bacteriocinas, muerte celular programada, cooperación social y simbiosis (Li y Tian, 2012).

### 1.2.2. Resistencia debida al biofilm

La estructura del biofilm y los atributos fisiológicos de los organismos que forman el mismo confieren una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos. Según algunos estudios, las células bacterianas que se encuentran dentro de un biofilm son 10 a 1000 veces más resistentes a la acción de los antimicrobianos que aquellas células de la misma cepa que crecen de manera libre. Los mecanismos que confieren esta resistencia son variados e incluyen:

- I. La matriz de exopolisacáridos limita la difusión de los antimicrobianos, al constituir una barrera física. Sin embargo no todos los compuestos son afectados y algunos pueden difundir libremente al interior del biofilm.
- II. Tasa de crecimiento alterada de los organismos. Las células dentro del biofilm están impedidas para dividirse por la matriz extracelular y por ello muestran tasas de crecimiento menores que las células plantónicas, lo que ocasiona que los antimicrobianos sean menos efectivos.
- III. Cambios fisiológicos debido al modo de crecimiento en el biofilm.

Los exopolisacáridos que componen la matriz extracelular del biofilm además protegen a los microorganismos de los componentes del sistema inmune del huésped, evitando la actividad fagocítica de los macrófagos y protegiéndolos de las opsoninas y de las especies reactivas del oxígeno en los leucocitos polimorfonucleares. También hay evidencia de una menor producción de especies reactivas del oxígeno luego de la fagocitosis (Watnik y Kolter, 2000; Olson y col., 2002; Melchior y col., 2006; Arif, 2010; Bordi y de Bentzman, 2011).

La formación de biofilm le permite a los microorganismos sobrevivir no solo a los tratamientos con antimicrobianos o a las defensas del huésped, sino también a otros factores adversos del medio (Donlan y Costerton, 2002; Olson y col., 2002; Melchior y col., 2006; Kaplan, 2010).

### 1.3. Generalidades de los probióticos

La Organización Mundial de la Salud definió los probióticos como "microorganismos vivos, los cuales administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del hospedador". Miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son principalmente utilizados como probióticos, pero otros microorganismos como *Saccharomyces boulardii* y *Streptococcus thermophilus* también han sido usados como probióticos (WHO/FAO, 2001; Dobson y col., 2011).

La primera observación del efecto benéfico de algunas bacterias fue realizada a principios del siglo XX, por el médico ruso Metchnikoff quien observó que un gran número de habitantes de Bulgaria vivían más de 100 años y consumían grandes cantidades de yogurt. Este médico aisló bacterias del yogurt y determinó que ellas conferían un efecto benéfico a la salud. También a principios del siglo XX, el pediatra francés Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces menor cantidad de bifidobacterias que los niños sanos y propuso que estas bacterias podrían ser administradas para prevenir la diarrea. En años recientes se ha incrementado el número de estudios clínicos que reportan beneficios para la salud de los consumidores de microorganismos probióticos (WHO/FAO, 2001; Guillor y col., 2008; Pascual y Barberis, 2010).

Para considerar un microorganismo como probiótico, éste debe cumplir ciertos criterios:

Aptitud: como los efectos probióticos son dependientes de cada cepa, la identificación taxonómica debe ser exacta. Además, la cepa seleccionada debe ser habitante normal de la especie en la cual será aplicada y debe carecer de toxicidad y patogenicidad, siendo generalmente reconocida como segura (GRAS).

Conveniencias tecnológicas: la cepa analizada debe tener la capacidad de sobrevivir a distintos tratamientos tecnológicos (congelado, desecación), debe mantener la viabilidad a altas concentraciones. Las características deseadas deben ser estables durante todo el proceso tecnológico, proveer cualidades organolépticas deseables cuando sea incluida en productos fermentados y poseer estabilidad genética.

Competitividad: los ensayos *in vitro* son esenciales para evaluar las características de una cepa y el mecanismo del efecto probiótico. Generalmente se evalúa la capacidad de supervivencia, proliferación y actividad metabólica en el sitio blanco *in vivo*, resistencia a la bilis y los ácidos, capacidad de competir con la microbiota normal y resistir a los metabolitos que ésta produzca, potencial adherencia y colonización,

capacidad de inhibición de microorganismos potencialmente patógenos y en caso de probióticos vaginales, resistencia a los espermicidas.

Acción y funcionalidad: las cepas evaluadas deben exhibir uno o más efectos benéficos para la salud, clínicamente documentados como la colonización del sistema gastrointestinal y genitourinario, acción antagónica contra bacterias patógenas, producción de sustancias antimicrobianas, capacidad de inmunoestimulación, acción antimutagénica y anticarcinogénica, producción de compuestos bioactivos, mantenimiento del colesterol en niveles saludables, metabolismo de la lactosa, entre otras (WHO/FAO, 2001; Reid y col., 2003; Dash, 2009; Pascual y Barberis, 2010).

#### **1.4. Generalidades del género *Lactobacillus***

Las especies del género *Lactobacillus* son bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos o anaerobios estrictos, con requerimientos nutricionales complejos, no esporulados. Se los clasifica dentro del grupo funcional de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) por su capacidad de producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico (Arif, 2010).

La vagina de las mujeres sanas premenopáusicas está predominantemente colonizada por especies de *Lactobacillus* en cantidades de  $10^7$ - $10^8$  UFC/g de fluido vaginal. Los mismos ayudan a mantener la salud y previenen la infección. Cuando los lactobacilos son eliminados o reducidos, la probabilidad de adquirir infecciones genitourinarias se incrementa. *Lactobacillus cripsatus*, *L. jensenii*, *L. iners*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* son las especies más frecuentemente aisladas (Boris y col., 1998; Merk y col., 2004; Pascual y col., 2006; Ozkinay y col., 2005; Zárate y Nader-Macias, 2006; Cribby y col., 2008; Vielfort y col., 2008; Martin y Suárez, 2009; Pascual y Barberis, 2010).

Los lactobacilos presentan actividad antimicrobiana y previenen las infecciones por distintos mecanismos:

- Exclusión competitiva: los lactobacilos compiten con los patógenos por los receptores celulares, el espacio físico y los nutrientes. Existe evidencia *in vitro* de la capacidad de los lactobacilos de inhibir la adherencia de *S. agalactiae* a las células epiteliales urogenitales.
- Coagregación con los microorganismos patógenos: los lactobacilos se unen a determinados patógenos, bloquean su adhesión y evitan su dispersión a otras

áreas. La coagregación es un proceso que, acompañado de la producción de compuestos antimicrobianos, resulta en la inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos.

- Autoagregación: puede aumentar sustancialmente el potencial de colonización de lactobacilos en los diferentes ecosistemas.
- Producción de compuestos con actividad antimicrobiana: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y biosurfactantes.
- Regulación del sistema inmune: la estimulación del sistema inmune mucosal por probióticos reduce la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la actividad en la vía NFκB, incrementa la producción de citoquinas antiinflamatorias y péptidos de defensa del huésped como β-defensina, incremento de IgA y promoción de la maduración de las células dendríticas (Velraeds y col., 1996; Ocaña y col., 1998; Merck y col., 2004; Zárate y Nader-Macias, 2006; Collado y col., 2007; Coudeyras y col., 2008; Vielfort y col., 2008; Matu y col., 2009; Dover y col., 2010; Oelschlaeger, 2010; Pascual y Barberis 2010).

#### 1.4.1. Sustancias antimicrobianas producidas por lactobacilos

##### 1.4.1.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias producidas por microorganismos que presentan un núcleo proteico, al cual se pueden asociar lípidos o carbohidratos, con actividad inhibitoria contra especies relacionadas y no relacionadas filogenéticamente. La especie productora tiene un mecanismo de inmunidad hacia las bacteriocinas que ella produce. Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas se dividen en cinco clases, de acuerdo a su estructura primaria, peso molecular, estabilidad al calor y organización estructural:

- Clase I: son péptidos modificados postraduccionalmente, de muy bajo peso molecular que contienen lantionina y son conocidos como lantibióticos. Su espectro de acción abarca diversas bacterias Gram positivas. Esta clase se subdivide en tres subclases:

Lantibióticos tipo A: actúan por formación de poros en la membrana, por ejemplo la nisina.

Lantibióticos tipo B: actúan por interferencia en la actividad enzimática y la síntesis de pared celular como la mersacidina.

Lantibióticos tipo C: compuestos por dos péptidos lantibióticos que actúan sinérgicamente, por ejemplo lacticina 3147.

- Clase II: pequeños péptidos que no contienen lantionina, no son modificados postraduccionalmente y son termoestables. Su modo de acción es la permeabilización de la membrana con la consecuente pérdida de moléculas. Esta clase se subdivide en tres grupos:

Clase IIa: poseen una fuerte actividad contra *Listeria* sp. Algunos ejemplos son pediocina, sacacina A y leucocina A.

Clase IIb: su actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos. Ejemplos: lacticina F y lactococcina G.

Clase IIc: bacteriocinas dependientes del sistema de secreción sec como lactocina B.

- Clase III: proteínas de gran masa molecular, lábiles al calor, como la helveticina J y lacticina B.
- Clase IV: bacteriocinas que requieren lípidos o carbohidratos para su actividad. Algunos ejemplos son leuconocina S y lactocin 27.
- Clase V: péptidos circulares no modificados postraduccionalmente, como AS-48, enterocina.

En los últimos años se han propuesto diferentes clasificaciones de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Algunos investigadores consideran a las bacteriocinas circulares de la Clase V como bacteriocinas de Clase IIc, por lo cual se podrían clasificar las bacteriocinas en cuatro clases (Guillor y col., 2008; Pascual y col., 2008 b; Pascual y Barberis, 2010; Matu y col., 2009; Dobson y col., 2011; Balciunas y col., 2012).

#### 1.4.1.2. Biosurfactantes

Los lactobacilos producen biosurfactantes, que son compuestos microbianos con actividad emulsificante. Presentan un amplio rango de estructuras químicas como

glicolípidos, lipopéptidos, complejos carbohidratos-proteínas, fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros. Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas, con una porción hidrofóbica y una porción hidrofílica y, además, algunos de ellos muestran actividad antibacteriana y antifúngica (Rodríguez y col., 2006; Arif, 2010; Pascual y Barberis, 2010).

La producción de biosurfactantes por parte de *Lactobacillus fermentum* B-54 y *L. acidophilus* RC-14 y su capacidad de inhibir la primera etapa en la formación de biofilm de *Enterococcus faecalis* 1131 fue comprobada por Velraeds y col. (1996). Estos investigadores demostraron que la primera etapa en la formación de biofilm de *E. faecalis* 1131 en placas de vidrio cubiertas con los biosurfactantes se retrasó alrededor de 7 segundos y el número de células adheridas después de 4 h también se redujo. Los biosurfactantes producidos fueron de naturaleza proteica y se nombró surlactin al producido por *L. acidophilus* RC-14, el cual fue capaz de inhibir la adhesión del patógeno en mayor medida. En un estudio posterior se demostró la capacidad de surlactin de inhibir la etapa inicial de la formación de biofilm de 15 patógenos genitourinarios a goma siliconada usada en la fabricación de catéteres (Velraeds y col., 1998).

Walencka y col. (2007) estudiaron la reducción de la adhesión de *S. aureus* y *S. epidermidis* utilizando biosurfactantes producidos por *L. acidophilus* HA-1, 336 y Ch-2 y observaron que dichas sustancias no tenían poder bactericida sobre los microorganismos testeados, de manera que la reducción observada se debía a las propiedades emulsificantes de los biosurfactantes. Estos investigadores también observaron una reducción de la hidrofobicidad de la superficie celular de *S. aureus* al ser tratado con los biosurfactantes producidos por las especies de lactobacilos. Además se observó una reducción en el biovolumen y la densidad de los biofilms preformados de *S. aureus* y *S. epidermidis* al ser tratados con los biosurfactantes. En este estudio se concluye que el biosurfactante más activo era el producido por *L. acidophilus* HA-1.

Arif (2010) evaluó la capacidad de reducir la formación de biofilm de *E. faecalis* y *S. epidermidis* en microplacas y en catéteres Foley por parte de un biosurfactante producido por *L. acidophilus*. La adhesión de *E. faecalis* se redujo 62.2% en catéteres y 48.2% en microplacas, mientras que la adhesión de *S. epidermidis* se redujo 47.3% en los catéteres y 44.6% en las microplacas.

Fracchia y col. (2010) estudiaron la producción de biosurfactantes de *Lactobacillus* spp CV8LAC y su capacidad de inhibición de biofilm de *Candida*

*albicans*. El biosurfactante producido era liberado al medio de cultivo. Las microplacas fueron tratadas con el biosurfactante antes de la evaluación de la producción de biofilm de *C. albicans*. La formación de biofilm se redujo un 82% y la inoculación de *C. albicans* con el surfactante al mismo tiempo mostró una reducción de la adhesión del 70%.

#### 1.4.1.3. Peróxido de hidrógeno

La producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) parece ser común entre los lactobacilos vaginales. Se ha observado que las mujeres colonizadas por lactobacilos productores de  $H_2O_2$  presentan menor prevalencia de vaginosis bacteriana. Además, las mujeres con infecciones urinarias recurrentes muestran ausencia de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno, lo que permite la colonización por parte de *E. coli* y otros microorganismos patógenos. En los cultivos aeróbicos el oxígeno es utilizado como aceptor final de electrones y es reducido a  $H_2O$ . Los lactobacilos no poseen grupos hemo y no utilizan el sistema de citocromos para la oxidación terminal durante el proceso respiratorio, en cambio poseen flavoproteínas que transforman el oxígeno en  $H_2O_2$ .

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante tóxico para las bacterias catalasa negativa y crea un ambiente inaceptable para el crecimiento de los microorganismos anaerobios. El efecto bactericida del  $H_2O_2$  se debe a la generación de metabolitos oxidantes, como el radical  $OH^\cdot$ , que introduce rupturas en el ADN de la célula, proteínas y otras biomoléculas, lo que lleva a la muerte celular. La conversión del  $H_2O_2$  a estos metabolitos citotóxicos está mediada por agentes reductores y peroxidasas presentes en el fluido vaginal, en especial durante la ovulación. Además, se comprobó que los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos incrementan el efecto bactericida del peróxido de hidrógeno (Ocaña y col., 1998; Ozkinay y col., 2005; Pascual y col., 2006; Martin y Suárez, 2009; Matu y col., 2009; Atassi y Servin, 2010; Dover y col., 2010; Pascual y Barberis, 2010).

#### 1.4.1.4. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido acético, ácido láctico, ácido butírico y ácido fórmico son producidos durante el metabolismo anaeróbico de los carbohidratos. En la vagina, por estimulación del estrógeno, se produce glucógeno.

Este carbohidrato es fermentado por los lactobacilos, produciendo ácidos orgánicos que mantienen el pH del sitio menor a 4.5. La acidez del medio inhibe el crecimiento de los patógenos y protege incluso de la infección con el virus HIV (Ocaña y col., 1998; Juárez Tomás y col., 2002; Pascual y col., 2006; Guillor y col., 2008; Matu y col., 2009; Dover y col., 2010).

La inhibición del crecimiento microbiano por ácidos orgánicos puede deberse a su capacidad de atravesar la membrana celular en su forma no disociada. Una vez en el interior celular ellos se disocian y acidifican el citoplasma, reduciendo el pH y las actividades metabólicas. Además, los aniones no pueden difundir fuera de la célula y su acumulación genera estrés osmótico. El bajo pH también potencia el efecto de otras sustancias antimicrobianas producidas por los lactobacilos: el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es más estable y las bacteriocinas son altamente activas (Guillor y col., 2008; Dover y col., 2010; Pascual y Barberis, 2010).

*Lactobacillus fermentum* cepa L23 y *L. rhamnosus* cepa L60 fueron estudiados por el grupo de investigadores que componen el área de Bacteriología y se determinaron sus características probióticas:

Producción de bacteriocinas: las bacteriocinas producidas por estas cepas de lactobacilos demostraron tener un amplio rango de actividad contra microorganismos Gram positivos, Gram negativos, sobre especies de *Candida* y micoplasmas. Además, estas bacteriocinas demostraron tener un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de distintos microorganismos patógenos genitourinarios.

Producción de peróxido de hidrógeno: *L. rhamnosus* produce peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno, y como no posee catalasa, éste se acumula en el medio y desarrolla propiedades oxidativas.

Producción de ácidos orgánicos: los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos son el resultado de la fermentación de los carbohidratos. Los principales ácidos son ácido láctico y ácido acético y su producción se evidencia por el bajo pH del sobrenadante libre de células.

Autoagregación: la autoagregación se define como la capacidad de formar agregados de células de la misma cepa mediante las proteínas de superficie. Esta característica contribuye a la adherencia y la colonización del epitelio y a la formación de un biofilm que impide la colonización de los microorganismos patógenos.

---

Hidrofobicidad de la superficie: *L. fermentum* y *L. rhamnosus* mostraron alta hidrofobicidad de superficie, indicando la presencia de material proteico en su superficie. Esta característica se relaciona con la autoagregación, la adherencia y la colonización del epitelio.

Coagregación: la coagregación de los probióticos les permite adherirse a los microorganismos patógenos, impidiéndoles unirse a los receptores celulares y, además, inhibir su crecimiento. *L. fermentum* y *L. rhamnosus* mostraron coagregación con una gran cantidad de microorganismos.

Adherencia bacteriana: la habilidad de adherirse al epitelio es una propiedad importante para la selección de un probiótico (Pascual y col., 2008 a, b; Daniele y col., 2011; Pascual y Barberis, 2010).

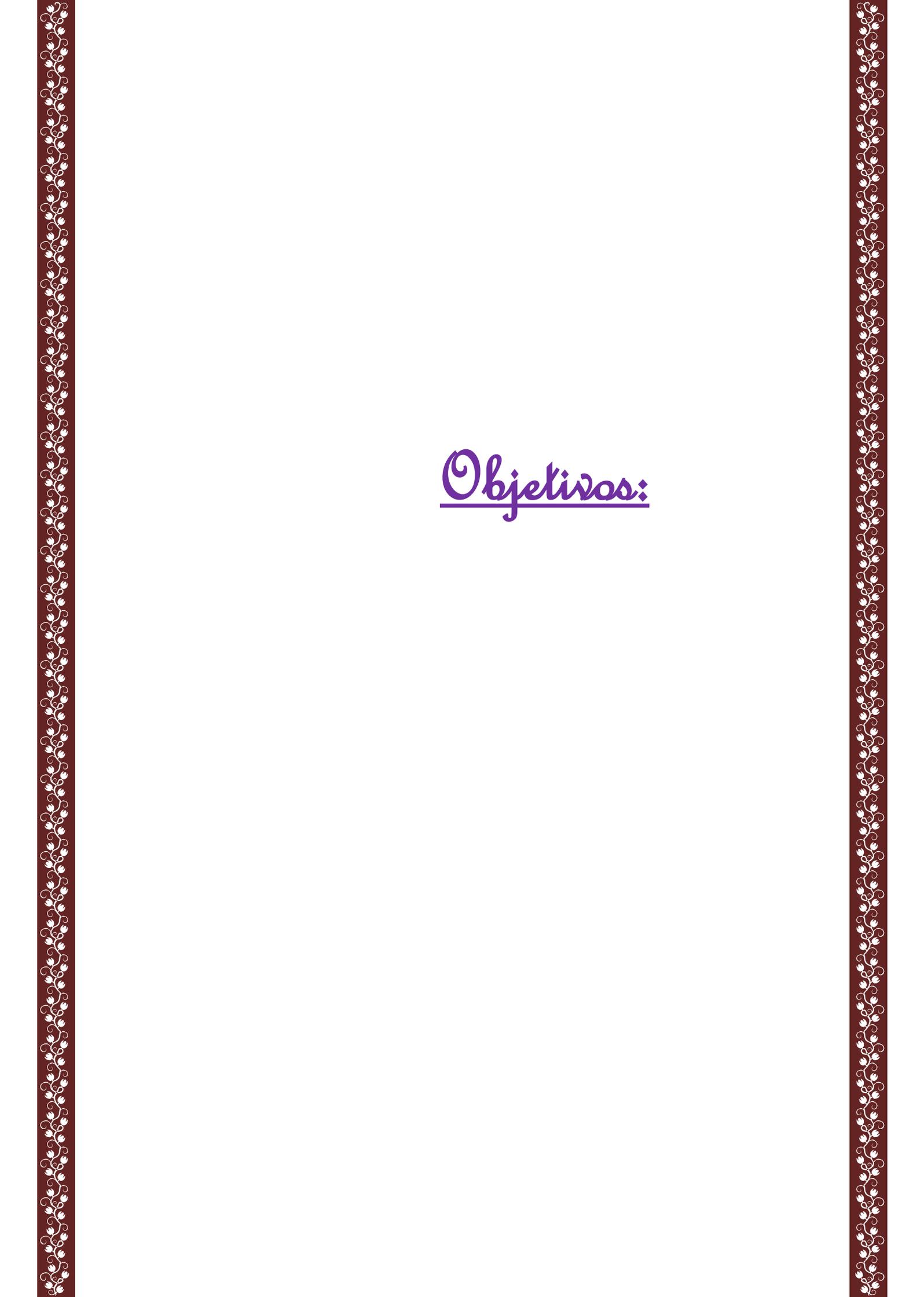
Basado en los antecedentes que componen los estudios previos realizados por el grupo de investigación sobre las propiedades probióticas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, se llevo a cabo el siguiente trabajo de investigación, con el objetivo de evaluar el efecto *in vitro* de estas cepas de lactobacilos con características probióticas sobre la producción de biofilm de *S. agalactiae*.

Hipótesis:

---

## 2. HIPÓTESIS

- *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* poseen propiedades probióticas e inhiben la formación de biofilm de *Streptococcus agalactiae* *in vitro*.



## Objetivos:

---

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto *in vitro* de cepas de lactobacilos con características probióticas sobre la producción de biofilm de *Streptococcus agalactiae*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Aislar cepas de *S. agalactiae* de vagina de mujeres.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas las distintas cepas de *S. agalactiae*.
- Estudiar la formación de biofilms por las cepas de *S. agalactiae*.
- Evaluar la inhibición de la formación de biofilms por las distintas fracciones del sobrenadante libre de células de lactobacilos.
- Analizar la disrupción de biofilms por lactobacilos probióticos.

Materiales y

métodos:

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Cepas bacterianas**

En este estudio se utilizaron 30 cepas de *S. agalactiae* aisladas de pacientes que concurren al servicio de Ginecología del Nuevo Hospital de Río Cuarto (Ruíz et al, 2011). Para ello se tomaron exudados vaginales, los que fueron coloreados mediante la tinción de Gram y sembrados en placas de Petri con agar sangre de carnero al 5% (BioMerièux, Francia). Las muestras fueron incubadas 24-48 h, en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes a las colonias sospechosas: catalasa, susceptibilidad a bacitracina, cultivo en agar sangre de carnero para la observación de tipo de hemólisis, hidrólisis del hipurato, prueba de CAMP, reacción de PYR (pirrolidoni-β-naftilamida), susceptibilidad a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) y Voges-Proskauer. Se confirmó la identificación con el uso del Test Slidex Strepto-Kit (REF 58 810, BioMerièux, Francia). Las cepas se conservaron a -20°C en caldo tripticasa soya (CTS, Laboratorios WB, Córdoba, Argentina) con 30% de glicerol. Para su posterior uso, las cepas se repicaron en CTS y luego se transfirieron a un medio sólido (Mueller-Hinton). Se observó la morfología de las colonias desarrolladas y se comprobó, mediante la tinción de Gram, la ausencia de contaminantes.

Las cepas de lactobacilos usadas correspondieron *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, previamente estudiadas por el grupo de investigación de la Orientación de Bacteriología. Estas cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas, API 50 CHL y por secuenciación de ADN. Las mismas fueron depositadas en la base de GenBank de secuencia génica. Estudios anteriores demostraron que *L. fermentum* L23 producía ácidos orgánicos y bacteriocinas, al igual que *L. rhamnosus* L60, el que además producía peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las bacteriocinas producidas por estas cepas de lactobacilos fueron caracterizadas y purificadas. Ambas fueron intensamente estudiadas en cuanto a la producción de bacteriocinas, caracterización y purificación de las mismas, como así también han sido estudiadas las propiedades probióticas y benéficas que presentan. Las cepas de lactobacilos se conservaron a -20°C en caldo Bouillon de Man, Rogosa y Sharp (MRS) (Britania, Argentina) adicionado con 30% de glicerol. Antes de su uso, fueron repicadas en caldo MRS y luego transferidas a agar MRS. Se observó la morfología de las colonias y se comprobó la ausencia de contaminantes mediante la tinción de Gram.

#### **4.2. Producción de biofilm de *Streptococcus agalactiae***

Se estudió la capacidad de formar biofilm empleando un ensayo cuantitativo en tubo modificado (Kwasny y Opperman, 2010). Para ello se prepararon suspensiones de cada cepa de SGB en CTS, ajustándose la turbidez a los tubos 0,5 y 1 de la escala de Mc Farland para evaluar la producción de biofilm con inóculos de distinta DO. Alícuotas de 200 µl fueron transferidas a tubos de hemólisis estériles y se incubaron durante 6 y 24 h a 37°C. Una vez finalizado el período de incubación, se descartó el medio de cultivo. Posteriormente se adicionaron 25 µl de cristal violeta al 1% a cada tubo agitando suavemente y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. A continuación, se lavaron los tubos tres veces con 200 µl de buffer fosfato salino (PBS) para remover las células no adheridas al fondo del tubo y quitar el exceso de colorante. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 min. El cristal violeta unido al biofilm fue extraído mediante dos lavados con 200 µl de alcohol etílico. Éste fue transferido a tubos que contenían 1,2 ml de alcohol y se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro UV (Cecil CE 2502). Las cepas fueron clasificadas como altamente productoras de biofilm (DO mayor a 0,5), productoras (DO entre 0,5 y 0,1) y escasamente productoras (DO menor de 0,1). Los ensayos se realizaron por triplicado y para los controles se usó caldo de cultivo estéril.

#### **4.3. Obtención de ambas fracciones del sobrenadante libre de células de lactobacilos**

*L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se cultivaron en caldo MRS. Se transfirieron 500 µl de un cultivo de 18 h de incubación a 9,5 ml de medio fresco y se incubó a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Este cultivo se centrifugó a 8500 rpm a 4°C por 20 min para obtener el sobrenadante libre de células (SLC). Posteriormente, se colocó en viales estériles para inactivar con vapores de cloroformo por 20 min y se aireó por 15 min para eliminar los restos de cloroformo. Para estudiar si el efecto inhibitorio se debía a la producción de ácidos orgánicos, el SLC se neutralizó a pH 6.5-7 con NaOH 1N, en el cual fue observado el efecto de la bacteriocina, mientras que en el SLC sin tratar se observaron ambos efectos, el del ácido y el de la bacteriocina. Como control de la actividad antimicrobiana de los SLC se utilizó una cepa de *E. coli* sensible, la cual fue sembrada en una placa de agar MRS (Britania, Argentina), en la cual se realizó un pozo central donde se inocularon 100 µl de SLC. La placa fue incubada a 37°C por 24 h.

---

#### **4.4. Producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células de lactobacilos neutralizado y sin neutralizar**

Se colocaron 200 µl de cultivo de SGB con una DO correspondiente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (concentración aproximada de  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml) en tubos estériles, se añadió 200 µl de SLC de L23 y L60 y se incubó por 24 h a 37°C. Luego se determinó la producción de biofilm como se describió en el punto 4.2. Para investigar el efecto de las bacteriocinas producidas por L23 y L60 sobre la producción de biofilm se neutralizaron los SLC con NaOH 1N y se procedió de igual manera. Como control de la producción de biofilm se utilizó un cultivo de SGB con el agregado de 200 µl de caldo CTS. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### **4.5. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y se realizaron test *a posteriori* (Test LSD Fisher) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Se trabajó con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Los análisis se realizaron mediante el empleo del software InfoStat versión 2012l. grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

#### 4.6 Composición de los medios de cultivo

##### Caldo MRS (Bouillon de Man, Rogosa and Sharp)

Proteasa peptona N°3	10g/L
Extracto de carne	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
Glucosa	20g/L
Sorbitol monoleato	1mL
Fosfato dipotásico	2g/L
Acetato sódico	5g/L
Citrato de amonio	2g/L
Sulfato de magnesio	0.20g/L
Sulfato de manganeso	0.05g/L
pH final: 6.5± 0.1	

##### Agar MRS

Proteasa peptona N°3	10g/L
Extracto de carne	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
Glucosa	20g/L
Sorbitol monoleato	1mL
Fosfato dipotásico	2g/L
Acetato sódico	5g/L
Citrato de amonio	2g/L
Sulfato de magnesio	0.20g/L

Sulfato de manganeso 0.05g/L

Agar-agar 12g/L

Caldo tripticasa soya

Peptona de proteína 12g/100mL

Peptona de carne 3g/100mL

Peptona de soya 3g/100mL

Glucosa 2.5g/100mL

Cloruro de sodio 5g/100mL

Fosfato dipotásico 5g/100mL

pH final: 7.3± 0.1

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Cloruro de sodio 0.736g

Fosfato monopotásico 0.313g

PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.12 H<sub>2</sub>O 0.465g

H<sub>2</sub>O 100mL

pH final: 6

---

Agar Mueller-Hinton

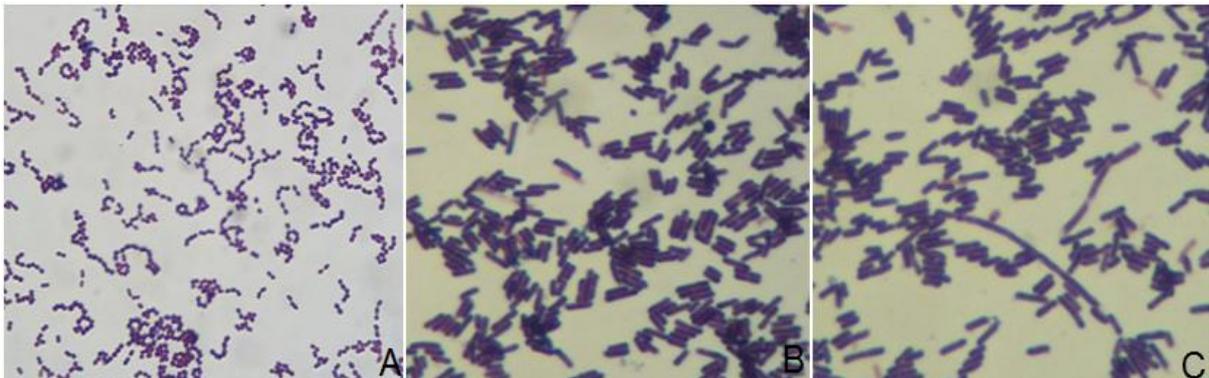
Infusión de carne	2g
Hidrolizado de caseína	17.5g
Almidón	1.5g
Agar-agar	13g
H <sub>2</sub> O	1000 mL
pH: 7.4	

Resultados y

discusión:

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

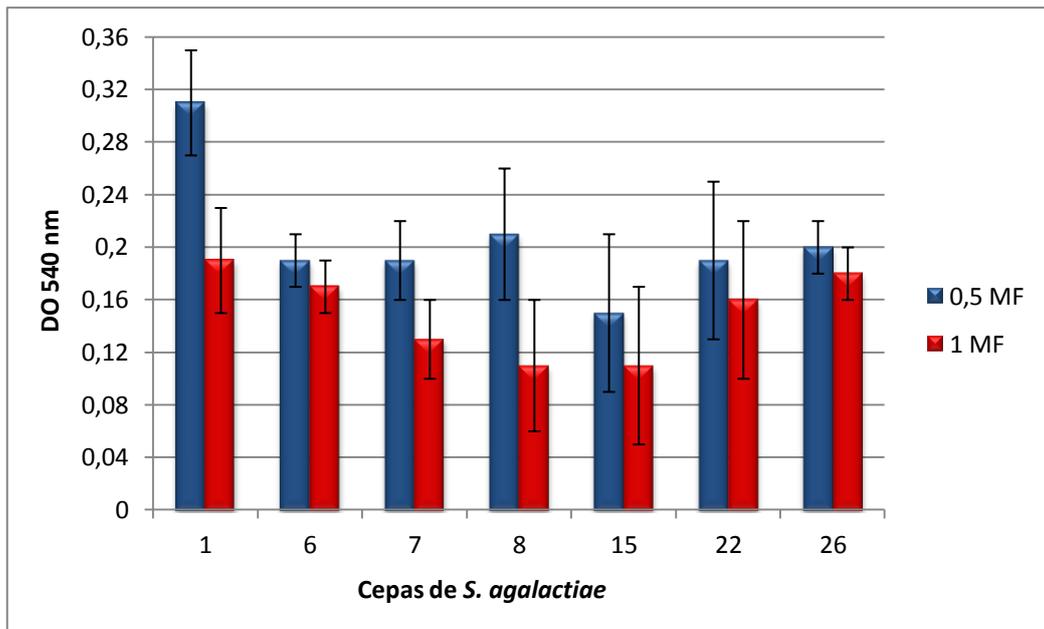
La observación de los extendidos coloreados con Gram demostró la ausencia de contaminantes en todas las cepas bacterianas utilizadas. En la figura 2 se observa la morfología típica correspondiente a *S. agalactiae*, *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.



**Figura 2:** Microfotografías de *S. agalactiae* (1000x) (A), *L. fermentum* L23 (1000x) (B), *L. rhamnosus* L60 (1000x) (C).

### **5.1. Producción de biofilm de *Streptococcus agalactiae***

Al evaluar la producción de biofilm de SGB empleando inóculos con diferentes DO del microorganismo, con el objeto de seleccionar la DO óptima para la mayor producción de biofilm, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al emplear los inóculos correspondientes a los tubos 0.5 y 1 de la escala de Mc Farland ( $p \leq 0,05$ ). En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en esta experiencia. En la tabla 1 se detallan los datos obtenidos con el correspondiente error estándar.



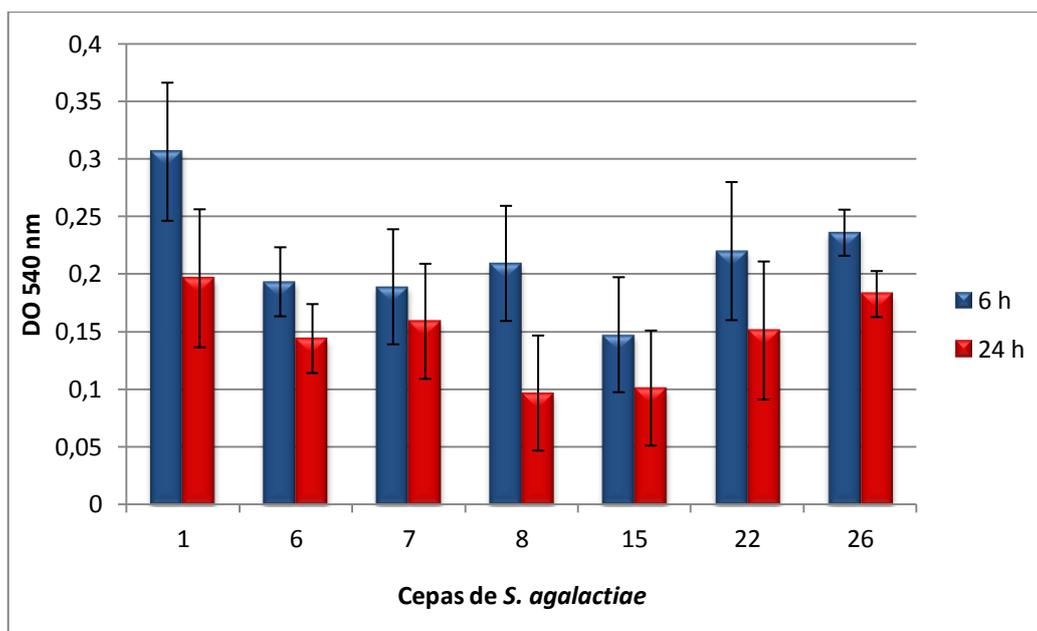
**Figura 3:** Producción de biofilm de *S. agalactiae* utilizando inóculos con diferentes DO.

**Tabla 1:** Valores de absorbancia obtenidos utilizando inóculos de *S. agalactiae* con diferentes DO.

	0.5 Mc Farland	1 Mc Farland
cepa	DO± EE <sup>a</sup>	DO±EE
1	0.31±0.04	0.19±0.04
6	0.19±0.02	0.17±0.02
7	0.19±0.03	0.13±0.03
8	0.21±0.05	0.11±0.05
15	0.15 ±0.06	0.11±0.06
22	0.19±0.06	0.16±0.06
26	0.20±0.02	0.18±0.02

a: error estándar .

Cuando se realizó el ensayo para determinar el tiempo de incubación óptimo para la producción de biofilm de *S. agalactiae* no se observaron diferencias estadísticamente significativas al incubar durante 6 y 24 h. Los resultados obtenidos con ambos tiempos de incubación se observan en la figura 4. En la tabla 2 se muestran los promedios de las mediciones de absorbancia obtenidos en este ensayo.



**Figura 4:** Producción de biofilm de *S. agalactiae* a distintos tiempos de incubación.

**Tabla 2:** Resultados de la absorbancia utilizando distintos tiempos de incubación.

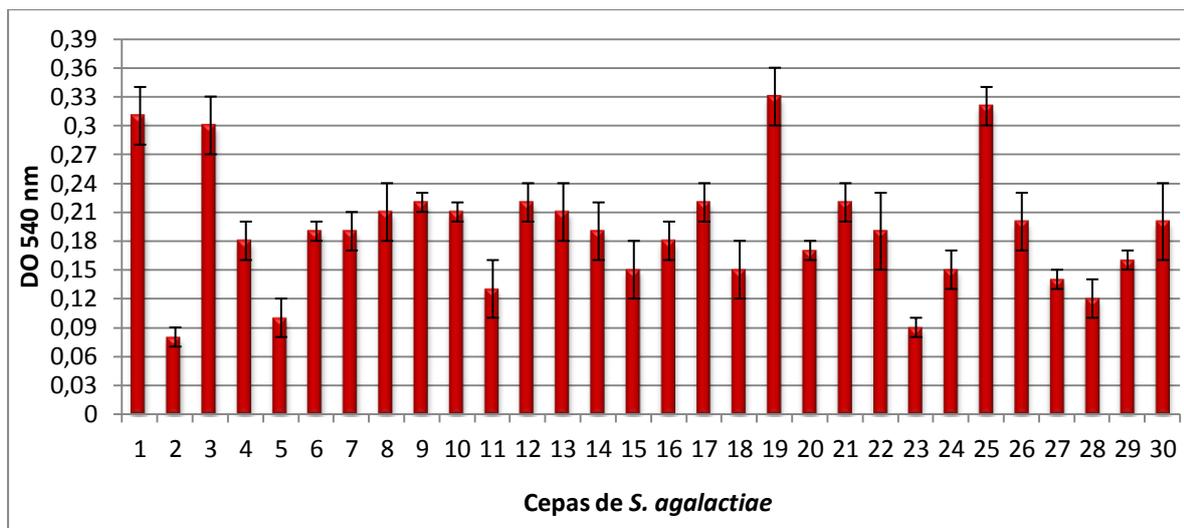
cepa	6 h	24 h
	DO ± EE <sup>a</sup>	DO ± EE
1	0.31 ± 0.06	0.20 ± 0.06
6	0.19 ± 0.03	0.14 ± 0.03
7	0.19 ± 0.05	0.16 ± 0.05
8	0.21 ± 0.05	0.01 ± 0.05
15	0.15 ± 0.05	0.10 ± 0.05
22	0.19 ± 0.06	0.15 ± 0.06
26	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02

a: error estándar.

Estos resultados difieren con los reportados por Kaur y col. (2009), quienes observaron que la producción de biofilm de *S. agalactiae* era mayor al utilizar mayores tiempos de incubación.

Los resultados obtenidos en este trabajo referidos al tiempo de incubación concuerdan con los reportados por Borges y col. (2012), quienes no encontraron diferencias significativas entre los dos tiempos de incubación empleados.

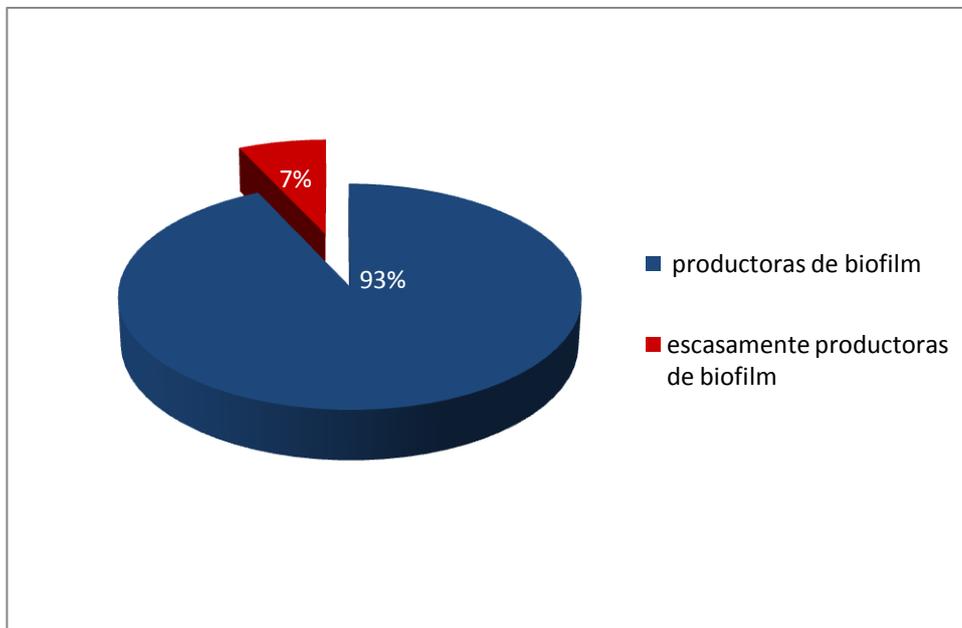
Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se determinó la producción de biofilm de las 30 cepas de *S. agalactiae* utilizando 200 µl de cultivo de SGB con densidad óptica similar al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland y se incubó por 6 h a 37°C. Todas las cepas analizadas fueron capaces de producir biofilm. La producción de biofilm demostró ser dependiente de cada cepa ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados se observan en la figura 5.



**Figura 5:** Producción de biofilm de *S. agalactiae*.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Kaur y col. (2009) y Borges y col. (2012), quienes reportaron que la producción de biofilm de *S. agalactiae* era dependiente de cada cepa.

El 93% de las cepas ensayadas se consideraron productoras de biofilm y el 7% lo hizo como escasamente productoras de biofilm (figura 6). El valor de absorbancia promedio fue de 0.191, con un rango comprendido entre 0.08 y 0.33.

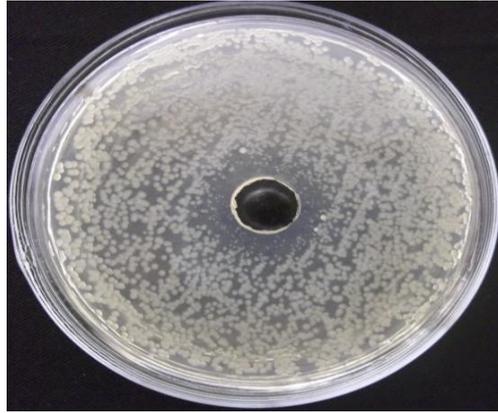


**Figura 6:** Porcentaje de cepas de *S. agalactiae* según su capacidad de producción de biofilm.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Kaur y col. (2009), quienes observaron que el 80% de las cepas de SGB aisladas de mujeres embarazadas eran productoras de biofilm y el 20% eran escasamente productoras de biofilm.

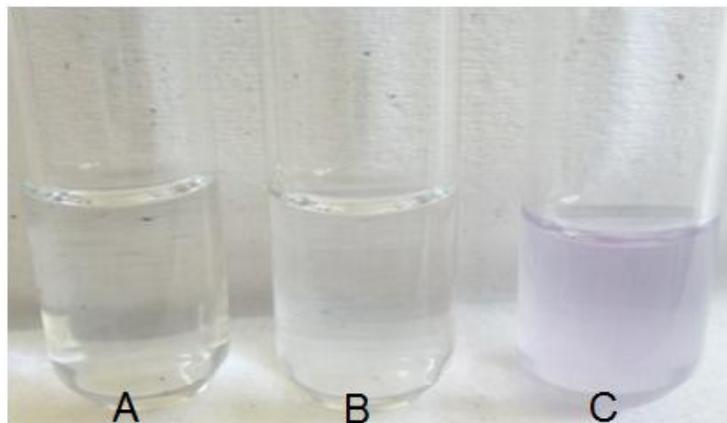
### **5.1.1. Inhibición de la producción de biofilm de *S. agalactiae* empleando sobrenadante libre de células de *L. fermentum* L23 neutralizado y sin neutralizar**

Para comprobar que el SLC de *L. fermentum* mantenía su actividad antimicrobiana en el momento de ser utilizado, se realizó un control empleando una cepa de *E. coli* sensible a las sustancias antimicrobianas presentes en el SLC. Como resultado se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano (figura 7).



**Figura 7:** Control de la actividad antimicrobiana del SLC de *L. fermentum* sobre *E. coli*.

La producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con SLC de L23 se evaluó mediante la utilización de cristal violeta, según fue descrito previamente. En la figura 8 se observa el alcohol del lavado conteniendo el cristal violeta removido del biofilm de SGB.



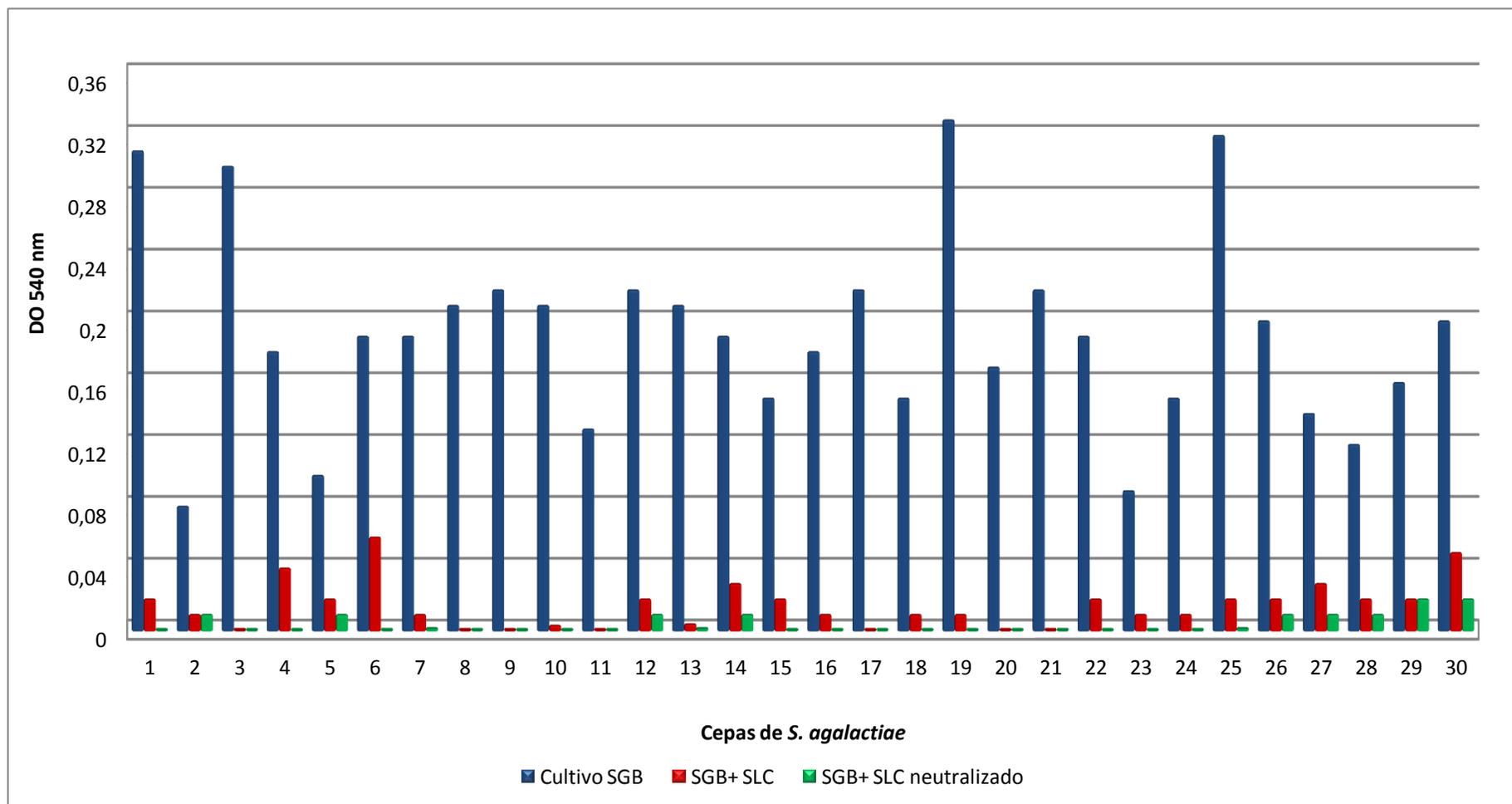
**Figura 8:** Alcohol de lavado.

Referencias: **A:** control negativo (medio de cultivo estéril), **B:** cultivo de SGB tratado con SLC de L23, **C:** control positivo (cultivo de SGB sin tratamiento).

Cuando el cultivo de SGB fue tratado con SLC de *L. fermentum* sin neutralizar el 100% de las cepas mostró una reducción significativa en la producción de biofilm ( $p < 0,05$ ), en comparación con el cultivo de *S. agalactiae* sin tratamiento. En el 20% de las cepas la producción de biofilm fue totalmente inhibida.

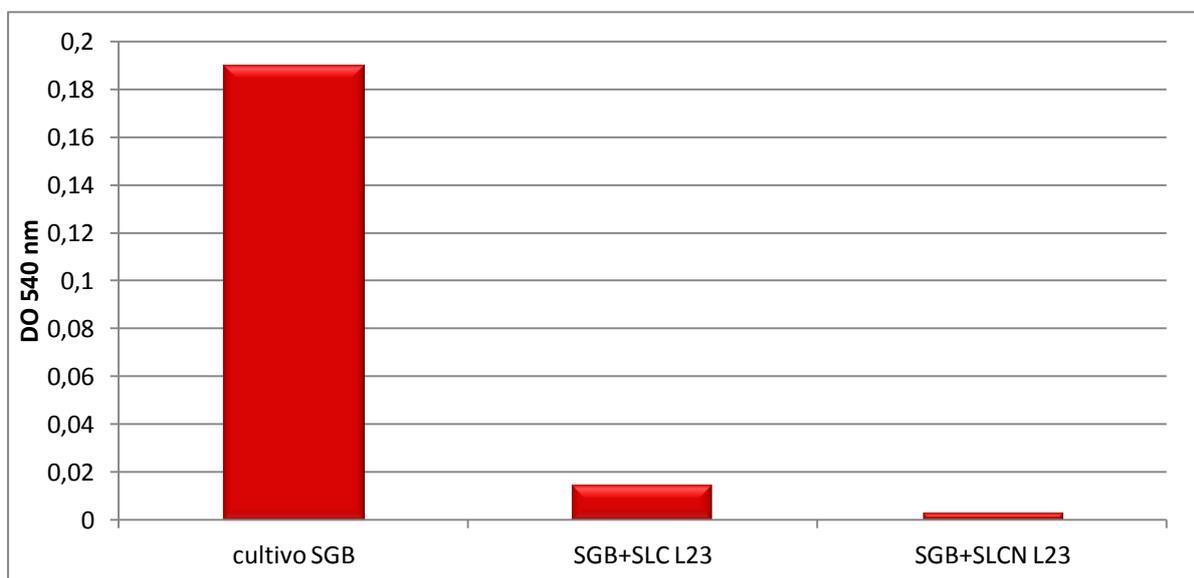
---

El efecto de los ácidos orgánicos producidos por *L. fermentum* L23 fue neutralizado con NaOH 1N para analizar la capacidad inhibitoria de la bacteriocina producida por esta cepa de lactobacilo sobre la formación de biofilm de *S. agalactiae*. La producción de biofilm bajo estas condiciones resultó ser significativamente menor, en comparación con el cultivo de *S. agalactiae* sin tratamiento. El 53% de las cepas mostró inhibición total de la formación de biofilm. Estos resultados se observan en la figura 9.



**Figura 9:** Producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células de *L. fermentum* L23.

La producción promedio de biofilm de *S. agalactiae* tratado con SLC sin neutralizar de *L. fermentum* se redujo un 91.6%, destacando el hecho de que en 6 cepas no se observó formación de biofilm y el valor de absorbancia promedio fue de 0.016. Utilizando el SLC neutralizado de *L. fermentum* el valor de absorbancia promedio fue de 0.004, indicando una reducción en la producción promedio del 97.9% (figura 10). En 16 de las 30 cepas de SGB ensayadas, el SLC de L23 neutralizado redujo en un 100% la producción de biofilm. Estos resultados indican que el efecto inhibitorio de la formación de biofilm de SGB por *L. fermentum* se deben a los ácidos orgánicos y a la bacteriocina producida por esta cepa de lactobacilo.



**Figura 10:** Producción promedio de biofilm de SGB tratado con SLC de *L. fermentum* neutralizado y sin neutralizar.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por Chung y col. (2004), quienes observaron una reducción de la producción de biofilm por parte de *S. mutans* utilizando ambas fracciones del SLC de *L. fermentum* S11, indicando que esta cepa de lactobacilo produce, además de los ácidos orgánicos, otra sustancia con actividad antimicrobiana.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos y bacteriocinas ( $p \leq 0,05$ ), es decir la fracción del SLC sin

---

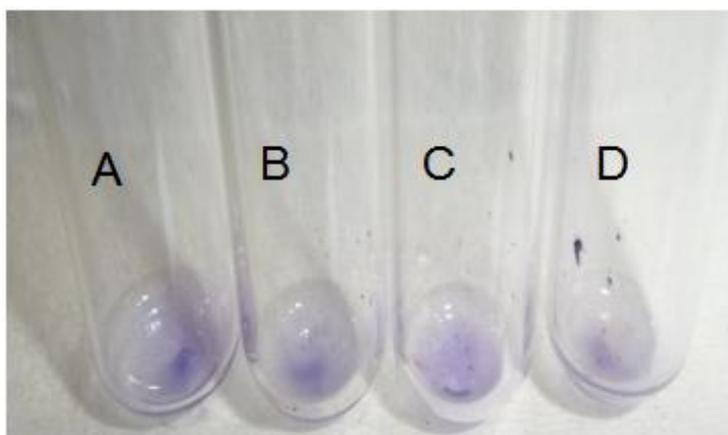
neutralizar, y el efecto inhibitorio de la bacteriocina en el SLC neutralizado. Los porcentajes de inhibición de la formación de biofilm de SGB se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3:** Porcentajes de inhibición de biofilm de SGB por ácidos y bacteriocina producidos por *L. fermentum* L23.

Cepa	Cultivo SGB	SGB tratado con SLC de L23		SGB tratado con SLC neutralizado de L23	
		DO	Porcentaje de inhibición (%)	DO	Porcentaje de inhibición (%)
1	0.31±0.03	0.02±0.03	93.5	0±0.03	100
2	0.08±0.01	0.01±0.01	87.5	0.01±0.01	87.5
3	0.30±0.03	0±0.03	100	0±0.03	100
4	0.18±0.02	0.04±0.02	77.7	0±0.02	100
5	0.10±0.02	0.02±0.02	80	0.01±0.02	90
6	0.19±0.01	0.06±0.01	68.4	0±0.01	100
7	0.19±0.02	0.01±0.01	94.7	0.001±0.01	99.4
8	0.21±0.03	0±0.03	100	0±0.03	100
9	0.22±0.01	0.0004±0.01	98.5	0±0.01	100
10	0.21±0.01	0.003±0.01	98.5	0±0.01	100
11	0.13±0.03	0±0.03	100	0±0.03	100
12	0.22±0.02	0.02±0.02	90.9	0.01±0.02	95.4
13	0.21±0.03	0.004±0.03	98	0.001±0.03	99.5
14	0.19±0.03	0.03±0.03	84.2	0.01±0.03	94.7
15	0.15±0.03	0.02±0.03	84.2	0±0.03	94.7
16	0.18±0.02	0.01±0.02	94.4	0±0.02	100
17	0.22±0.02	0±0.02	100	0±0.02	100
18	0.15±0.03	0.01±0.03	93.3	0.0003±0.03	98
19	0.33±0.03	0.01±0.03	96.9	0±0.03	100
20	0.17±0.01	0±0.01	100	0±0.01	100
21	0.22±0.02	0±0.02	100	0±0.02	100
22	0.19±0.04	0.02±0.04	89.5	0±0.04	100
23	0.09±0.01	0.01±0.01	88.8	0±0.01	100
24	0.15±0.02	0.01±0.02	93.3	0±0.02	100
25	0.32±0.02	0.02±0.02	93.7	0.001±0.02	99.6
26	0.20±0.03	0.02±0.03	90	0.01±0.03	95
27	0.14±0.01	0.03±0.01	78.5	0.01±0.01	92.8
28	0.12±0.02	0.02±0.02	83.3	0.01±0.02	91.6
29	0.16±0.01	0.02±0.01	87.5	0.02±0.01	87.5
30	0.20±0.04	0.05±0.04	75	0.02±0.04	90
$\bar{x}$	0.191±0.01	0.016±0.003	91.6	0.004±0.001	97.9

### 5.1.2. Inhibición de la producción de biofilm de *S. agalactiae* utilizando sobrenadante libre de células de *L. rhamnosus* L60 neutralizado y sin neutralizar

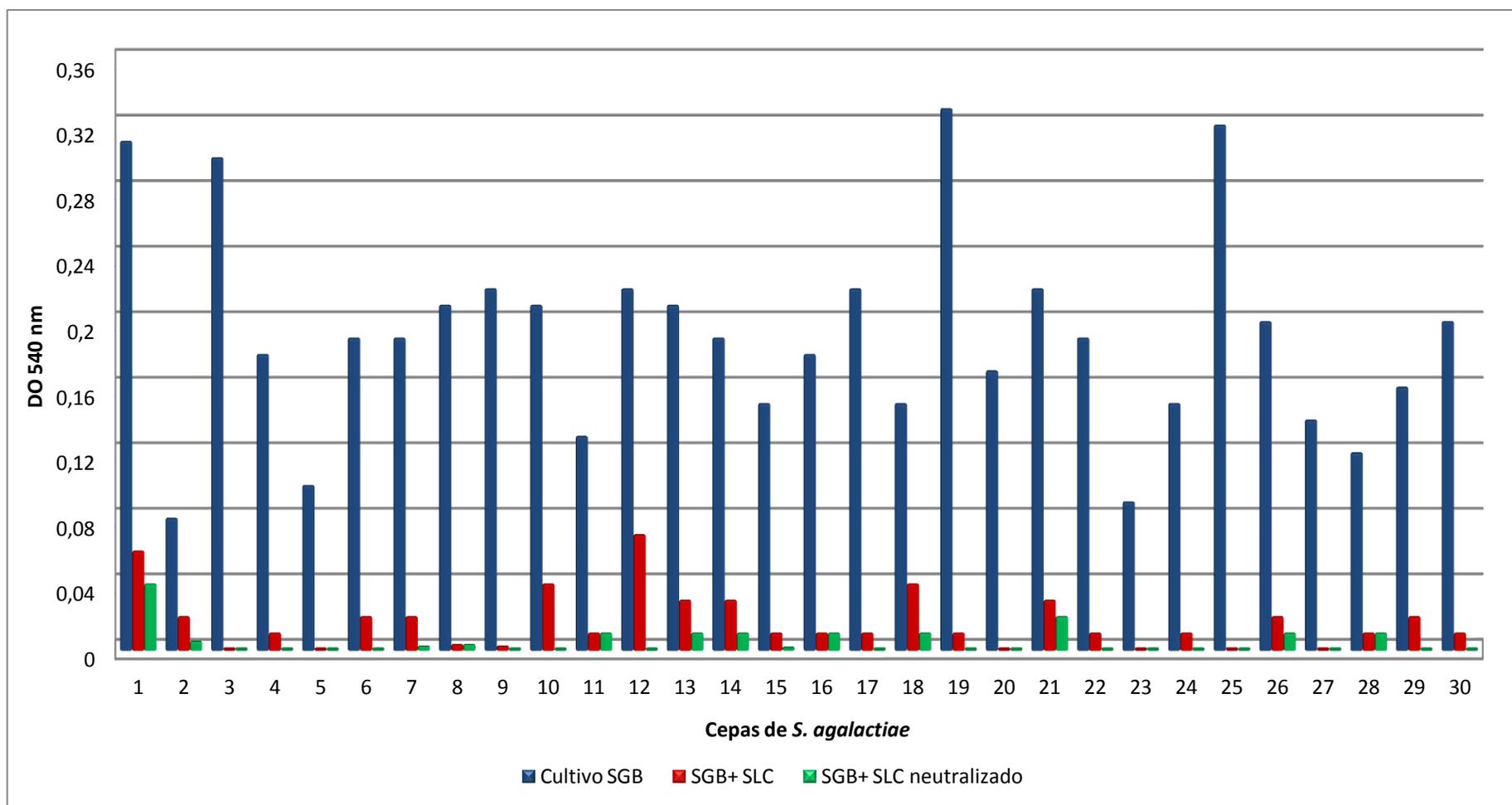
El biofilm producido por *S. agalactiae* tratado con ambas fracciones del SLC de *L. rhamnosus* se coloreó con cristal violeta para su posterior cuantificación. En la figura 11 se observan tubos conteniendo el biofilm de SGB tratado con el SLC sin neutralizar de L60.



**Figura 11:** Tubos con biofilm de SGB.

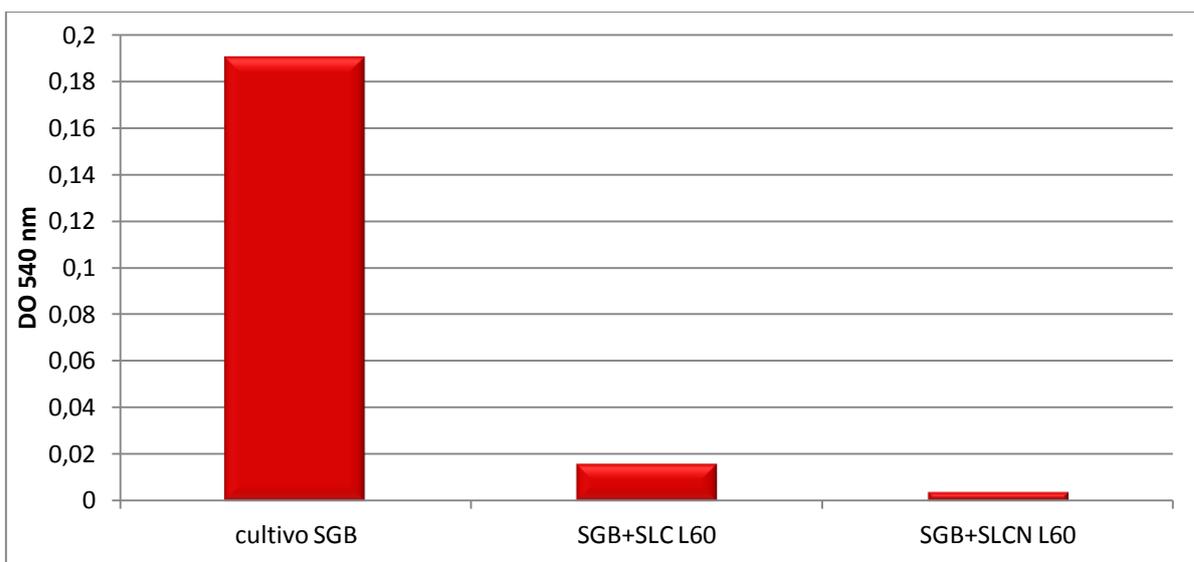
Referencias: **A, B y C:** SGB tratado con SLC sin neutralizar de L60, **D:** control negativo (medio de cultivo estéril).

La producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con SLC sin neutralizar de *L. rhamnosus* L60 mostró ser significativamente menor ( $p < 0,05$ ), respecto al cultivo sin tratamiento, en las 30 cepas analizadas. Para evaluar el efecto inhibitorio de la bacteriocina y el peróxido de hidrógeno producidos por *L. rhamnosus* L60 sobre la formación de biofilm de *S. agalactiae*, se ajustó el pH del sobrenadante libre de células entre 6.5 y 7 con la adición de NaOH 1N. En todas las cepas se observó una reducción significativa en la producción de biofilm, en comparación con el cultivo de *S. agalactiae* sin tratamiento. Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en la figura 12.



**Figura 12:** Producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células de *L. rhamnosus* L60.

La absorbancia media de la producción de biofilm de SGB tratado con SLC neutralizado y sin neutralizar de L60 fue de 0.005 y 0.017, respectivamente (figura 13). Estos resultados indican que la reducción en la producción de biofilm de *S. agalactiae* observada se debe a los ácidos orgánicos, la bacteriocina y el peróxido de hidrógeno producido por *L. rhamnosus* L60.



**Figura 13:** Producción promedio de biofilm de SGB tratado con SLC de *L. rhamnosus*.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto inhibitorio de la formación de biofilm de SGB debido a los ácidos orgánicos, bacteriocinas y el  $H_2O_2$  presentes en el SLC sin neutralizar, y el efecto inhibitorio debido a la bacteriocina y el  $H_2O_2$  presentes en el SLC neutralizado de *L. rhamnosus* ( $p \leq 0,05$ ). En la tabla 4 se observan los porcentajes de inhibición de la producción de biofilm de SGB tratado con ambas fracciones del SLC de L60. Cabe destacar que en el 53% de las cepas no se observó formación de biofilm al tratar el cultivo de SGB con el SLC neutralizado de L60. En las 14 cepas restantes el porcentaje de inhibición promedio fue muy elevado y correspondió a un 88.31%.

**Tabla 4:** Porcentaje de inhibición de biofilm de SGB por ácidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por bacteriocina de *L. rhamnosus* L60.

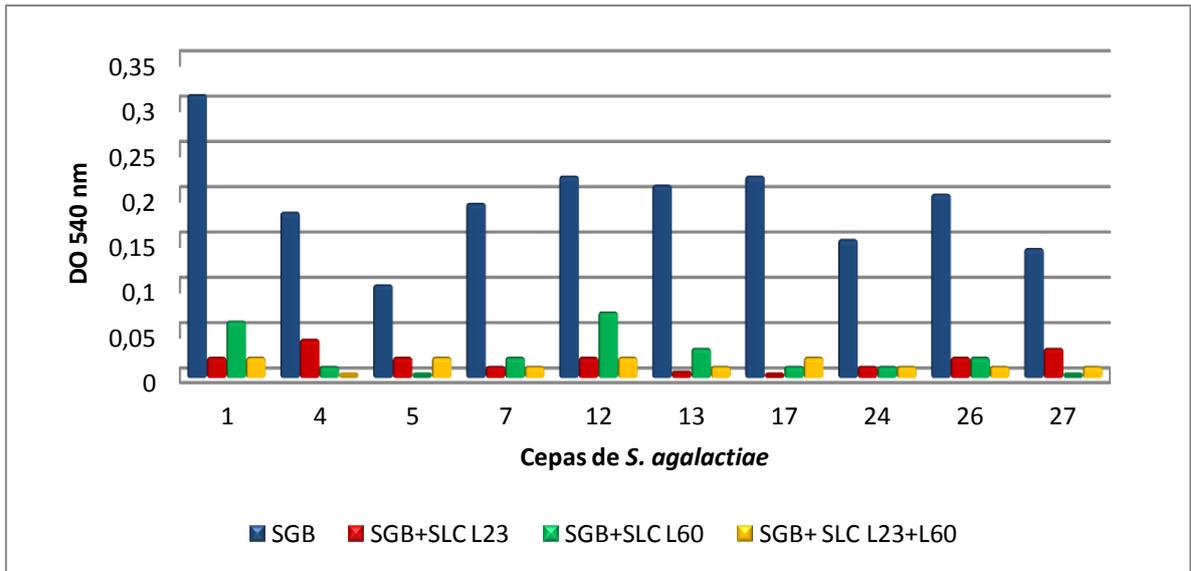
Cepa	Cultivo SGB	SGB tratado con SLC L60		SGB tratado con SLC L60 neutralizado	
		DO	Porcentaje de inhibición (%)	DO	Porcentaje de inhibición (%)
1	0.31±0.03	0.06±0.03	80.6	0.04±0.03	87.09
2	0.08±0.01	0.02±0.01	75	0.005±0.01	93.7
3	0.30±0.03	0±0.03	100	0±0.03	100
4	0.18±0.02	0.01±0.02	94.4	0±0.02	100
5	0.10±0.02	0±0.02	100	0±0.02	100
6	0.19±0.01	0.02±0.01	89.4	0±0.01	100
7	0.19±0.02	0.02±0.01	89.4	0.002±0.01	98.9
8	0.21±0.03	0.003±0.03	98.5	0.003±0.03	98.5
9	0.22±0.01	0.002±0.01	99.09	0.0004±0.01	99.8
10	0.21±0.01	0.04±0.01	80.9	0±0.01	100
11	0.13±0.03	0.01±0.03	92.3	0.01±0.01	92.3
12	0.22±0.02	0.07±0.02	68.1	0±0.02	100
13	0.21±0.03	0.03±0.03	85.7	0.01±0.03	95.2
14	0.19±0.03	0.03±0.03	84.2	0.01±0.03	94.7
15	0.15±0.03	0.01±0.03	93.3	0.001±0.03	99.3
16	0.18±0.02	0.01±0.02	94.4	0.01±0.02	94.4
17	0.22±0.02	0.01±0.02	95.4	0±0.02	100
18	0.15±0.03	0.04±0.03	73.3	0.01±0.03	93.3
19	0.33±0.03	0.01±0.03	96.9	0±0.03	100
20	0.17±0.01	0±0.01	100	0±0.01	100
21	0.22±0.02	0.03±0.01	86.6	0.02±0.02	90.9
22	0.19±0.04	0.01±0.04	94.7	0±0.04	100
23	0.09±0.01	0±0.01	100	0±0.01	100
24	0.15±0.02	0.01±0.02	93.3	0±0.02	100
25	0.32±0.02	0±0.02	100	0±0.02	100
26	0.20±0.03	0.02±0.03	90	0.01±0.03	95
27	0.14±0.01	0±0.01	100	0±0.01	100
28	0.12±0.02	0.01±0.02	91.6	0.01±0.02	91.6
29	0.16±0.01	0.02±0.01	87.5	0±0.01	100
30	0.20±0.04	0.01±0.04	95	0±0.04	100
$\bar{x}$	0.191	0.017±0.003	91.09	0.005±0.001	97.3

---

Los resultados encontrados en este trabajo difieren con los reportados por Söderling y col. (2010), quienes observaron una reducción de la producción de biofilm de *S. mutans* del 77 al 92% en presencia del sobrenadante libre de células (pH= 4.0) de *L. rhamnosus* GG, sin embargo, este efecto desapareció al llevar el pH del sobrenadante a 4.8, lo que indica que la actividad antimicrobiana se debe a la producción de ácidos orgánicos y que esta cepa de lactobacilo no produce otra sustancia inhibitoria o que dicha sustancia no es activa a mayor pH.

### **5.1.3. Producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células combinado de ambos lactobacilos**

Con objeto de investigar el efecto producido por el sobrenadante libre de células combinado de ambos lactobacilos, se eligieron al azar 10 cepas de *S. agalactiae*, se agregaron 100 µl de SLC sin neutralizar de cada lactobacilo y se evaluó la producción de biofilm. La producción tratada con el sobrenadante combinado de ambos lactobacilos resultó ser significativamente menor, en comparación con el biofilm producido por el cultivo de *S. agalactiae* sin tratamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con el SLC combinado de L23 y L60 y la producción bajo el tratamiento con SLC de cada lactobacilo por separado. Estos resultados se observan en la figura 14. En la tabla 5 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos en este ensayo.



**Figura 14:** Producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con SLC de *L. rhamnosus* L23 y *L. fermentum* L60.

**Tabla 5:** Porcentajes de inhibición de la formación de biofilm de *S. agalactiae* por SLC de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.

Cepa	Porcentaje de inhibición SLC L23	Porcentaje de inhibición SLC L60	Porcentaje de inhibición SLC L23+SLC L60
1	93.5	80.6	93.5
4	77.7	94.4	100
5	80	100	80
7	94.7	89.4	94.7
12	90.9	68.1	90.9
13	98	85.7	95.2
17	100	95.4	90.9
24	93.3	93.3	93.3
26	90	90	95
27	78.7	100	92.8

En esta experiencia se observó una gran producción de biofilm de *S. agalactiae* en CTS a pH 7, pero al tratar el cultivo de SGB con SLC de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* (pH menor a 4.5), la producción del mismo resultó significativamente menor. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto inhibitorio del SLC sin neutralizar de *L. fermentum* L23 y el efecto del SLC sin neutralizar de *L. rhamnosus* L60 ( $p \leq 0,05$ ). Estos resultados concuerdan con los reportados por Borges y col. (2012), quienes reportaron una menor producción de biofilm a pH 4.2, en contraste con la producción observada a pH 6.5, subrayando el efecto de los ácidos sobre la producción de biofilm.

La inhibición en la producción de biofilm de *S. agalactiae* observada en este trabajo no solo se debe al bajo pH generado por los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos empleados, sino también a las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno producidos por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. Cuando se neutralizaron los SLC con NaOH se observó una reducción estadísticamente significativa en la producción de biofilm de *S. agalactiae* en comparación con el cultivo sin tratamiento. Debido a que el efecto de los ácidos orgánicos fue neutralizado, la reducción en la producción de biofilm de *S. agalactiae* observada se atribuye directamente a la acción de las bacteriocinas y, en el SLC de *L. rhamnosus* L60, también al peróxido de hidrógeno. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto inhibitorio de ambos SLC neutralizados ( $p \leq 0,05$ ).

Estos resultados sobre el efecto inhibitorio de la formación de biofilm de SGB no coinciden con los informados por Juárez Tomás y col. (2002), quienes observaron que la inhibición solo se debió a la producción de ácido láctico, ya que el efecto inhibitorio no se observó al neutralizar el SLC de lactobacilos.

Existen pocas reseñas bibliográficas que evidencien el efecto de las bacteriocinas y el  $H_2O_2$  sobre la formación de biofilm. Numerosas investigaciones destacan el efecto del pH ácido, en comparación con el pH neutro, en la producción de biofilm (Borges y col., 2012; Ho y col., 2012; Yang y col., 2012). Numerosos investigadores han publicado alternativas para prevenir la formación de biofilms bacterianos, tales como inhibidores químicos, clorexidina, antisépticos o recubrimientos metálicos de titanio y plata. Además, considerando que unos de los problemas asociados con infecciones por microorganismos productores de biofilm es la baja sensibilidad de estos microorganismos a los antimicrobianos utilizados, es importante destacar el efecto de las sustancias antimicrobianas producidas por las

---

cepas probióticas L23 y L60 sobre el crecimiento del microorganismo y la formación de biofilm (Pascual y col., 2008 a, b; Pascual y Barberis, 2010).

# Conclusiones:

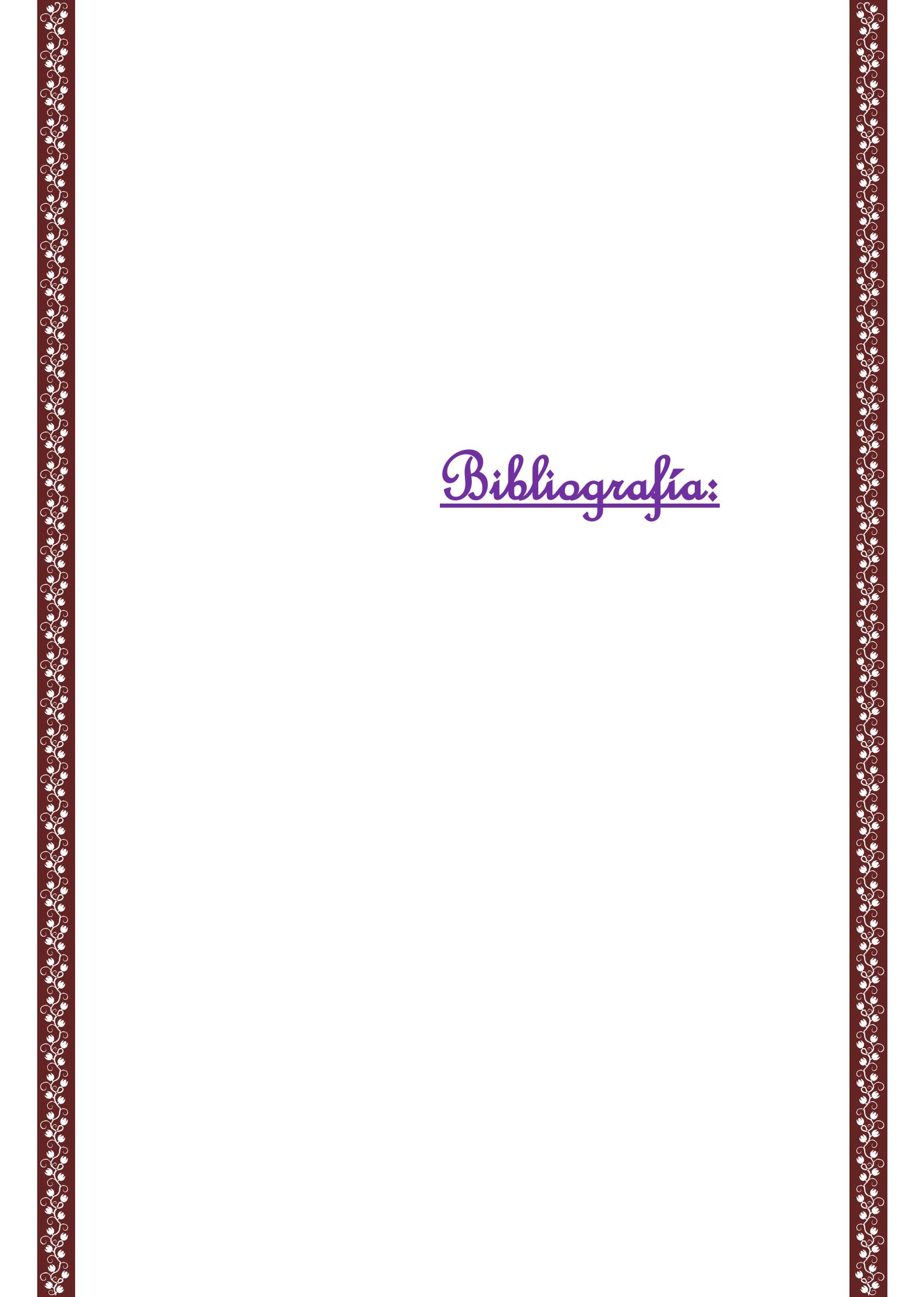
---

## 6. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de *S. agalactiae* estudiadas fueron capaces de producir biofilm *in vitro*.
- La producción de biofilm de *S. agalactiae* no mostró variaciones cuando se emplearon diferentes DO del inóculo y tiempos de incubación.
- Las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por *L. fermentum* y *L. rhamnosus* inhibieron casi en su totalidad la formación de biofilm de *S. agalactiae*.
- La mayor inhibición en la formación de biofilm fue debido a la producción de bacteriocinas.
- Se observó un efecto limitado de los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos ensayados sobre la formación de biofilm de *S. agalactiae*.
- El SLC combinado de ambos lactobacilos no mostró efecto sinérgico sobre la formación de biofilm de *S. agalactiae*.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Este estudio demostró que los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* inhibieron la formación de biofilm de *Streptococcus agalactiae*. Futuros estudios podrían avalar la utilización de estas dos cepas de lactobacilos probióticos como una alternativa terapéutica para el control de la colonización vaginal por SGB en mujeres sexualmente activas.



# Bibliografía:

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Atassi, F., Servin, A. L. 2010. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. FEMS. Microbiology Letters 304:29–38.

Arif, S. K. 2010. Inhibition of microbial biofilm on different surfaces treated with biosurfactant from *Lactobacillus* spp. Journal of Kirkuk University –Scientific Study1(7):24-34.

Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Gombossy de Melo Franco, B. D., Converti, A., Pinheiro de Souza Oliveira, R. 2012. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control 32:134-142.

Barcaite, E., Bartusevicius, A., Tameliene, R., Maleckiene, L., Vitkauskiene, A., Nadisauskiene, R. 2011. Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* colonization in pregnant women and neonates in Lithuania. International Journal of Gynaecology and Obstetrics 117:69–73.

Bordi, C., de Bentzmann, S. 2011. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. Annals of Intensive Care 1:19.

Borges, S., Silva, J., Teixeira, P. 2012. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. Antonie van Leeuwenhoek 101:677–682.

Boris, S., Suárez, J., Vazquez, F., Barbés, C. 1998. Adherence of human lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. Infection and Immunity 66(5):1985– 1989.

Camisassa, L., Fando, E. 2011. *Streptococcus agalactiae*, estudio de portación en embarazadas y Ley Nacional nº 26.369/2008. Una estrategia de prevención. Hospital Domingo Funes, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba. Villa Caero, Córdoba, Argentina. c. p. 5164. <http://www.cobico.com.ar/wp-content/archivos/300412-STREPTOCOCCUS-AGALACTIAE.pdf>.

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal Group B Streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. Recommendations and reports 51(11):1-22. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5111a1.htm>.

- Chung, J., Ha, E.S., Park, H.R., Kim, S. 2004. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiology and Immunology* 19:214-216.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226:1065–1073. DOI:10.1007/s00217-007-0632-x.
- Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., Forestier, C. 2008. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. Hindawi Publishing Corporation. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynaecology* Article ID 549640, DOI:10.1155/2008/549640.
- Cribby, S., Taylor, M., Reid, G. 2008. Vaginal microbiota and the use of probiotics. Hindawi Publishing Corporation. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease*. Article ID 256490 DOI:10.1155/2008/256490.
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H., Ellen, R., P. 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation* 112:1626–1632. DOI:10.1172/JCI200320430.
- Daniele, M., Ruíz, F., Pascual, L., Barberis, L. 2011. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Sensitivity to Bacteriocins Produced by Two Lactobacilli Strains. *Current Microbiology* 63:360–365 DOI:10.1007/s00284-011-9989-y.
- Dash, S.K. 2009. Selection criteria for probiotics. Presentado en XXXVII Dairy Industry Conference, Febrero de 2009, Kala Academy, Panjim, Goa. <http://www.uaslabs.com/sections/newsletters/Selection%20Criteria%20for%20Probiotics-2009.pdf>.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hillb, C. 2011. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied and Environmental Microbiology* 1-6. DOI:10.1128/AEM.05576-11.
- Donders, G., Bellen, G., Rezeberga, D. 2011. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG. International Journal of Obstetrics and Gynecology*. 118: 1163–1170.
- Donlan, R. M., Costerton, W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Review* 15(2):167-193.
- Dover, S.E., Aroutcheva, A.A., Faro, S., Chikindas, M. E. 2010. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 3(4):219–230.
- Dramsi, S., Morello, E., Poyart, C., Trieu-Cuot, P. 2012. Epidemiologically and clinically relevant Group B *Streptococcus* isolates do not bind collagen but display

enhanced binding to human fibrinogen. Artículo en impresión. *Microbes and Infections*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.004>.

Farley, M.M. 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases* 33:556–561.

Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., Martinotti, M.G. 2010. A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* A. Menendez-Vilas (Ed). <http://www.formatex.info/microbiology2/827-837.pdf>

Fry, R .M. 1938. Fatal infections by haemolytic *Streptococcus* group B. *Lancet* 1:199-201.

Guillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(4): 591–606. DOI:10.1007/s00253-008-1726-5.

Ho, Y.R., Li, C.M., Yu, C.H., Lin, Y.J., Wu, C.M., Harn, I.C., Chen, Y.T., Shen, F.C., Lu, C.Y., Tsai, T.C., Wu, J.J. 2012. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. *Medical Microbiology and Immunology*. DOI:10.1007/s00430-012-0255-0.

Juárez Tomás, M.S., Ocaña, V.S., Wiese, B., Nader-Macías, M.E. 2002. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 52:1117–1124.

Kaplan, J.B. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal Dental Reserch* 89(3):205-218.

Kaur, H., Kumar, P., Ray, P., Kaur, J., Chakraborti, A. 2009. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. *Microbial Pathogens* 46:321–327.

Konto-Ghiorghi Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S. 2009. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS. Pathogens* 5:e1000422.

Kwasny, S.M., Opperman, T.J. 2010. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Current Protocol in Pharmacology* 50: 13A.8.1–13A.8.23.

Lancefield, R.C. 1932. Serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. <http://www.jem.rupress.org>.

Li, Y.H., Tian, X. 2012. Quorum Sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12:2519-2538. DOI:10.3390/s120302519.

- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., Areschoug, T. 2005. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 18(1):102. DOI:10.1128/CMR.18.1.102-127.2005.
- Martín, R., Suárez, J.R. 2009. Biosynthesis and Degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Vaginal Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 76(2):400-405.
- Matu, M.N., Orinda, G.O., Njagi, E.N.M., Cohen, C.R., Bukusi, E.A. 2009. *In vitro* inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Elsevier Anaerobes* 16: 210-215.
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?. *The Veterinary Journal* 171:398–407.
- Merk, K., Borelli, C., Korting, H.C. 2004. Lactobacilli – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medical Microbiology* 295: 9–18.
- Ocaña, V.S., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., Nader-Macías, M.E. 1998. Selection of vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Current Microbiology* 38: 279–284.
- Oelschlaeger, T.A. 2010. Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology* 300:57–62.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *The Canadian Journal of Veterinary Reserch* 66:86-92.
- Ozkinay, E., Terek, M.C., Yayci, M., Kaiser, R., Grob, P., Tuncay, G. 2005. The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112:234–240.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Pájaro, C., Barberis, L. 2006. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception* 73:78– 81.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Ruíz, F.O., Pájaro, M.C., Barberis, I.L. 2008a. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from human vagina. *Journal of Genetics and Applied Microbiology* 54:41-48.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro, M.C., Barberis, I.L. 2008b. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* 56:397–402 DOI:10.1007/s00284-007-9094-4.

- Pascual, L., Barberis, L. 2010. Prevention strategy of urogenital infections by using lactobacilli with probiotic properties. *Urinary Tract Infections Chapter 14*, 245-265.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews* 16(4):658–672.
- Rinaudo, C.D., Rosini, R., Galeotti, C.L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., Ghezzi, C., Telford, J.L., Grandi, G., Maione, D. 2010. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in Group B *Streptococcus*. *PLoS ONE* 5(2): e9216. DOI:10.1371/journal.pone.0009216.
- Rodríguez, L., Banat, I. M., Teixeira, J., Oliveira, R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1-10. DOI:10.1093/jac/dkl024.
- Rodríguez Fernández, O.M., Sanchén Casas, A., Cordero Rodríguez, M., Deus Cabrera, J. 2008. Meningoencefalitis bacteriana por *Streptococcus agalactiae*. Reporte de un caso. *Casos Clínicos. Revista Archivo Médico de Camagüey* 12(3).
- Ruiz, F.O., Gerbaldo, G., García, M.J., Giordano, W., Pascual, L., Barberis, I.L. 2011. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactobacilli strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Current Microbiology* 64:349–356 DOI:10.1007/s00284-011-0077-0.
- Sad Larcher, J., Capellino, F., de Justo, R., Travella, C., Gomez Balangione, F., Kreiker, G., Prats Cardona, H., Zárate, A., Vilaro, M., Hernández, D., Ruiz Orrico, G. 2005. Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo B durante el embarazo y prevención de enfermedad neonatal. *Medicina (Buenos Aires)* 65:201-206.
- Sheen, T.R., Jimenez, A., Wang, N.Y., Banerjee, A., van Sorge, N.I., Doran, K.S. 2011. Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. *Journal of Bacteriology* 24(193):6834–6842. DOI:10.1128/jb.00094-11.
- Söderling, E.M., Marttinen, A.M., Haukioja, A.L. 2010. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation *In vitro*. *Current Microbiology* 62:618–622. DOI:10.1007/s00284-010-9752-9.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex Differentiated communities. *Annual Reviews Microbiology* 56:187–209. DOI:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Tazi, A., Bellais, S., Tardieux, I., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C. 2011. Group B *Streptococcus* surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Current Opinions In Microbiology* 15:44-49.

- Velraeds, M.M.C., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6):1958–1963.
- Velraeds, M.M.C., van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. 1998. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *Journal of Medical Microbiology* 47:1081-1085.
- Vielfort, K., Sjölander, H., Roos, S., Jonsson, H., Aro, H. 2008. Adherence of clinically isolated lactobacilli to human cervical cells in competition with *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbes and Infection* 10:1325e1334.
- Walencka, E., Różalska, S., Sadowskaa, B., Różalska, B. 2007. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiology* 53(1):61–66.
- Watnick, P., Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182(10):2675-2679.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions Royal Society Biological Sciences* 362:1119-1134.
- World Health Organization and Food and agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO). 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html).
- Yang, Q., Porter, A.J., Zhang, M., Harrington, D.J., Black, G.W., Stueliffe, I.C. 2012. The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of *Streptococcus agalactiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 102:277–287.
- Zárate, G., Nader-Macias, M.E. 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology* 43:174–180.

Anexo

estadístico:

## ANEXO ESTADÍSTICO

Análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher de la concentración de inóculo

### **Análisis de la varianza cepa 1**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	6	0,49	0,37	29,22	

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	3,92	0,1189
Inóculo	0,02	1	0,02	3,92	0,1189
Error	0,02	4	0,01		
Total	0,04	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,16415**

Error: 0,0052 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,31	3	0,04 A
1 MF	0,19	3	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza cepa 6**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	6	0,13	0,00	18,21	

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,8E-04	1	6,8E-04	0,62	0,4760
Inóculo	6,8E-04	1	6,8E-04	0,62	0,4760
Error	4,4E-03	4	1,1E-03		
Total	0,01	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07540**

Error: 0,0011 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,19	3	0,02 A
1 MF	0,17	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza cepa 7**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	6	0,36	0,20	31,35	

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	1	0,01	2,23	0,2095
Inóculo	0,01	1	0,01	2,23	0,2095
Error	0,01	4	2,5E-03		
Total	0,02	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11275**

Error: 0,0025 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,19	3	0,03 A
1 MF	0,13	3	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 8**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,34	0,18	54,21

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	2,08	0,2225
Inóculo	0,02	1	0,02	2,08	0,2225
Error	0,03	4	0,01		
Total	0,04	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,19497**

Error: 0,0074 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,21	3	0,05 A
1 MF	0,11	3	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 15**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,06	0,00	75,11

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,2E-03	1	2,2E-03	0,24	0,6513
Inóculo	2,2E-03	1	2,2E-03	0,24	0,6513
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,04	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,21823**

Error: 0,0093 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,15	3	0,06 A
1 MF	0,11	3	0,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 22**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,03	0,00	49,68

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,4E-03	1	1,4E-03	0,13	0,7365
Inóculo	1,4E-03	1	1,4E-03	0,13	0,7365
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,04	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,23089**

Error: 0,0104 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,19	3	0,06 A
1 MF	0,16	3	0,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 26**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,57	0,47	13,96

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,5E-03	1	4,5E-03	5,36	0,0816
Inóculo	4,5E-03	1	4,5E-03	5,36	0,0816
Error	3,4E-03	4	8,5E-04		
Total	0,01	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06598**

Error: 0,0008 gl: 4

Inóculo	Medias	n	E.E.
0,5 MF	0,20	3	0,02 A
1 MF	0,18	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher del tiempo de incubación**

#### **Análisis de la varianza cepa 1**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,33	0,16	38,02

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	1,99	0,2314
Tiempo	0,02	1	0,02	1,99	0,2314
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,05	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,21664**

Error: 0,0091 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,31	3	0,06 A
24 h	0,20	3	0,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 6**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,23	0,03	33,04

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,7E-03	1	3,7E-03	1,18	0,3392
Tiempo	3,7E-03	1	3,7E-03	1,18	0,3392
Error	0,01	4	3,1E-03		

Total 0,02 5

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12632**

Error: 0,0031 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,19	3	0,03 A
24 h	0,14	3	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 7

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,04	0,00	49,61

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,4E-03	1	1,4E-03	0,18	0,6922
Tiempo	1,4E-03	1	1,4E-03	0,18	0,6922
Error	0,03	4	0,01		
Total	0,03	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,19567**

Error: 0,0075 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,19	3	0,05 A
24 h	0,16	3	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 8

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,41	0,27	53,62

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	2,83	0,1679
Tiempo	0,02	1	0,02	2,83	0,1679
Error	0,03	4	0,01		
Total	0,05	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,18599**

Error: 0,0067 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,21	3	0,05 A
24 h	0,10	3	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 15

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,09	0,00	73,16

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,2E-03	1	3,2E-03	0,39	0,5661
Tiempo	3,2E-03	1	3,2E-03	0,39	0,5661
Error	0,03	4	0,01		
Total	0,04	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,20594**

Error: 0,0083 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,15	3	0,05 A
24 h	0,10	3	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 22**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,14	0,00	55,43

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	1	0,01	0,68	0,4573
Tiempo	0,01	1	0,01	0,68	0,4573
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,05	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,23310**

Error: 0,0106 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,19	3	0,06 A
24 h	0,15	3	0,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 26**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	6	0,45	0,31	17,34

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,3E-03	1	4,3E-03	3,24	0,1464
Tiempo	4,3E-03	1	4,3E-03	3,24	0,1464
Error	0,01	4	1,3E-03		
Total	0,01	5			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08231**

Error: 0,0013 gl: 4

Tiempo	Medias	n	E.E.
6 h	0,20	3	0,02 A
24 h	0,18	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher de la producción de biofilm de *S. agalactiae*

#### **Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	90	0,45	0,18	44,37

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,34	29	0,01	1,66	0,0486
Cepa	0,34	29	0,01	1,66	0,0486
Error	0,43	60	0,01		
Total	0,77	89			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,13771**

Error: 0,0071 gl: 60

Cepa	Medias	n	E.E.				
19	0,33	3	0,05	A			
25	0,32	3	0,05	A	B		
1	0,31	3	0,05	A	B	C	
3	0,30	3	0,05	A	B	C	
12	0,22	3	0,05	A	B	C	D
21	0,22	3	0,05	A	B	C	D
9	0,22	3	0,05	A	B	C	D
17	0,22	3	0,05	A	B	C	D
10	0,21	3	0,05	A	B	C	D
8	0,21	3	0,05	A	B	C	D
13	0,21	3	0,05	A	B	C	D
26	0,20	3	0,05	A	B	C	D
30	0,20	3	0,05	A	B	C	D
6	0,19	3	0,05	A	B	C	D
7	0,19	3	0,05	A	B	C	D
22	0,19	3	0,05		B	C	D
14	0,19	3	0,05		B	C	D
16	0,18	3	0,05			C	D
4	0,18	3	0,05			C	D
20	0,17	3	0,05			C	D
29	0,16	3	0,05				D
24	0,15	3	0,05				D
18	0,15	3	0,05				D
15	0,15	3	0,05				D
27	0,14	3	0,05				D
11	0,13	3	0,05				D
28	0,12	3	0,05				D
5	0,10	3	0,05				D
23	0,09	3	0,05				D
2	0,08	3	0,05				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher de la producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*

**Análisis de la varianza cepa 1**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,89	0,84	59,43

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,19	4	0,05	19,44	0,0001
Tratamiento	0,19	4	0,05	19,44	0,0001
Error	0,02	10	2,5E-03		
Total	0,22	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09032**

Error: 0,0025 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,31	3	0,03	A
SGB+SLC L60	0,06	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	0,04	3	0,03	B
SGB+SLC L23	0,02	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 2**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,76	0,66	81,00

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	4	3,3E-03	7,87	0,0039
Tratamiento	0,01	4	3,3E-03	7,87	0,0039
Error	4,2E-03	10	4,2E-04		
Total	0,02	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,03743**

Error: 0,0004 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,08	3	0,01	A
SGB+SLC L60	0,02	3	0,01	B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,01	B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,01	B
SGB+SLCN L60	5,0E-03	3	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 3**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,92	0,88	73,83

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,22	4	0,05	27,52	<0,0001
Tratamiento	0,22	4	0,05	27,52	<0,0001
Error	0,02	10	2,0E-03		
Total	0,24	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08113**

Error: 0,0020 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,30	3	0,03	A
SGB+SLC L23	0,00	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 4**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,90	0,85	62,80

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	4	0,02	21,57	0,0001
Tratamiento	0,07	4	0,02	21,57	0,0001
Error	0,01	10	7,9E-04		
Total	0,08	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05111**

Error: 0,0008 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,18	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,04	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**Análisis de la varianza cepa 5**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,75	0,64	104,93

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	4	0,01	7,33	0,0050
Tratamiento	0,02	4	0,01	7,33	0,0050
Error	0,01	10	7,4E-04		
Total	0,03	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04951**

Error: 0,0007 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,10	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**Análisis de la varianza cepa 6**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,94	0,92	40,84

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	4	0,02	40,52	<0,0001
Tratamiento	0,08	4	0,02	40,52	<0,0001
Error	4,9E-03	10	4,9E-04		
Total	0,08	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04017**

Error: 0,0005 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,19	3	0,01	A
SGB+SLC L23	0,06	3	0,01	B
SGB+SLC L60	0,02	3	0,01	B C
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01	C
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 7

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,93	0,90	55,69

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	4	0,02	32,79	<0,0001
Tratamiento	0,08	4	0,02	32,79	<0,0001
Error	0,01	10	6,0E-04		
Total	0,09	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04471

Error: 0,0006 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,19	3	0,01 A
SGB+SLC L60	0,02	3	0,01 B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,01 B
SGB+SLCN L60	2,3E-03	3	0,01 B
SGB+SLCN L23	1,7E-03	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 8

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,80	0,71	119,25

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	4	0,03	9,75	0,0018
Tratamiento	0,10	4	0,03	9,75	0,0018
Error	0,03	10	2,7E-03		
Total	0,13	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09372

Error: 0,0027 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,21	3	0,03 A
SGB+SLCN L60	3,7E-03	3	0,03 B
SGB+SLC L60	3,0E-03	3	0,03 B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03 B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 9

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,99	0,98	28,88

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,11	4	0,03	173,75	<0,0001
Tratamiento	0,11	4	0,03	173,75	<0,0001
Error	1,6E-03	10	1,6E-04		
Total	0,11	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,02316**

Error: 0,0002 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,22	3	0,01 A
SGB+SLC L60	2,3E-03	3	0,01 B
SGB+SLC L23	6,7E-04	3	0,01 B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,01 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 10**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,97	0,95	37,00

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	4	0,03	73,53	<0,0001
Tratamiento	0,10	4	0,03	73,53	<0,0001
Error	3,4E-03	10	3,4E-04		
Total	0,10	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,03366**

Error: 0,0003 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,21	3	0,01 A
SGB+SLC L60	0,04	3	0,01 B
SGB+SLC L23	3,0E-03	3	0,01 B C
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,01 C
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 11**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,65	0,51	149,36

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	4	0,01	4,58	0,0233
Tratamiento	0,04	4	0,01	4,58	0,0233
Error	0,02	10	2,0E-03		
Total	0,06	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08206**

Error: 0,0020 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,13	3	0,03 A
SGB+SLC L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03 B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 12

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna2	15	0,84	0,78	66,83

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	4	0,02	13,58	0,0005
Columnal	0,10	4	0,02	13,58	0,0005
Error	0,02	10	1,8E-03		
Total	0,12	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07773

Error: 0,0018 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.
SGB	0,22	3	0,02 A
SGB+SLC L60	0,07	3	0,02 B
SGB+SLC L23	0,02	3	0,02 B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,02 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,81	0,73	95,33

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	4	0,02	10,46	0,0013
Tratamiento	0,10	4	0,02	10,46	0,0013
Error	0,02	10	2,3E-03		
Total	0,12	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08707

Error: 0,0023 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,21	3	0,03 A
SGB+SLC L60	0,03	3	0,03 B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLC L23	4,0E-03	3	0,03 B
SGB+SLCN L23	1,7E-03	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,72	0,61	92,69

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	4	0,02	6,41	0,0080
Tratamiento	0,07	4	0,02	6,41	0,0080
Error	0,03	10	2,5E-03		
Total	0,09	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09174**

Error: 0,0025 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,19	3	0,03	A
SGB+SLC L60	0,03	3	0,03	B
SGB+SLC L23	0,03	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 15**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,59	0,43	164,10

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	4	0,01	3,61	0,0452
Tratamiento	0,05	4	0,01	3,61	0,0452
Error	0,03	10	3,2E-03		
Total	0,08	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10349**

Error: 0,0032 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,15	3	0,03	A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,03	B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	1,3E-03	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 16**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,81	0,74	95,51

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	4	0,02	10,89	0,0012
Tratamiento	0,07	4	0,02	10,89	0,0012
Error	0,02	10	1,6E-03		
Total	0,08	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07240**

Error: 0,0016 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,18	3	0,02	A
SGB+SLC L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 17

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,90	0,86	80,57	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,11	4	0,03	21,67	0,0001
Tratamiento	0,11	4	0,03	21,67	0,0001
Error	0,01	10	1,3E-03		
Total	0,12	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06508

Error: 0,0013 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,22	3	0,02	A
SGB+SLC L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,02	B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 18

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,64	0,50	122,79	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	4	0,01	4,53	0,0241
Tratamiento	0,05	4	0,01	4,53	0,0241
Error	0,03	10	2,5E-03		
Total	0,07	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09144

Error: 0,0025 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,15	3	0,03	A
SGB+SLC L60	0,04	3	0,03	B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	3,3E-04	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 19

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,92	0,88	66,57	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,25	4	0,06	27,75	<0,0001
Tratamiento	0,25	4	0,06	27,75	<0,0001
Error	0,02	10	2,2E-03		
Total	0,27	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08559**

Error: 0,0022 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,33	3	0,03	A
SGB+SLC L23	0,01	3	0,03	B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,03	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,03	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza cepa 20**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,93	0,90	67,92

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	4	0,02	32,52	<0,0001
Tratamiento	0,07	4	0,02	32,52	<0,0001
Error	0,01	10	5,6E-04		
Total	0,08	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04300**

Error: 0,0006 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,17	3	0,01	A
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,01	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,01	B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza cepa 21**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,88	0,83	69,68

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	4	0,03	17,67	0,0002
Tratamiento	0,10	4	0,03	17,67	0,0002
Error	0,01	10	1,4E-03		
Total	0,12	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06905**

Error: 0,0014 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,22	3	0,02	A
SGB+SLC L60	0,03	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,02	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,02	B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 22

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,59	0,42	172,21	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	4	0,02	3,56	0,0469
Tratamiento	0,08	4	0,02	3,56	0,0469
Error	0,06	10	0,01		
Total	0,13	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,13556

Error: 0,0056 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,19	3	0,04	A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,04	B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,04	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,04	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 23

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,91	0,87	67,41	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	4	4,7E-03	24,34	<0,0001
Tratamiento	0,02	4	4,7E-03	24,34	<0,0001
Error	1,9E-03	10	1,9E-04		
Total	0,02	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,02534

Error: 0,0002 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,09	3	0,01	A
SGB+SLC L23	0,01	3	0,01	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01	B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,01	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 24

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,87	0,81	79,05	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	4	0,01	16,40	0,0002
Tratamiento	0,05	4	0,01	16,40	0,0002
Error	0,01	10	7,6E-04		
Total	0,06	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05005**

Error: 0,0008 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,15	3	0,02 A
SGB+SLC L23	0,01	3	0,02 B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,02 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02 B
SGB+SLCN L23	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 25**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,93	0,90	61,18

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,24	4	0,06	33,50	<0,0001
Tratamiento	0,24	4	0,06	33,50	<0,0001
Error	0,02	10	1,8E-03		
Total	0,26	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07717**

Error: 0,0018 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,32	3	0,02 A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,02 B
SGB+SLCN L23	1,7E-03	3	0,02 B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 26**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,78	0,70	91,48

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	4	0,02	9,08	0,0023
Tratamiento	0,08	4	0,02	9,08	0,0023
Error	0,02	10	2,3E-03		
Total	0,11	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08788**

Error: 0,0023 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,20	3	0,03 A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,03 B
SGB+SLC L60	0,02	3	0,03 B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### **Análisis de la varianza cepa 27**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,87	0,81	69,80

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	4	0,01	16,19	0,0002
Tratamiento	0,04	4	0,01	16,19	0,0002
Error	0,01	10	6,1E-04		
Total	0,05	14			

### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04495

Error: 0,0006 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,14	3	0,01	A
SGB+SLC L23	0,03	3	0,01	B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,01	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,01	B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 28

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,74	0,64	95,42	

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	4	0,01	7,13	0,0055
Tratamiento	0,03	4	0,01	7,13	0,0055
Error	0,01	10	9,6E-04		
Total	0,04	14			

### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05648

Error: 0,0010 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,12	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,02	B
SGB+SLCN L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLCN L23	0,01	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 29

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	15	0,91	0,87	50,69	

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	4	0,01	25,16	<0,0001
Tratamiento	0,05	4	0,01	25,16	<0,0001
Error	0,01	10	5,1E-04		
Total	0,06	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04100**

Error: 0,0005 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,16	3	0,01 A
SGB+SLC L60	0,02	3	0,01 B
SGB+SLCN L23	0,02	3	0,01 B
SGB+SLC L23	0,02	3	0,01 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Análisis de la varianza cepa 30**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	15	0,63	0,49	128,99

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	4	0,02	4,30	0,0280
Tratamiento	0,08	4	0,02	4,30	0,0280
Error	0,05	10	4,7E-03		
Total	0,13	14			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12484**

Error: 0,0047 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,20	3	0,04 A
SGB+SLC L23	0,05	3	0,04 B
SGB+SLCN L23	0,02	3	0,04 B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,04 B
SGB+SLCN L60	0,00	3	0,04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher de la producción de biofilm de *S. agalactiae* tratado con sobrenadante libre de células de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* combinado

### **Análisis de la varianza cepa 1**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,88	0,84	58,42

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,18	3	0,06	19,91	0,0005
Tratamiento	0,18	3	0,06	19,91	0,0005
Error	0,02	8	3,0E-03		
Total	0,20	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10358**

Error: 0,0030 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,31	3	0,03 A
SGB+SLC L60	0,04	3	0,03 B
SGB+SLC L23	0,02	3	0,03 B
SGB+SLC L23+L60	0,02	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 4

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	12	0,90	0,86	56,20	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	3	0,02	23,94	0,0002
Tratamiento	0,06	3	0,02	23,94	0,0002
Error	0,01	8	8,9E-04		
Total	0,07	11			

#### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05617

Error: 0,0009 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,18	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,04	3	0,02	B
SGB+SLC L23+L60	0,00	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 5

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	12	0,70	0,59	92,10	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	3	0,01	6,35	0,0165
Tratamiento	0,02	3	0,01	6,35	0,0165
Error	0,01	8	9,7E-04		
Total	0,03	11			

#### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05867

Error: 0,0010 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,10	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,02	B
SGB+SLC L23+L60	0,02	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 7

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Producción biofilm	12	0,95	0,93	42,90	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	3	0,02	48,40	<0,0001
Tratamiento	0,07	3	0,02	48,40	<0,0001
Error	4,1E-03	8	5,1E-04		
Total	0,08	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04261**

Error: 0,0005 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,19	3	0,01 A
SGB+SLC L23+L60	0,01	3	0,01 B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,01 B
SGB+SLC L60	2,3E-03	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 12

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,87	0,82	69,90

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	3	0,03	18,06	0,0006
Tratamiento	0,10	3	0,03	18,06	0,0006
Error	0,01	8	1,8E-03		
Total	0,11	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08072**

Error: 0,0018 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,22	3	0,02 A
SGB+SLC L23+L60	0,02	3	0,02 B
SGB+SLC L23	0,01	3	0,02 B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,84	0,78	82,68

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,09	3	0,03	14,32	0,0014
Tratamiento	0,09	3	0,03	14,32	0,0014
Error	0,02	8	2,2E-03		
Total	0,11	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08757**

Error: 0,0022 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,21	3	0,03 A
SGB+SLC L23+L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLC L23	4,0E-03	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza cepa 17

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,88	0,84	68,01

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	3	0,03	20,44	0,0004
Tratamiento	0,10	3	0,03	20,44	0,0004
Error	0,01	8	1,6E-03		
Total	0,11	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07587**

Error: 0,0016 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,22	3	0,02 A
SGB+SLC L23+L60	0,02	3	0,02 B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02 B
SGB+SLC L23	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**Análisis de la varianza cepa 24**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,86	0,80	71,51

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	3	0,02	15,96	0,0010
Tratamiento	0,05	3	0,02	15,96	0,0010
Error	0,01	8	9,5E-04		
Total	0,05	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05801**

Error: 0,0009 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,15	3	0,02 A
SGB+SLC L23	0,01	3	0,02 B
SGB+SLC L23+L60	0,01	3	0,02 B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**Análisis de la varianza cepa 26**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,79	0,71	82,34

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	3	0,03	10,16	0,0042
Tratamiento	0,08	3	0,03	10,16	0,0042
Error	0,02	8	2,6E-03		
Total	0,10	11			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09613**

Error: 0,0026 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SGB	0,20	3	0,03 A
SGB+SLC L23	0,02	3	0,03 B
SGB+SLC L23+L60	0,01	3	0,03 B
SGB+SLC L60	0,01	3	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza cepa 27

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Producción biofilm	12	0,85	0,80	60,85

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	3	0,01	15,49	0,0011
Tratamiento	0,03	3	0,01	15,49	0,0011
Error	0,01	8	7,4E-04		
Total	0,04	11			

### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05127

Error: 0,0007 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SGB	0,14	3	0,02	A
SGB+SLC L23	0,03	3	0,02	B
SGB+SLC L23+L60	0,01	3	0,02	B
SGB+SLC L60	0,00	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )