



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**Estudio del efecto antimicrobiano presente en el sobrenadante de cultivo de
Lactobacillus kunkeei sobre el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*.**

Adolfo Sebastián Hernández Barboza

Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile
Año 2021



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE,
BIOTECNOLOGÍA**

**Estudio del efecto antimicrobiano presente en el sobrenadante de cultivo de
Lactobacillus kunkeei sobre el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*.**

Adolfo Sebastián Hernández Barboza

Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutora: Dra. Annette Nicole Trombert Leiva

Santiago - Chile
Año 2021

Dedico este trabajo de tesis a todos mis familiares y amigos, que me apoyaron y creyeron en mi incondicionalmente "semper fidelis". Y muy especialmente al poseedor del nombre que es sobre todo nombre.

Scientia est potentia. Dare scire. Scientia vincere tenebras. Nihil prius fide. Et cognoscetis veritatem et veritas liberabit vos.

Dixit, in iudicium ego in hunc mundum veni, ut, qui non vident, videant, et, qui vident, caeci fiant. Et ego sum teste horum verborum, et Spiritus Sanctus, qui dedit Deus qui oboedientibus sibi.

Deo gratias.

O laudate Dominum.

SOLO USO ACADÉMICO

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primera instancia aquellas honorables entidades institucionales y académicos involucrados en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Agradezco al Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, por ser mi *ab origine* en la construcción de mi Proyecto de Tesis, especialmente doy gracias *“ex animo”* a mi tutora Dra. Annette Trombert, por ser un componente esencial en mi formación académica y profesional, sino también, ser mi *“fluxit inspiratio attinens”* en abrazar la ciencia como neófito e iniciarme en la disciplina del conocimiento. Al Dr. Cristián Cortéz, por su asesoramiento en técnicas experimentales microbiana y colaboración instrumental de laboratorio, como también, al Dr. Mauricio Saez por colaborar con Proteinasa K y consejos en procedimientos peptídicos, y con gran estima, gracias a Sra. Maria Reveco, por ser la piedra angular en mis procedimientos experimentales, y ser fuente de carisma y amabilidad. Al Dr. Carlos Rosales por colaborar en conocimiento y análisis de variables.

Al Centro de Genómica, Ecología y Medio Ambiente de la Universidad Mayor, por contribuir con sus instalaciones y equipamiento. Gracias a Marlene Manzano, por contribuir en equipamiento y gestiones profesionales, especialmente al Dr. Sebastián Abades, por asesoramiento estadístico y sus enseñanzas en cátedra como en fuera de ella durante mi formación profesional y personal, así también, a la Dra. Daniela Rivera, por asesoramiento en software estadístico.

Gracias al estudiante de doctorado, Emiliano Vicencio, por colaborar con Tripsina y consejos de procedimientos de lisis celular.

Dr. Alonso Ferrer del Núcleo de Química y Bioquímica de la Universidad Mayor, por asesoramiento y colaboración en procedimientos de extracción y purificación, así también, a la Escuela de Biotecnología, especialmente a Dr. Jaime De Calisto, por sus consejos, dedicación y gestiones profesionales, y al Dr. Gonzalo Pradenas por gestiones de insumos de laboratorio.

-----*“Ad perpetuam rei memoriam”*.

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de Tesis se realizó en las dependencias del Centro de Genómica y Bioinformática, ubicado en el Campus Huechuraba de la Universidad Mayor en Santiago de Chile.

Financiamiento: Proyecto FDP PEP I-20 19060. Fondos para el Desarrollo de la Publicación de la Universidad Mayor.

SOLO USO ACADÉMICO

ABREVIATURAS

AmpC: Enzimas beta-lactamasas.

AU/mL: Unidades Activas por mililitro.

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*, caldo cerebro corazón.

BLEE: Enzimas beta-lactamasas de espectro extendido.

BLIS: Bacteriocin-like inhibitory substances, sustancias inhibitorias como bacteriocinas.

BLS: Bacteriocin-like substances, sustancias como bacteriocinas.

CDC: Centro para el Control y Prevencion de Enfermedades.

CFS: *Cell-Free Supernatants*; Sobrenadantes Libres de Células.

DO: Densidad Óptica.

FAO: Organización de Alimentación y Agricultura.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

FLAB: Bacterias del Ácido Láctico Fructifílico.

GRAS: *Generally Regarded As Safe*; Generalmente Considerada Como Segura.

HHS: Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos.

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.

ISP: Instituto de Salud Pública de Chile.

KDa: Kilo Dalton.

L. kunkeei: *Lactobacillus kunkeei*.

L. platarum: *Lactobacillus plantarum*.

L. rhamnosus: *Lactobacillus rhamnosus*.

LAB: Bacterias del Ácido Láctico.

LLI001: *Lactobacillus kunkeei* LLI001.

LLI002: *Lactobacillus kunkeei* LLI002.

LLI003: *Lactobacillus kunkeei* LLI003.

LLI005: *Lactobacillus kunkeei* LLI005.

LLP011: *Pseudomonas aeruginosa* LLP011, aislado clínico.

Lp: *Lactobacillus plantarum*.

MDR: *Multidrug-Resistance*; Multirresistencia a los antibióticos.

MexAB-OprM: Sistema de bomba de expulsión de múltiples antibióticos MexA, MexB y OprM.

Minsal: Ministerio de Salud de la República de Chile.

MP2: *Lactobacillus kunkeei* MP2.

MRS: *Man-Rogosa-Sharpe broth*; Caldo de Man, Rogosa y Sharpe.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

OprD: Outer Membrane Porin D; Porina D de membrana externa.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

PA14: *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

PDR: *Pandrug-Resistance*; Panresistencia a los antibióticos.

PM: Peso Molecular.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

WBC: Whole Bacterial Culture; Cultivo Completo Bacteriano.

XDR: Extensively Drug-Resistance; Resistencia Extendida a los antibióticos.

λ : Longitud de Onda.

SOLO USO ACADÉMICO

i. ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO.....	5
ABREVIATURAS.....	6
i. INDICE DE CONTENIDO.....	9
ii. INDICE DE TABLAS.....	11
iii. INDICE DE FIGURAS.....	12
iv. RESUMEN.....	13
v. SUMMARY.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Resistencia a los Antimicrobianos, Problemática e Implicancias.....	15
1.1.1. Realidad de Chile: Uso de Antibióticos, Prevención y Gestión de Patógenos Resistentes.....	16
1.1.2. Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos e Infecciones Intrahospitalarias en Chile.....	17
1.1.3. Enfoques y Plan de Acción de la Organización Mundial de la Salud.....	20
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	21
1.2.1. Mecanismos de Resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.3. Las Bacterias Ácido Lácticas (LAB).....	23
1.3.1. Péptidos Antimicrobianos.....	24
1.3.2. Bacteriocinas.....	24
1.3.3. <i>Lactobacillus kunkeei</i>	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1. Hipótesis.....	30
2.2. Objetivo General.....	30
2.2.1. Objetivo Específico 1.....	30
2.2.2. Objetivo Específico 2.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo.....	31
3.2. Ensayo de Inhibición en Placa Agar con Cultivo Completo Bacteriano (WBC) de <i>Lactobacillus spp</i>	31

3.3. Ensayo de Inhibición en Placa Agar con WBC y Sobrenadantes Libre de Células (CFS) de <i>L. kunkeei</i> y <i>L. plantarum</i> en MRS pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4.....	34
3.4. Ensayo de Inhibición en Curva de Crecimiento de CFS procedente de Monocultivo y Cocultivo.....	35
3.5. Tratamiento Enzimático y Tratamiento Térmico sobre las Mezclas CFS entre <i>L. kunkeei</i> LLI003, <i>L. plantarum</i> y <i>P. aeruginosa</i> LLP011.....	37
3.6. Análisis Estadístico.....	37
4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	38
4.1. Efecto Inhibitorio en Cultivos Completos Bacterianos de <i>Lactobacillus spp.</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Medio Sólido.....	38
4.2. Efecto Inhibitorio en Cultivos Completos Bacterianos y Sobrenadantes Libre de Células de <i>Lactobacillus spp.</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Medio Sólido y Líquido.....	40
4.3. Efecto Inhibitorio en Cultivo Líquido de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante Sobrenadante Libre de Células en Monocultivo y Cocultivo.....	44
4.4. Efecto Inhibitorio en Cultivo Líquido en especie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LLP011 mediante Sobrenadantes Libre de Células proveniente de Cocultivo tratadas con Enzimas y Temperatura.....	48
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
5.1. Búsqueda de Nuevos Compuestos Bioactivos Antimicrobianos contra Patógenos Resistentes a los Antibióticos.....	51
5.2. Efecto Antimicrobiano de <i>L. kunkeei</i> y <i>L. plantarum</i> sobre el Patógeno <i>P. aeruginosa</i>	53
5.3. Análisis del Efecto del Modelo de Cocultivo entre las cepas de <i>Lactobacillus</i> y las cepas de <i>P. aeruginosa</i> sobre la Actividad Antimicrobiana.....	56
5.4. Análisis del Efecto de la Temperatura y Proteasas en la Actividad Antimicrobiana contra <i>P. aeruginosa</i> sobre el Sobrenadante de Cocultivo <i>L. kunkeei</i> LLI003 y cepas de <i>P. aeruginosa</i>	58
6. CONCLUSIONES.....	61
7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES.....	62
8. REFERENCIAS.....	63
9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	82

ii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Susceptibilidad Antimicrobiana de los Agentes Infecciosos Intrahospitalarios en Chile..... **19**

Tabla 2. Tipos de Infecciones y Agente Etiológico Responsable..... **20**

Tabla 3. Características básicas de las bacteriocinas en bacterias Gram positivo y Gram negativo.....**26**

SOLO USO ACADÉMICO

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto negativo de la biopelícula de especies de <i>Lactobacillus</i> sobre la biopelícula de cepas <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 2. Ensayo de inhibición en medio sólido	33
Figura 3. Ensayo de inhibición por curva de crecimiento	36
Figura 4. Efecto inhibitorio de los WBC de especies de <i>L. kunkeei</i> y <i>L. plantarum</i> sobre cepas de <i>P. aeruginosa</i> en placa.....	39
Figura 5. Efecto inhibitorio de los WBC de <i>L. kunkeei</i> LLI003 y <i>L. plantarum</i> procedentes de cultivos de MRS pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4 sobre las cepas de <i>P. aeruginosa</i> en placa.....	41
Figura 6. Efecto de los CFS de <i>L. kunkeei</i> LLI003 y <i>L. plantarum</i> en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> LLP011.....	43
Figura 7. Efecto en los CFS de cocultivo de <i>L. kunkeei</i> LLI003 y <i>L. plantarum</i> en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PA01.....	45
Figura 8. Efecto en los CFS de cocultivo de <i>L. kunkeei</i> LLI003 y <i>L. plantarum</i> en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	46
Figura 9. Efecto en los CFS de cocultivo de <i>L. kunkeei</i> LLI003 y <i>L. plantarum</i> en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> LLP011.....	47
Figura 10. Efecto del tratamiento enzimático y térmico en los CFS de cocultivo de <i>L. kunkeei</i> LLI003 en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> LLP011.....	49
Figura 11. Efecto del tratamiento enzimático y térmico en los CFS de cocultivo de <i>L. plantarum</i> en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> LLP011.....	50

iv. RESUMEN

La resistencia a los antibióticos por parte de bacterias patógenas se ha declarado como una emergencia a nivel global. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno nosocomial resistente a los antibióticos y formador de biopelículas, cuyas infecciones y manifestaciones clínicas pueden llegar a ser mortales en pacientes inmunocomprometidos. Se ha descrito que las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de generar componentes bioactivos con propiedades antimicrobianas, por ejemplo, las bacteriocinas. En la presente tesis se estudió el efecto de una LAB, *Lactobacillus kunkeei*, para generar sustancias antimicrobianas contra *P. aeruginosa*. Para ello, el objetivo de este trabajo es determinar la naturaleza bioquímica y el efecto del agente antimicrobiano contra *Pseudomonas aeruginosa*, producido por cepas de *Lactobacillus kunkeei*. Para lograr este objetivo, se propuso analizar la actividad antimicrobiana del cultivo bacteriano y el sobrenadante, mediante ensayos de inhibición en placa de agar y en curva de crecimiento. Con este fin, se utilizaron medios de cultivo sólido en placa agar y mediante ensayo de inhibición sobre el césped bacteriano con adición de pocillos, para determinar el halo de inhibición en WBC y CFS de la especie de *L. kunkeei*. Posteriormente se analizó el efecto inhibitorio de CFS en medio líquido durante la curva de crecimiento de especies de *P. aeruginosa* mediante espectrofotometría automatizada. Como resultados se demostró que *L. kunkeei* LLI003, aislada desde intestino de abeja apícola chilena, produce sustancias antimicrobianas y altera el crecimiento en placa y caldo de tres diferentes cepas de *P. aeruginosa* PAO1, PA14 y LLP011, esta última aislada desde paciente con fibrosis quística. Además se caracterizó parcialmente la naturaleza bioquímica del agente antimicrobiano mediante tratamiento enzimático y térmico durante la curva de crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011 en medio de cultivo líquido. Como resultado se identificó la presencia de moléculas de naturaleza proteica contenida en CFS de co-cultivo. De este trabajo se puede concluir que la búsqueda de microorganismos en nichos ecológicos puede otorgar compuestos activos de interés en la industria farmacéutica y médica, como posibles candidatos de tratamientos contra patógenos microbianos. Estos resultados nos mostraron que el género *Lactobacillus*, y específicamente la especie *L. kunkeei* es capaz de generar sustancias antimicrobianas, posiblemente mediado por un mecanismo de inducción, que inhiben el crecimiento del patógeno humano *P. aeruginosa*, y por ende, ser fuente de nuevos antibióticos para poder aplicarse en medicina.

v. SUMMARY

Resistance to antibiotic by pathogenic bacteria has been declared a global emergency. *Pseudomonas aeruginosa* is an antibiotic-resistant and biofilm-forming nosocomial pathogen, the infections and clinical manifestations of which can be fatal in immunocompromised patients. Lactic acid bacteria (LAB) have been described as capable of generating bioactive components with antimicrobial properties, for example bacteriocins. In the present thesis, the effect of a LAB, *Lactobacillus kunkeei* in generating antimicrobial substances against *P. aeruginosa* was studied. For this, the objective of this work was to determine the biochemical nature and the effect of the antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa*, produced by *Lactobacillus kunkeei* strains. To achieve this objective, it was proposed to analyze the antimicrobial activity of the bacterial culture and the supernatant, using agar plate and growth curve inhibition assays. For this purpose, solid culture media on agar plate and by inhibition assay on bacterial lawn with addition of wells were used to determine the inhibition halo in WBC and CFS of the *L. kunkeei* species. Subsequently, the inhibitory effect of CFS in liquid medium during the growth curve of *P. aeruginosa* species was analysed by automated spectrophotometry. As results, it was demonstrated that *L.kunkeei* LLI003, isolated from the Chilean bee's intestine, produces antimicrobial substances and alters the growth in plaque and broth of three different strains of *P. aeruginosa* PAO1, PA14 and LLP011, the latter isolated from a patient with fibrosis cystics. Furthermore, the biochemical nature of the antimicrobial agent was partially characterized by enzymatic and thermal treatment during the growth curve of *P. aeruginosa* LLP011 in liquid culture medium. As a result, the presence of protein molecules contained in co-culture CFS was identified. From this work it can be concluded that the search for microorganisms in ecological niches can provide active compounds of interest in the pharmaceutical and medical industries, as possible candidates for treatments against microbial pathogens. These results showed us that the genus *Lacobacillus*, and specifically the species *L. kunkeei*, is capable of generating antimicrobial substances, possibly mediated by an induction mechanism, that inhibit the growth of the human pathogen *P. aeruginosa*, and therefore, be a source of new antibiotics to be applied in medicine.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Resistencia a los antimicrobianos, problemática e implicancias

Desde hace décadas se ha observado un incremento significativo en la resistencia a los antibióticos, los que son usualmente utilizados desde 1943 para el tratamiento de infecciones de origen bacteriano mejorando de manera significativa la esperanza de vida humana y animal (1). Sin embargo, el uso y abuso de los antibióticos ha traído consigo la aparición de bacterias resistentes que sobreviven a su efecto, lo que ha causado que en el mundo aumenten significativa y progresivamente las muertes por infecciones difíciles de tratar o intratables. Se estima que el 80% de los antibióticos son aplicados en las industrias ganaderas, agrícolas y acuícola, mientras que el 30% restante es aplicado en la salud humana (2 y 3). En el año 2013, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) junto con el Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos (HHS) reportaron que por lo menos 2 millones de personas son infectadas con patógenos resistentes cada año en los Estados Unidos con resultado de 23 mil personas fallecidas (4), mientras que año 2019, 2,8 millones de personas adquirieron infecciones resistentes resultando en 35 mil muertes (1). En el año 2014, la Comisión de Revisión sobre la resistencia a los antimicrobianos estimó que 700 mil personas mueren cada año a nivel mundial por microorganismos resistentes a los antibióticos, proyectando que para el año 2050 las muertes atribuibles a infecciones podrían alcanzar las 10 millones por año a nivel mundial, superando los casos de muertes por Cáncer (2). Así, las enfermedades de origen infeccioso corresponden a un objetivo prioritario en relación a la Salud Pública.

Las infecciones por resistencia a los antibióticos generan costos adicionales tanto a nivel económico como a nivel personal en la vida de los pacientes. En la mayoría de los casos, se requieren tratamientos prolongados y/o costosos, alargan las estadías en el hospital, requieren visitas a médicos adicionales y uso de atención médica especializada. En Estados Unidos el costo total por paciente asociado a una infección bacteriana sin resistencia a los antibióticos puede alcanzar los US\$1.394 de dólares, mientras que un costo asociado a una infección bacteriana con resistencia puede alcanzar los US\$3.698 de dólares (5), pudiendo alcanzar US\$20 Billones de dólares al año, incluyendo gastos adicionales para la sociedad por la pérdida de productividad de hasta US\$35 Billones de dólares al año (valor del dólar en el año 2008) (4), además los costos totales incrementarán anualmente por un monto de US\$1.380 de

dólares (5). Mientras que los costos acumulados a nivel mundial para el año 2050, puede alcanzar los US\$100 Trillones de dólares (2).

1.1.1. Realidad de Chile: uso de antibióticos, prevención y gestión de patógenos resistentes

En Chile, existe un uso desmedido de antimicrobianos en la medicina veterinaria, especialmente en la acuicultura del salmón, en que se ha observado un incremento en los antibióticos utilizados, lo que está directamente relacionado con el surgimiento de niveles altos en la resistencia antimicrobiana. Un ejemplo de ello es la importación total de 7.775 toneladas de antibióticos para uso veterinario, mientras que para uso clínico en humanos se importaron un total de 381 toneladas, en ambos casos durante el periodo 1998-2015. Por otra parte en la medicina veterinaria e industria agropecuaria se utilizan excesivamente quinolonas, que son antibióticos de último recurso en medicina humana frente infecciones microbiológicas graves (6).

El gobierno chileno en el año 2017, propuso un plan nacional de prevención y gestión contra la resistencia antimicrobiana, adoptando recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6,7,8), Organización de Alimentación y Agricultura (FAO), Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y la Asamblea General de las Naciones Unidas (ONU), con la finalidad de disminuir la diseminación de microorganismos resistentes a modo de evitar la emergencia en la salud de las personas, y así, entrar en línea con el concepto de “Una Salud”, el cual consta de “*un enfoque colaborativo, multisectorial y transdisciplinario, que trabaja a nivel local, regional, nacional y global, para lograr resultados óptimos de salud y bienestar que reconocen las interconexiones entre las personas, los animales, las plantas y su entorno compartido*” (One Health Commission) (9). Acorde al control microbiológico en Chile han establecido estrategias, tales como; (A) mejorar la concientización pública y formación pública, (B) vigilar la resistencia antimicrobiana en forma integrada, (C) prevenir y controlar las infecciones asociadas a la atención de salud, (D) utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal, y (E) realizar investigación relacionada con resistencia antimicrobiana (8).

No obstante, el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) junto a los datos de la consultora IQVIA, en el año 2019 señalaron en un estudio, la detección en el aumento de consumo de cinco antibióticos de medicina humana; Amoxicilina, Ciprofloxacino, Azitromicina, Cefadroxilo y Amoxicilina con ácido

Clavulánico, durante el periodo 2014-2019, la variación en el aumento fue desde 2,9% para Ciprofloxacino hasta 34% para Azitromicina, representado en números de cajas vendidas por principio activo, por lo tanto es de extrema importancia en utilizar con prudencia y responsabilidad los antibióticos, y así, proteger la eficacia de los medicamentos y la salud en la población (10).

1.1.2. Vigilancia de resistencia a los antimicrobianos e infecciones intrahospitalarias en Chile

Para estimar la eficacia de los antibióticos, como también, reportar el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a estos medicamentos, los laboratorios hospitalarios y clínicos, reportan vigilancias de la susceptibilidad microbiana frente a antibióticos de utilidad clínica. Aquella información es recopilada por un órgano estatal e instituto nacional correspondiente a la salud pública nacional, propio de cada país. En Chile, el Instituto de Salud Pública (ISP) y el Ministerio de Salud (MINSAL), reportaron la sensibilidad de una cantidad de antimicrobianos, establecida por las mismas instituciones, frente a los agentes infecciosos de alta frecuencia en hospitales, asociadas a la atención de salud, tales como; *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, desde el año 1991 al 2016, con excepción de los años 2010 y 2011 (11). En los cuales se observa una tendencia heterogénea a la resistencia hacia los antibióticos, en que por lo general, por literatura y praxis, se observa un aumento de resistencia a los antimicrobianos de manera paulatina hasta estabilizarse o incluso revertir (1, 4, 12-15) (Tabla 1). Por lo que a un mal manejo y uso excesivo de los antibióticos, ya sea por mal diagnóstico o tratamiento empírico no adecuado (3), o una utilidad irresponsable (6 y 10), genera mayor resistencia microbiana frente a estos medicamentos.

Entonces la problemática recae en que el origen y diseminación de microorganismos patógenos, que ocurre en recintos hospitalarios y clínicas, que conllevan a infecciones intrahospitalarias o infecciones nosocomiales. Las infecciones intrahospitalarias o infecciones nosocomiales, son aquellas que ocurren durante el ingreso, estancia e incluso egreso del paciente del recinto de salud, debido al proceso infeccioso que ocurre entre las 48 horas a 72 horas postingreso (16 y 17). Las infecciones intrahospitalarias pueden abordar entre 5 a 10% de los pacientes que se internan en un recinto hospitalario o clínico (16), sin embargo en Chile, los niveles de prevalencia son menores entre 4,7% a 3,8%, desde el año 2015 al 2018 (18). Las infecciones intrahospitalarias de mayor prevalencia

(frecuencia y distribución), en recintos hospitalarios desde mayor complejidad, mediana, hasta menor complejidad, habitualmente son: “infecciones urinarias”, con una prevalencia del 21,33%; “neumonía sin ventilación mecánica”, con el 14,76%; “bacteremia/septicemia”, con el 8,54%; “infección de herida operatoria”, con el 8,54%; “infección gastrointestinal”, con el 7,59%; neumonía con ventilación mecánica, con el 6,38% y “otras infecciones”, el 32,9% restante, durante el periodo 2014-2018 **(18)** (**Tabla 2**). El desarrollo de la infección depende de la edad del paciente, el estado inmunitario del mismo, historia clínica, comorbidades, estado nutricional, el estrés, el sexo, patología de base, cantidad de días de internación, agente etiológico y mecanismo de transmisión **(16)**. El impacto grave que implica las infecciones intrahospitalaria o infecciones nosocomiales en la salud humana, sistema social y económico, procuran una extrema importancia y urgencia, dado que, aumenta la morbilidad, mortalidad y el costo de los pacientes hospitalizados, en Chile pudiendo alcanzar los US\$ 70 millones de dólares **(19)**.

TABLA 1: Susceptibilidad antimicrobiana de los agentes infecciosos intrahospitalaria en Chile. Sensibilidad a los antibióticos de los agentes infecciosos de alta frecuencia en hospitales de Chile. (*), años 2010 y 2011 sin datos (11).

Patógeno (cepas)	Antibióticos	% Cepas Resistentes(nivel min./período)	% Cepas Resistentes(nivel max./período)	Nº Cepas Estudiadas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxaciclina	33,5% / 1991-1993	67,7% / 2008-2010*	16.773
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ciprofloxacino	16,8% / 1994-1996	64,1% / 2014-2016	10.868
	Gentamicina	44,7% / 2014-2016	66,1% / 2008-2010*	
	Cefotaxima	22,4% / 1991-1993	77,8% / 2008-2010*	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (resistencia a carbapenémicos)	Imipenem	2,2% / 2013	4,4% / 2015	4.993
	Meropenem	7,3% / 2012	13,9% / 2016	
	Ertapenem	26,5% / 2012	40,2% / 2015	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	10,8% / 1994-1996	37,3% / 2011*-2013	7.587
	Gentamicina	24,8% / 2014-2016	52,1% / 1991-1993	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (resistencia a carbapenémicos)	Imipenem	34% / 2015	44,2% / 2014	3.499
	Meropenem	32,5% / 2015	41,6% / 2014	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Amikacina	56,8% / 1997-2000	78,1% / 2005-2007	4.572
	Ciprofloxacino	68,1% / 2014-2016	92,2% / 2008-2010*	
	Sulbactam /Ampicilina	8,1% / 1991-1993	71,5% / 2008-2010*	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (resistencia a carbapenémicos)	Imipenem	43,1% / 2016	74,7% / 2015	1.469
	Meropenem	44,5% / 2016	83,9% / 2013	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	7,1% / 2016	15,1% / 2015	2.882
	Vancomicina	0,9% / 2012	7% / 2015	
	Teicoplanina	0% / 2012	6,6% / 2015	
	Linezolid	0,5% / 2012	4,6% / 2015	
<i>Enterococcus faecium</i>	Ampicilina	86,4% / 2014	94,9% / 2013	1.481
	Vancomicina	67% / 2015	82,8% / 2013	
	Teicoplanina	48,1% / 2014	71% / 2012	
	Linezolid	0% / 2012	5,6% / 2015	

TABLA 2: Tipos de infecciones y agente etiológico responsable. Agentes infecciosos responsables, tipo de infección causante y su prevalencia en infecciones intrahospitalarias (18).

Agente Etiológico \ Tipo de Infección	Infección del Tracto Urinario por Catéter	Infecciones de Herida Operatoria	Infecciones del Torrente Sanguíneo	Neumonía con Ventilación Mecánica Invasiva
Patógeno Intrahospitalario	Nº Casos/Prevalencia (%)	Nº Casos/Prevalencia (%)	Nº Casos/Prevalencia (%)	Nº Casos/Prevalencia (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	251 / 13,84%	13 / 4,69%	100 / 8,16%	203 / 22,48%
<i>Staphylococcus aureus</i>	no presente	86 / 31,05%	229 / 18,68%	181 / 20,04%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	no presente	9 / 3,25%	28 / 2,28%	77 / 8,53%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	468 / 25,81%	31 / 11,19%	172 / 14,03%	182 / 20,16%
<i>Enterococcus faecalis</i>	169 / 9,32%	21 / 7,58%	28 / 2,28%	no presente
<i>Enterococcus faecium</i>	no presente	no presente	29 / 2,37%	no presente
Total de casos presentes	888	160	586	643

1.1.3. Enfoques y plan de acción de la organización mundial de la salud

En el año 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió un documento “*Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*” de clasificación de antimicrobianos de importancia médica para la gestión del riesgo de resistencia a los antimicrobianos, en industrias alimenticias, agropecuarias, medicina veterinaria y salud pública. Con la finalidad de garantizar un uso adecuado y responsable de los antimicrobianos de importancia crítica en medicina humana y medicina veterinaria (7). Es de tal urgencia e importancia de controlar los brotes epidemiológicos y prevenir la diseminación de variantes resistentes a los antibióticos, que la aparición de multirresistencia ha sido catalogado grave por la OMS, presentado un listado, en el año 2017, categorizado con diferentes niveles de prioridad a la hora de investigar y desarrollar nuevos antibióticos o tratamientos contra los microorganismos resistentes a los antibióticos, como prioridad crítica se encuentran; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, en prioridad alta; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella spp* y *Neisseria gonorrhoeae*, y como prioridad media; *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp.* (20).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Uno de los microorganismos presentes como la prioridad crítica es *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, que se encuentra naturalmente en suelos, fuentes de agua (mar, ríos, lagos, piscinas y plantas de tratamiento de aguas residuales), en microbiota vegetal, animal y humana, lo cual puede facilitar su exposición a los antibióticos y, con ello poder adaptarse y adquirir resistencia (21-29). Este microorganismo descrito como patógeno oportunista, está implicado en infecciones nosocomiales, fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos de manera local o general, siendo su incidencia frecuente en infecciones intrahospitalaria en pacientes que se encuentran en cuidados intensivos, por ejemplo, pacientes con cáncer, VIH, fibrosis quística, trasplantes de órganos, entre otros. Las manifestaciones clínicas ocasionadas por el patógeno son: infecciones respiratorias, urinarias, oculares, óticas, cutáneas, gastrointestinales, bacteremia, endocarditis y meningitis (30). Los daños que puede ocasionar este patógeno en el sistema de salud, social y económico, por ejemplo en Estados Unidos en el año 2017, implicó 32.600 casos de pacientes hospitalizados, 767 millones de dólares en costos hospitalarios, y 2.700 muertes (1).

P. aeruginosa según el serotipo identificado, presenta resistencia a muchos grupos de antibióticos de distintos blancos celulares y moleculares tales como aquellos que afectan la pared bacteriana, alteran la membrana citoplasmática, inhiben la síntesis proteica y alteran el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos. Entre estos se encuentran los betalactámicos que derivan en Penicilina, Cefalosporinas de primera generación, Cefalosporinas de segunda generación, Cefalosporinas de tercera generación, Cefalosporinas de cuarta generación, Monobactámicos y Carbapenémicos, las Polimixinas, los Aminoglucósidos, y las Fluoroquinolonas o Fluorquinolonas o Quinolonas de primera generación, Quinolonas de segunda generación, Quinolonas de tercera generación y Quinolonas de cuarta generación (31-35).

1.2.1. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

Uno de los mecanismos de inactivación de antimicrobianos corresponde a la hidrólisis enzimática del anillo beta-lactámico presente en la estructura química de los antibióticos betalactámicos por acción de enzimas beta-lactamasas. Entre las beta-lactamasas, están las tipo AmpC que son codificadas en el cromosoma (o en plásmidos con expresión constitutiva por otras Gram negativo); las tipo BLEE (beta-lactamasas de espectro extendido) que se han originado por medio de mutaciones espontáneas de Beta-lactamasas de espectro reducido y, las Carbapenemasas, un subgrupo de las BLEE más específicas contra carbapenémicos, pero que de igual manera inactivan otros beta-lactámicos, descritas en cromosomas, pero también pueden estar presente en elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones). Existen dos clases de Carbapenemasas, las carbapenemasas de serina (residuo de serina en su sitio activo) correspondiente a clase A y Metallo-beta-lactamasas (Carbapenemasa que requiere de cationes divalentes en su sitio activo como cofactor, como el zinc) correspondiente a clase B según la clasificación molecular de Ambler (36, 37 y 38).

Otros mecanismos de resistencia a antibióticos presentes en *P. aeruginosa* corresponden a mutaciones que dan como resultado la modificación de canales (por ejemplo, porinas), que permiten el ingreso de los antibióticos, la modificación de las moléculas blanco y/o la presencia de bombas de expulsión. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* se ha observado mecanismos ligados a la resistencia de Meropenem, un carbapenémico, debido a la mutación en la porina OprD y/o a la presencia del sistema MexAB-OprM, que corresponde a una bomba de expulsión (36, 37 y 38).

La resistencia intrínseca de este patógeno oportunista, también está condicionada por la facilidad de mutaciones cromosómicas y la adquisición de elementos genéticos móviles (transferencia horizontal de genes), como los plásmidos e integrones desde *Pseudomonas aeruginosa* intrahospitalarias hacia *P. aeruginosa* de nichos comensales o ambientales incluso en sentido inverso, como también transferencia horizontal entre otras bacterias Gram negativo patógenas generando un aumento en los factores de riesgo potenciales a infección y la epidemiología (36, 37 y 38). Aislados de *P. aeruginosa* multirresistentes a antibióticos (MDR: “*Multidrug-Resistant*”) son resistentes a tres de los diez grupos de antibióticos, los aislados con resistencia extendida (XDR: “*Extensively Drug-Resistant or Extreme Drug resistance or Extensive Drug Resistance or Extremely Drug Resistance*”) son resistentes a ocho o nueve de los diez grupos de antibióticos, estos mismos se encuentran emergiendo con más frecuencia, y aislados panresistentes (PDR: “*PanDrug-Resistant*”), son resistentes a todos los grupos de antibióticos, de frecuencia poco común (39-42).

1.3. Las bacterias ácido lácticas (LAB)

Si bien existen varios enfoques de investigación para el control de patógenos mediante antimicrobianos, con objeto de tratamiento alternativo a los antibióticos, tales como el uso de bacteriófagos (43), anticuerpos y vacunas (44 y 45), CRISPR/Cas (46), nanopartículas y nanomateriales (47, 48 y 49), aceites esenciales de vegetales (50), extracto de plantas (51), inhibidores de *quorum-sensing* (52, 53 y 54), inteligencia artificial (55 y 56), y los metabolitos con propiedades antimicrobianas generados a partir de otros microorganismos (57 y 58), de bacterias beneficiosas y probióticas (59 y 60), e incluso del tipo ácido lácticas han suscitado un gran interés (61).

Las bacterias ácido lácticas (LAB), llamadas así por fermentar carbohidratos generando ácido láctico principalmente, son clasificados como Gram positivo, GRAS (Generalmente Considerada Como Segura) y pertenecientes al Phylum de *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacilli*, Subdivisión *Clostridium-Bacillus*, la que incluye los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, en el cual el grupo más abundante son los *Lactobacillus*. Las LAB son no móviles, no esporuladas, catalasa negativo, fastidiosas (requiere complejo nutricional como aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y

carbohidratos), tolerantes a pH ácido (pH óptimo de 5.5-5.8), tolerantes a altas concentraciones de sales biliares conjugados y desconjugados, y son anaerobias facultativas (62-66).

Las LAB muestran propiedades profilácticas y aplicaciones tecnológicas atractivas, tanto en aplicaciones médicas como en la industria alimentaria, debido a sus capacidades anteriormente mencionadas en conjunto con su resistencia al congelamiento y secado en frío, adhesión y colonización de la mucosa digestiva, producción de vitaminas y componentes antimicrobianos. Los metabolitos y compuestos activos secretados por LAB tales como, ácidos orgánicos, etanol, ácidos grasos de cadena corta, acetoina, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (péptidos antimicrobianos de origen bacteriano), confieren los efectos preservativos, bacteriostáticos, bactericidas, antimicrobianos y profilácticos en los productos alimentarios y en la mucosa digestiva (62-66).

1.3.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, también conocidos como péptidos de defensa del organismo, tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus. Estas proteínas son componentes indispensables en el sistema inmune innato en diversos organismos como en humanos, animales, plantas y microorganismos, por lo cual son la primera línea defensiva contra infecciones microbiológicas, de protección contra invasores microbianos, e incluso, de competencia por un nicho ecológico en concreto, por otra parte, el mecanismo de acción de estos péptidos son diferentes a los antibióticos, otorgando la capacidad de ser aplicados en tratamientos contra patógenos resistentes a los antibióticos (67-73).

1.3.2. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un tipo de antimicrobianos de naturaleza proteica o polipeptídica de origen bacteriano (74), las cuales tienen como función de inhibir el crecimiento microbiano de bacterias por la competencia de un nicho ecológico en particular (75). Se diferencian de los antibióticos, en que están codificados por genes que pueden ser cromosomales o formar parte de los elementos genéticos móviles como; plásmidos, integrones y transposones, mientras que estos últimos son metabolitos secundarios, producto de las reacciones enzimáticas (74 y 76). El mecanismo de acción más común es la formación

de poros en la membrana y su espectro de acción es heterogéneo, pudiendo afectar a microorganismos que estén tanto estrechamente relacionados como alejados filogenéticamente.

Las bacteriocinas se suelen estudiar y aislar a partir de cultivos de bacterias Gram positivo y Gram negativo (76). En las bacterias Gram negativo, se han descrito y clasificado como: Microcinas (clase I, clase IIa y IIb) y colicinas, en que se han descubierto y estudiado en bacterias de la familia Enterobacteriaceae (77 y 78) (tabla 3). Mientras que las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram positiva se han agrupado en: clase I (Ia, Ib y Ic), clase II (IIa, IIb, IIc y IId), clase III (IIIa y IIIb) y clase IV (BLIS: bacteriocin-like inhibitory substances, o BLS: bacteriocin-like substances) Las bacterias LAB son una de las principales fuentes de bacteriocinas conocidas (74 y 79) (tabla 3).

Las bacterias de las especie *Lactobacillus spp.* han mostrado ser fuentes de bacteriocinas que tienen un alto potencial en medicina humana y animal. Entre las bacterias de esta especie que están descritas como productoras de bacteriocinas están *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. plantarum*, entre otras (80).

TABLA 3: Características básicas de las bacteriocinas en bacterias Gram positivo y Gram negativo. Propiedades diferenciadores más elementales, entre las distintas clases de bacteriocinas de bacterias Gram positivo y Gram negativa. (P.M.) Peso molecular. (KDa) Kilo Dalton (77 y 79).

Tipo de bacteria	Clase de bacteriocinas	Subclases de bacteriocinas	Propiedades
Gram positivo	Bacteriocinas clase I. (Lantibióticos)	Clase Ia (Lantipeptidos)	<ul style="list-style-type: none"> •P.M. <5 KDa. •Termo resistente •Lantionina, Metillantionina, Dehidroalanina, Dehidrobutirina y D-Alanina.
		Clase Ib (Globular)	
		Clase Ic (Sactipéptidos) (no descrito en LAB)	
	Bacteriocinas clase II (No lantibióticos)	Clase IIa (Pediocin-like)	<ul style="list-style-type: none"> •P.M. <10 KDa. •Termo resistente.
		Clase IIb (dos péptidos)	
		Clase IIc (circular)	
		Clase IId (non-pediocin-like, lineal)	
	Bacteriocinas clase III	Clase IIIa (lysozymes-like bacteriocins o bacteriolincinas o bacteriolíticas)	<ul style="list-style-type: none"> •P.M. >30 KDa. •Termolábil.
		Clase IIIb	

		(non-lysozymes antibacterial proteins o no líticas)	
	Bacteriocinas clase IV	BLIS o BLS	<ul style="list-style-type: none"> •P.M. 10-30 KDa. •Termo resistente. •Contiene lípido o carbohidrato
Tipo de bacteria	Clase de bacteriocinas	Subclases de bacteriocinas	Propiedades
Gram negativo	Microcinas clase I		•P.M. <5 KDa.
	Microcinas clase II	Clase IIa	•P.M. 7-10 KDa.
		Clase IIb	
	Colisinas		•P.M. 25-80 KDa.

SOLO USO ACADÉMICO

1.3.3. *Lactobacillus kunkeei*

Lactobacillus kunkeei (*L. kunkeei*), es una especie de *Lactobacillus spp.* que ha sido aislada desde flores, miel, vino, frutas, insectos y de la microbiota intestinal de las abejas polinizadoras (*Apis mellifera*). *L. kunkeei*, es fructofílica o FLAB (*Fructiphilic Lactic Acid Bacteria*), bacterias similares a LAB con mayor afinidad a la fructosa como fuente de carbono (81-86). Cuando la abeja pecorea, toma contacto con las bacterias presentes en las flores donde se encuentra *L. kunkeei* y se ha observado que su presencia en la microbiota del insecto no sólo la protege de la infección de patógenos como *Nosema ceranae* y *Paenibacillus larvae* (87), sino que es capaz de generar una respuesta del tipo IgA en ratones (88). Sumado a esto, un estudio desarrollado por Berríos y cols. (89) mostró que *L. kunkeei* tiene una actividad antagónica contra *P. aeruginosa*. En este estudio, se muestra que hay un efecto inhibitorio de la biopelícula de una colección de cepas de *L. kunkeei* (cepas MP2, LLI001, LLI002, LLI003 y LLI005) contra el establecimiento de la biopelícula de *P. aeruginosa* (LLP011, PAO1 y PA14) *in vitro* (figura 1) (89), donde destacó especialmente *L. kunkeei* LLI003, cuyo efecto contra el patógeno también se observó *in vivo*, al obtenerse un mayor porcentaje de supervivencia en el modelo de *Galleria mellonella* (89). Recientemente se ha comprobado que *L. kunkeei* es capaz de generar bacteriocinas (kunkecina A) que tiene actividad contra *Melissococcus plutonius*, un patógeno de abeja (90). Cabe, entonces, preguntarse si dados a los resultados previos observados con *P. aeruginosa*, *L. kunkeei* produce esta u otras bacteriocinas en su sobrenadante que afecta ahora al patógeno humano.

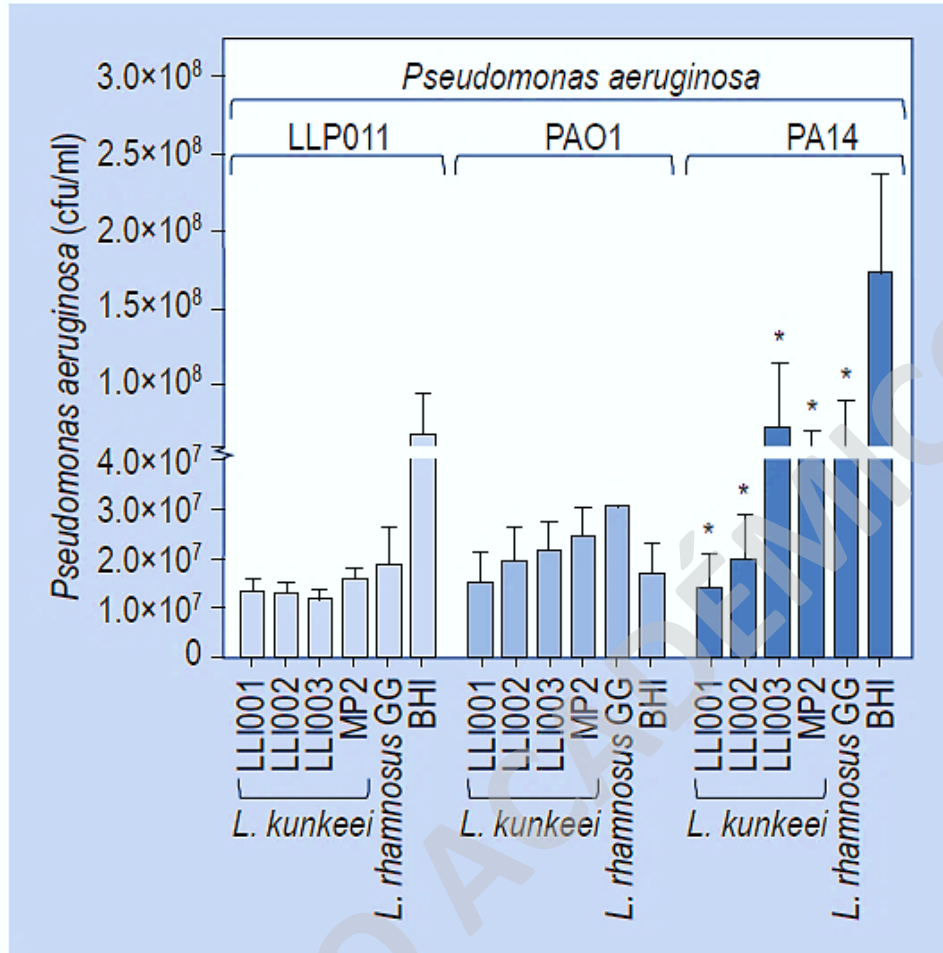


Figura 1: Efecto negativo de la biopelícula de especies de *Lactobacillus* sobre la biopelícula de cepas *P. aeruginosa*. La biopelícula de cepas de *Lactobacillus kunkeei* afectó negativamente la formación, estabilización y viabilidad de la biopelícula de cepas de *P. aeruginosa*, al comparar las UFC/mL de los patógenos en contraste a la población obtenida a partir de BHI sólo. Las bacterias *P. aeruginosa* PA14 y LLP011 presentaron mayor efecto negativo en comparación a PAO1, no obstante, LLP011 no presentó estadísticamente diferencia significativa. Este antecedente permite sugerir la presencia de agentes inhibidores (agente antibacteriano o anti-biopelícula) secretados por especies de *Lactobacillus kunkeei*. **Referencia:** Berríos y cols. (2018).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El sobrenadante de *Lactobacillus kunkeei* contiene compuestos de naturaleza proteica del tipo bacteriocina que actúan contra el crecimiento del patógeno *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Objetivo general

Determinar la naturaleza bioquímica y el efecto del agente antimicrobiano contra *Pseudomonas aeruginosa*, producido por cepas de *Lactobacillus kunkeei*.

2.2.1. Objetivo específico 1

Analizar la actividad antimicrobiana del cultivo bacteriano y el sobrenadante, mediante ensayos de inhibición en placa de agar y en curva de crecimiento.

2.2.2. Objetivo específico 2

Caracterizar bioquímicamente la naturaleza química del agente antimicrobiano.

SOLO USO ACADÉMICO

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Los microorganismos se cultivaron en base al procedimiento de Berríos y cols. modificado (89). Las cepas bacterianas de *Lactobacillus kunkeei* LLI001, LLI003 y MP2 se aislaron desde la microbiota intestinal de abejas melíferas (*Apis mellifera*), provenientes de colmenas comunales en el área de María Pinto, provincia de Melipilla en la zona central de Chile. *Lactobacillus plantarum* ATCC (*L. plantarum*) se obtuvo desde el cepario del grupo de investigación. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en medio cultivo Man-Rogosa-Shape broth (MRS; pH 5,7 ± 0,2. Merck) a 37°C (Estufa incubadora digital BE600. Mermmet, Germany) en atmósfera capnófila de 9% CO₂ (Anaerocult C. Merck). Cuando fue requerido realizar la experimentación se utilizó medio MRS a pH 7,4 o pH 6,2 o pH 5,7, ajustado mediante NaOH 5N para alcalinizar y HCl 1M para acidificar (pH-metro EZDO PL-500, Arquimed, Chile), antes de ser sometido a esterilización. Las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) PAO1 y PA14 fueron donadas por el doctor Francisco Chávez (Departamento de Biología, Universidad de Chile, Santiago, Chile). *P. aeruginosa* LLP011, un aislado clínico de fibrosis quística pulmonar, se obtuvo desde el cepario proveniente de Escuela de Tecnología Médica (Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, Chile). Las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron en medio de cultivo Brain Heart Infusion broth (BHI; pH 7,4 ± 0,2. Merck) a 37°C en atmósfera aeróbica bajo agitación a 125 rpm (Benchtop Shaker Incubator SI-600. Lab Companion).

3.2. Ensayo de inhibición en placa agar con cultivo completo bacteriano (WBC) de *Lactobacillus spp.*

El ensayo se realizó en base a la combinación de los protocolos modificados de ensayos de difusión en placa, específicamente el método de difusión por pocillo en agar ("*Agar Well Diffusion Method*", en inglés) y el método de ensayo sobre el césped ("*Spot-on lawn Assay Method*", en inglés) o método de ensayo de superposición ("*Overlay Assay Method*", en inglés) (91-97), nombrado como ensayo sobre el césped con pocillos ("*Spot-on lawn assay with Wells*", en inglés) (98 y 99), pero con apertura en la región superior de los pocillos. Las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron en caldo medio de cultivo BHI en atmósfera aeróbica, en agitación a 37°C durante 24 horas. Los cultivos completos bacterianos (WBC: *Whole Bacterial Culture*, en inglés) se ajustaron a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, con una longitud de onda (λ) de 600 nm mediante espectrofotometría (NanoQuant infinite M200 PRO[®], software i-

control 1.12 ©2016. Tecan™, Austria) (**Anexo 1 y 5**) en caldo de cultivo BHI estéril. Se mezclaron 100 µL de cada cepa *P. aeruginosa* con 14 mL de agar suave o semisólido 0,8% de BHI a 37°C. Posteriormente la mezcla se vierte sobre la superficie de placas conteniendo agar 1,5% MRS pH 7,4 estériles. Pocillos de un diámetro de 9 mm se realizan por medio del uso de puntas azules para micropipetas estériles (p1000 o puntas azules 1000 µL sin corona, Deltalab, TCL). El protocolo se puede observar en la figura (**figura 2**).

Las cepas de *L. kunkeei* y *L. plantarum* se crecieron y cultivaron en caldo medio de cultivo MRS pH 7,4 en atmósfera capnofílica a 37°C por 48 horas (*L. kunkeei*) o 24 horas (*L. plantarum*), obteniéndose cultivos completos (WBC), los que posteriormente se ajustaron a una D.O. de 0,2 λ 600nm. Un volumen de 80 µL de cada WBC ajustado se depositó en un pocillo de la placa preparada anteriormente (**figura 2**). Luego son cultivados en atmósfera aeróbica por 24 horas a 37°C. El experimento fue abordado por tres réplicas biológicas con sus triplicados técnicos respectivos.

SOLO USO ACADÉMICO

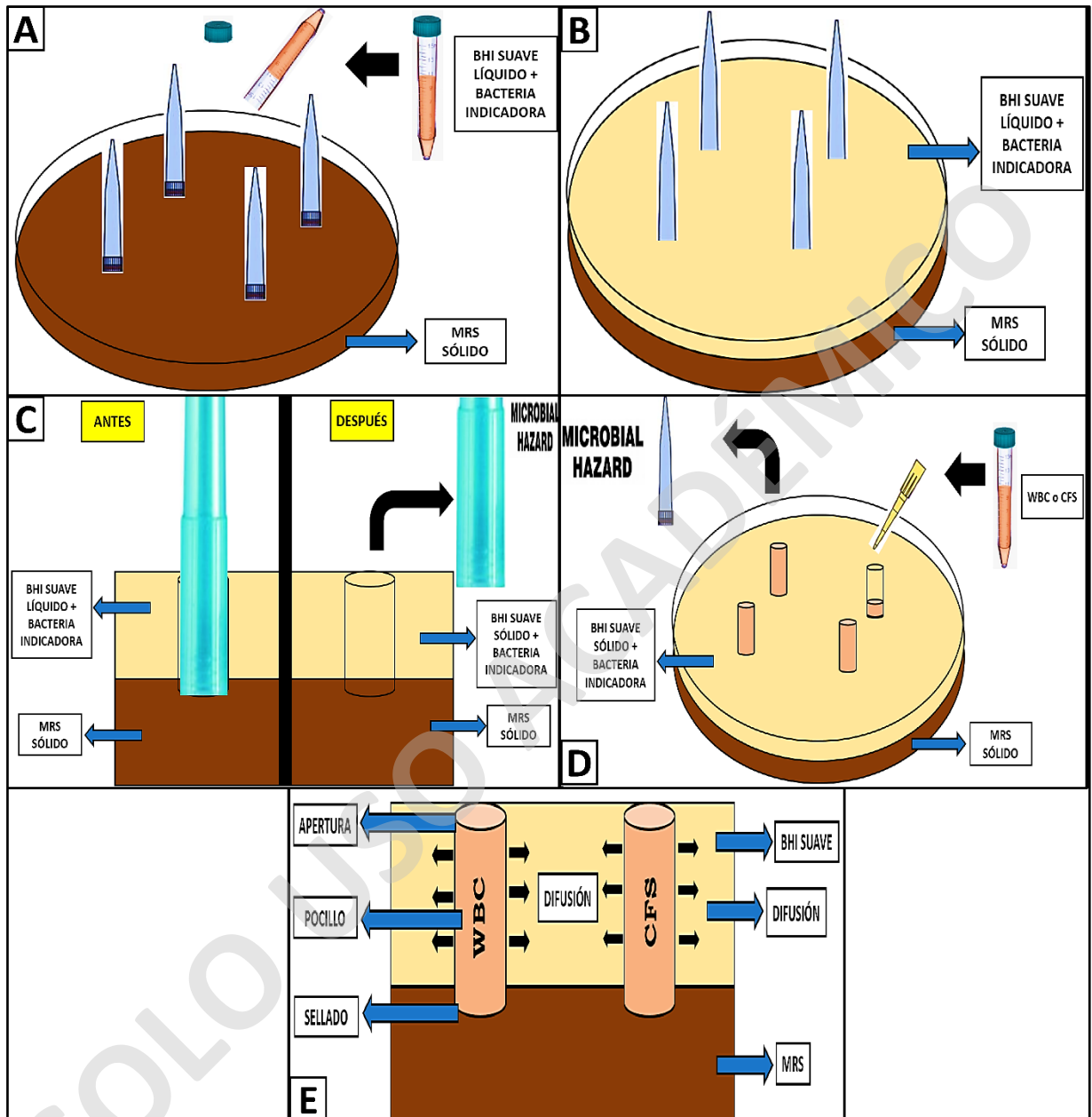


Figura 2: Ensayo de inhibición en medio sólido. (A) Aplicación de segunda capa de agar BHI suave con bacteria indicadora, sobre placa agar MRS pH 7,4 con fijación de puntas de micropipeta p1000 esteriles. (B) Solidificación del medio agar BHI suave con bacteria indicadora. (C) Ampliación del proceso de doble capa de agar. (D) Remoción de puntas p1000 y aplicación de WBC o CFS en los pocillos. (E) Ampliación de del proceso de difusión desde los pocillos en doble capa de agar.

3.3. Ensayo de inhibición en placa agar con WBC y sobrenadante libre de células (CFS) de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en MRS pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4

El ensayo se realizó en base al protocolo modificado de Yang y cols. (100). Las cepas bacterianas se cultivaron a 4 mL de medio líquido MRS pH 5,7 a 37°C por 24 h (*L. plantarum*) o 48h (*L. kunkeei* LLI003) en ambiente capnófilico. Transcurrido el tiempo, los cultivos se centrifugaron 10.000 rpm (12.857 RCF o 11,5 G) 5 minutos a temperatura ambiente (Centrifuge 5804R, rotor F-34-6-38. Eppendorf, Germany). Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos bacterianos se lavaron y subsiguientemente se resuspendieron con 4 mL de medio MRS ajustado a diferentes pH (pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4) por medio de agitador vortex (Vortex Mixer VM-300. Arquimed, Chile). Este proceso se repitió dos veces. Finalmente cada cultivo bacteriano con un volumen final de 4 mL de MRS de diferente pH, se incubaron a 37°C. Cepas de *P. aeruginosa* PAO1, PA14 y LLP011, se cultivaron 4 mL de medio de cultivo líquido BHI, por 24 horas en ambiente aeróbico a 37°C con agitación de 125 rpm.

Los cultivos de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* se centrifugaron a 10.000 rpm (12.857 RCF o 11,5 G) por 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante es rescatado por jeringa estéril (jeringa desechable 10 mL. Nipro, TCL Chile) y filtrado en filtro de 0,45 µm (Syringe filter cellulose acetate. Valuprep, TCL Chile) y almacenados en tubos para centrifuga de 15 mL estéril (centrifuge tubes. Falcon). Al sobrenadante filtrado se le denominó sobrenadante libre de células (CFS: *Cell-Free Supernatant* en inglés). Por otra parte, los sedimentos bacterianos de cada cultivo original se resuspendieron por medio de agitador vortex en medios líquidos de MRS ajustados a diferentes valores de pH (pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4). Luego las cepas *P. aeruginosa* LLP011, PAO1 y PA14, *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* se ajustaron a una D.O. 600nm de 0,2. Posteriormente se realizó el mismo protocolo de inhibición en placa agar ya explicado, incorporando los CFS (**figura 2**) (**Anexo 9**). El experimento fue abordado por tres réplicas biológicas con sus triplicados técnicos respectivos.

3.4. Ensayo de inhibición en curva de crecimiento de CFS procedente de monocultivo y cocultivo

Los ensayos en curva de crecimiento se basó en los procedimientos de la empresa Tecan™ (101). Se cultivaron *L. plantarum* en 4 mL de medio líquido MRS pH 7,4 a 37°C por 24 h y *L. kunkeei* LLI003 MRS pH 6,2 por 48h en ambiente capnofílico. Mientras, las cepas *P. aeruginosa* LLP011, PAO1 y PA14 se cultivaron en medio líquido BHI en atmósfera aeróbica, en una agitación de 125 rpm a 37°C durante 24 horas.

Transcurrido la incubación bacteriana, muestras de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* se aislaron y filtraron para obtener CFS, mientras que otras se mezclaron con cada cepa de *P. aeruginosa* LLP011, PAO1 y PA14 a una razón volumétrica de 3:1 (3 mL *Lactobacillus* con 1 mL de *Pseudomonas*), luego se homogeneizaron por agitador vortex por 10 segundos y puestos a incubación de 24 horas en ambiente aeróbico a 37°C bajo agitación. Posteriormente a la incubación, las mezclas bacterianas se homogeneizaron, se aislaron y se filtraron, obteniendo finalmente mezcla de CFS.

Se utilizaron 50 µL de mezclas de CFS, CFS y 50 µL de WBC de *P. aeruginosa* LLP011, PAO1 y PA14 ajustadas a D.O. de 0,1 en microplacas 96-well (Greiner® 96-well flat transparent microplate) preparadas con 100 µL de medio líquido BHI (volumen final 200 µL). Finalmente la microplaca se transfiere al espectrofotómetro, el crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos de forma intercalada de cada medición (NanoQuant infinite M200 PRO®, software i-control 1.12 ©2016. Tecan™, Austria) (figura 3) (Anexo 2, 3 y 4). El experimento fue abordado por tres réplicas biológicas con sus triplicados técnicos respectivos.

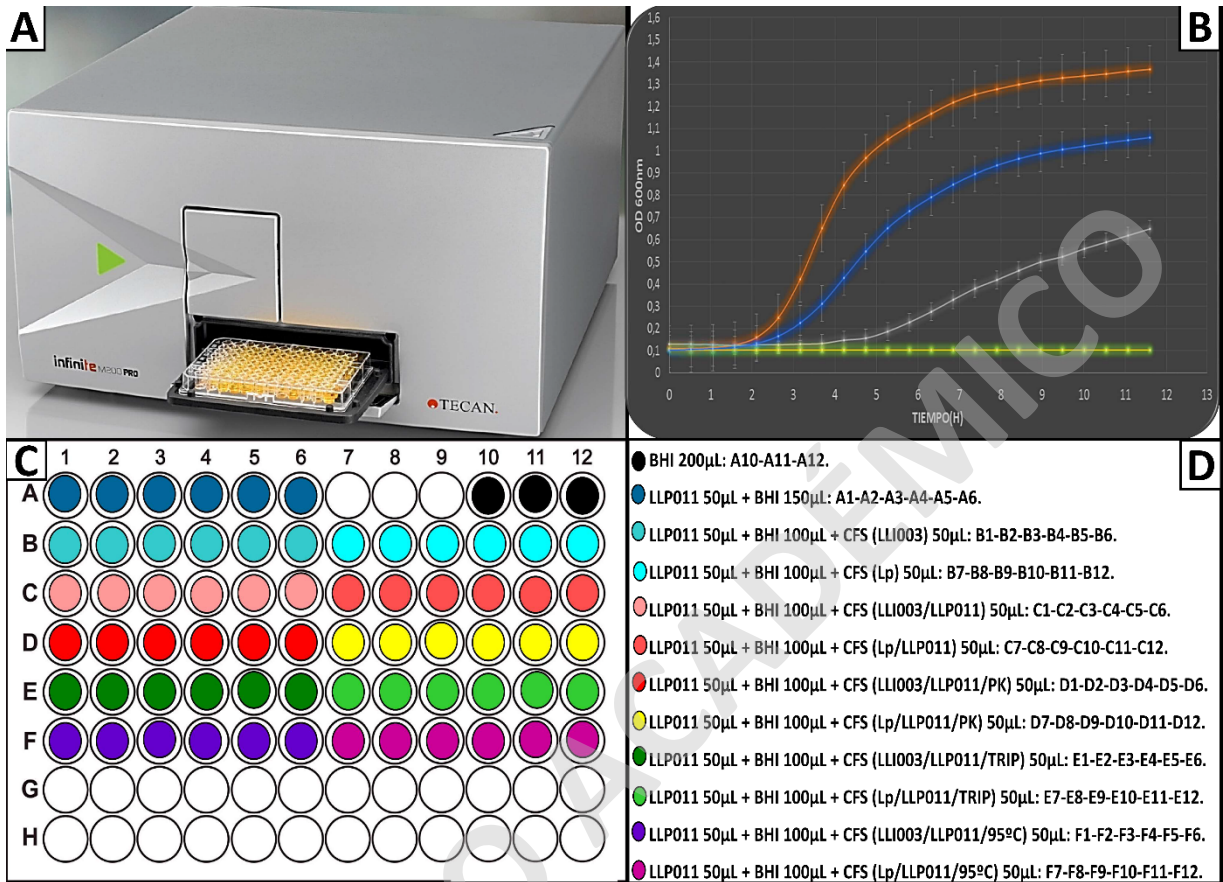


Figura 3: Ensayo de inhibición por curva de crecimiento. (A) NanoQuant infinite M200 PRO®, Tecan, lector microplaca multifuncional. (B) Representación de curva de crecimiento. (C) Representación de microplaca de 96 pocillos con muestras. (D) Representación de los ajustes del ensayo en microplaca 96 pocillos.

3.5. Tratamiento enzimático y tratamiento térmico sobre las mezclas CFS entre *L. kunkeei*

LLI003, *L. plantarum* y *P. aeruginosa* LLP011

Tratamiento enzimático y térmico se basó en el procedimiento de Lin y cols. modificado (102). Mezclas CFS (*L. kunkeei* LLI003/*P. aeruginosa* LLP011 y *L. plantarum*/*P. aeruginosa* LLP011) se trataron con Proteínasa K (Proteínasa K 500mg EC 3.4.21.14, Merck Germany) y Tripsina (Tripsina-EDTA 10X 100mL, Sigma-Aldrich, Merck Germany) por separado, a una concentración final de 4,8 mg/mL por 2 horas a 40°C. Paralelamente, las muestras de las mismas se trataron por choque térmico de 95°C durante 15 minutos por baño maría (Constant-Temperature Water Bath YCW-04M-11L. Gemmy Industrial Corporation, Taiwan. Cannic Inc. USA). Finalmente se procede al protocolo de inhibición en curva de crecimiento ya descrito. El experimento fue abordado por cuatro réplicas biológicas con sus triplicados técnicos respectivos.

3.6. Análisis estadístico

Los halos de inhibición se analizaron por one-way ANOVA Tukey test, mientras las curvas de crecimiento se analizaron por two-way ANOVA Tukey test. Ambos análisis con un nivel de significancia para p de 0,05 (Programa estadístico: SigmaPlot 12.0, Systat Software Inc.).

4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Efecto inhibitorio en cultivos completos bacterianos de *Lactobacillus spp.* sobre

Pseudomonas aeruginosa en medio sólido

Se realizó ensayo de inhibición en placa de *L. kunkeei* (cepas LLI001, LLI003 y MP2) y *L. plantarum* (especie de *Lactobacillus* que se caracteriza por generar bacteriocinas) sobre a *P. aeruginosa* (cepas PAO1, PA14 y LLP011) en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 h, para establecer condiciones ideales para el crecimiento del patógeno (**figura 4**). Los resultados mostraron que *L. kunkeei* LLI003 es la cepa que produce mayor halo de inhibición para cada una de las cepas de *P. aeruginosa* (LLI003 vs LLP011: 13,44 mm \pm 1,08; LLI003 vs PAO1: 1,37 mm \pm 3,19; LLI003 vs PA14: 13,7 mm \pm 1,22) en comparación a las otras cepas de *Lactobacillus* utilizadas. Dado esto, se continuará con la investigación utilizando *L. kunkeei* LLI003.

SOLO USO ACADÉMICO

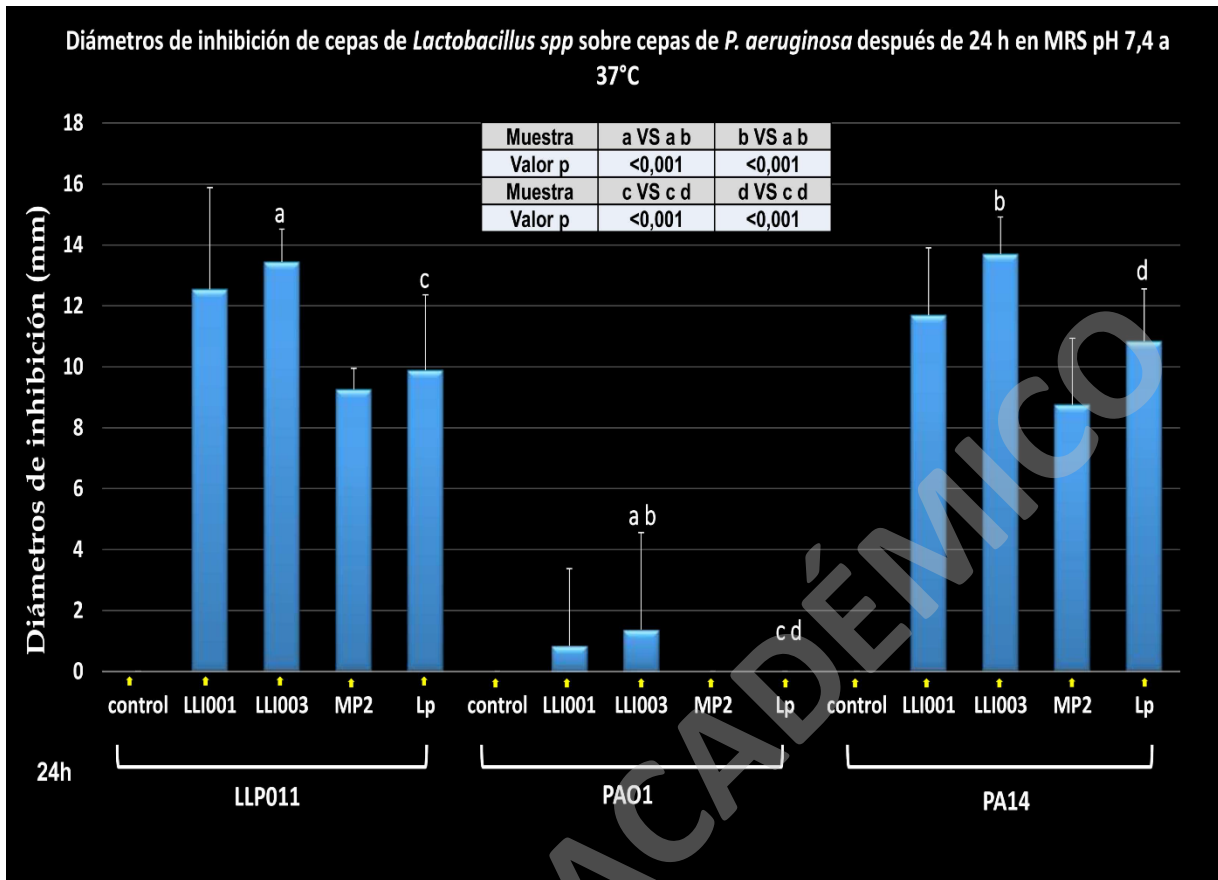


Figura 4: Efecto inhibitorio de los WBC de especies de *L. kunkeei* y *L. plantarum* sobre cepas de *P. aeruginosa* en placa. Inhibición sobre el césped bacteriano de cepas de *P. aeruginosa* en placa, por WBC de especies de *L. kunkeei* y *L. plantarum* en pocillos, procedentes de cultivos de MRS pH 7,4, después de 24 horas. (Control), Caldo MRS pH 7,4. (Especies de *L. kunkeei*), LLI001, LLI003 y MP2. (Lp), *L. plantarum*. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (PAO1), *P. aeruginosa* PAO1. (PA14), *P. aeruginosa* PA14. (WBC), cultivo bacteriano completo. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.

4.2. Efecto Inhibitorio en cultivos completos bacterianos y sobrenadantes libre de células de *Lactobacillus spp.* sobre *Pseudomonas aeruginosa* en medio sólido y líquido

Se realizó ensayo de inhibición de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* sobre *P. aeruginosa* (cepas PA14, PAO1 y LLP011) en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 h a diferentes valores de pH (pH 5,7; 6,2; 7,4) tanto del cultivo completo bacteriano (WBC), como del sobrenadante libre de células (CFS) con la finalidad de establecer las mejores condiciones de inhibición. La **figura 5** muestra que el WBC de *L. kunkeei* LLI003 a pH 6,2 presentó mayor inhibición de las cepas de *P. aeruginosa* en comparación con otras condiciones de pH, mientras que el CFS no mostró mayores diferencias entre los diferentes tratamientos (**figura 5**). Los resultados mostraron nuevamente que *L. kunkeei* LLI003 es la cepa que produce un mayor halo de inhibición, para cada una de las cepas de *P. aeruginosa* en comparación las otras cepas de *Lactobacillus* utilizadas. Se realizó el Ensayo de Inhibición en Curva de Crecimiento utilizando el CFS *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* sobre un cultivo de *P. aeruginosa* LLP011 en condiciones aeróbicas a 37°C por 14 h en valores de pH 6,2 y pH 7,4, donde en agar se observaba mayor efecto inhibitorio.

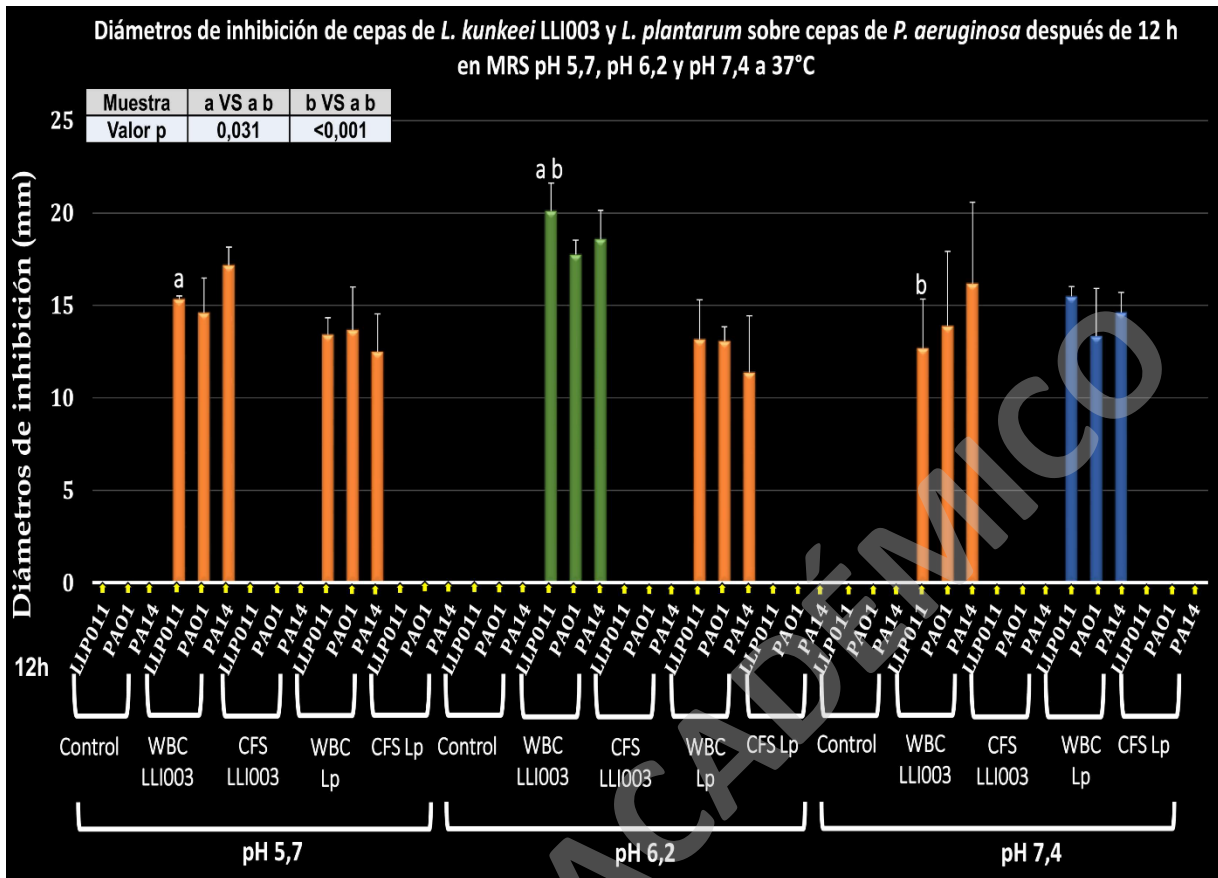


Figura 5: Efecto inhibitorio de los WBC de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* procedentes de cultivos de MRS pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4 sobre las cepas de *P. aeruginosa* en placa. Inhibición sobre el césped bacteriano de cepas de *P. aeruginosa* en placa, por WBC de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en pocillos, procedentes de cultivos de MRS a pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4, después de 12 horas. (Controles), Caldo MRS pH 5,7, pH 6,2 y pH 7,4. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (Lp), *L. plantarum*. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (PAO1), *P. aeruginosa* PAO1. (PA14), *P. aeruginosa* PA14. (CFS), sobrenadante libre de células. (WBC), cultivo bacteriano completo. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.

En la **figura 6** se puede observar que el CFS tanto de *L. kunkeei* LLI003 como *L. plantarum* generan inhibición en el crecimiento de *P. aeruginosa* que se considera estadísticamente significativo. Sin embargo, es claramente observable que, contrario a lo que se obtuvo en medio sólido, *L. plantarum* presenta un efecto inhibitorio que es evidentemente superior. Frente a estos resultados, cabía preguntarse, si el efecto observado en placa agar con el WBC se debía a la interacción física permanente, entre el cultivo en el pocillo que contenía bacterias *L. kunkeei* y las bacterias de *P. aeruginosa* que estaban contenidas en el agar blando, y que esto pueda inducir una respuesta antibacteriana por parte de las bacterias ácido lácticas *in situ*. Para evaluar lo anterior, se utilizará un sistema más sensible, que es el ensayo de inhibición en curva de crecimiento, y esta interacción física se realizará mediante el cocultivo de las cepas en el mismo tubo de medio líquido y bajo las mismas condiciones. Si esta interacción física genera una respuesta antimicrobiana, al aislar el CFS podría observarse una respuesta mayor a lo que se obtuvo anteriormente.

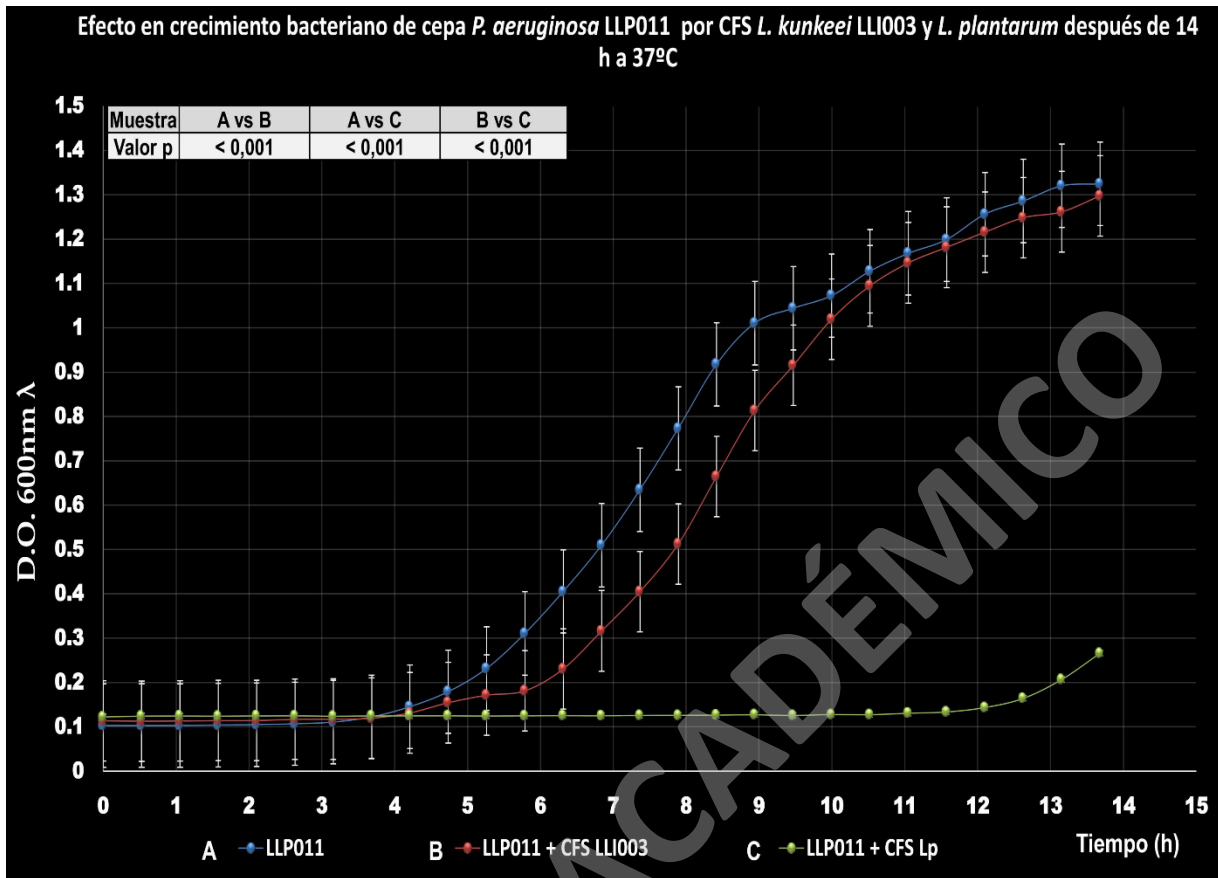


Figura 6: Efecto de los CFS de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 14 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (Lp), *L. plantarum*. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (CFS), sobrenadante libre de células. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.

4.3. Efecto inhibitorio en cultivo líquido de *Pseudomonas aeruginosa* mediante sobrenadante libre de células en monocultivo y cocultivo

Se realizó un ensayo de inhibición en curva de crecimiento de *P. aeruginosa* (cepas PAO1, PA14, LLP011) junto CFS *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* de monocultivo y cocultivo en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 horas, con el propósito de saber si el efecto de inhibición observado depende de la presencia del patógeno e interacción. Un cocultivo a diferencia de un monocultivo, el cual consta de un cultivo de una sola especie microbiana en condiciones asépticas, el cocultivo es un cultivo de diferentes especies microbianas especificadas bajo condiciones asépticas (103). En las **figuras 7, 8 y 9 (Anexo 6, 7 y 8, con tratamiento adicional de CFS de *P. aeruginosa*)**, se puede observar que en todos los casos y para cada una de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*, el efecto inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus* se ve significativamente potenciado. No obstante nuevamente el efecto fue mayor por parte de *L.plantarum* que por *L. kunkeei* LLI003.

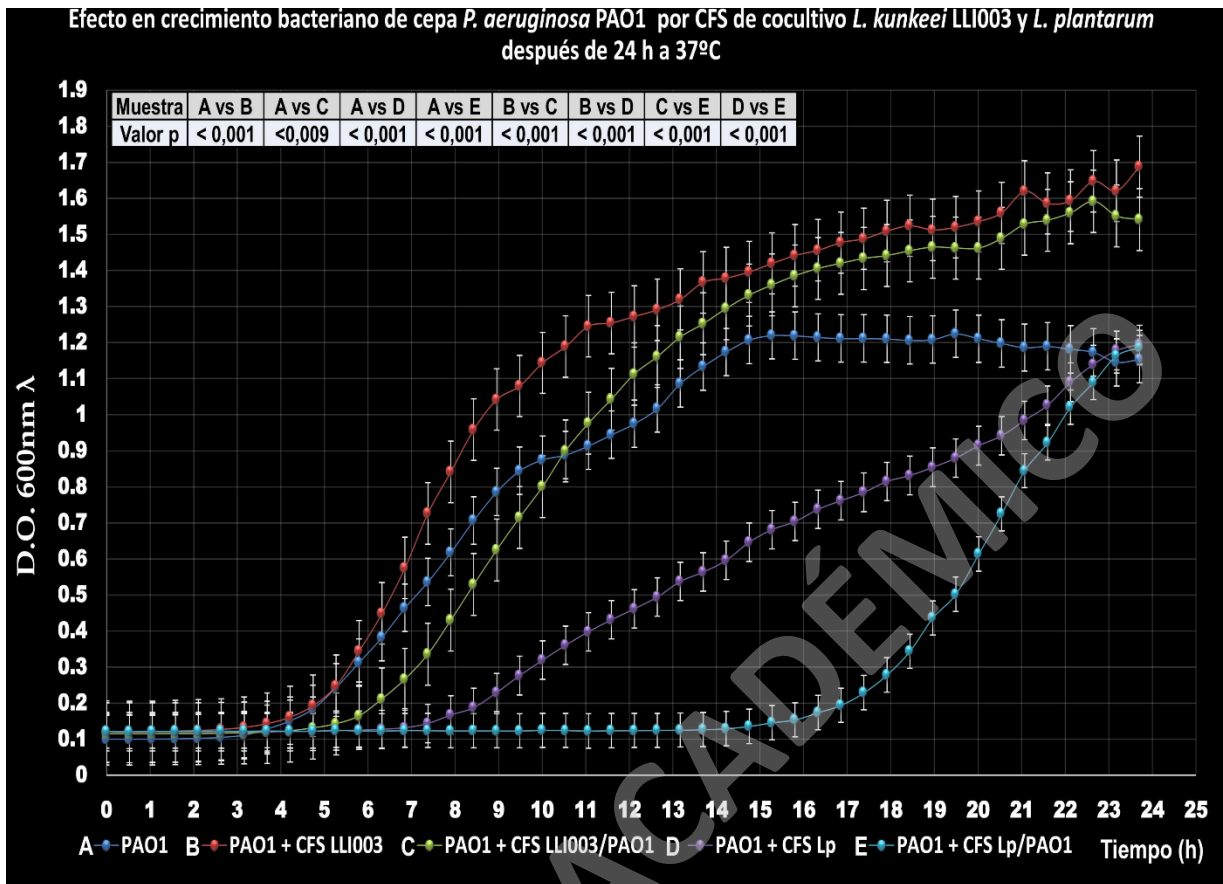


Figura 7: Efecto en los CFS de cocultivo de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (Lp), *L. plantarum*. (PAO1), *P. aeruginosa* PAO1. (CFS), sobrenadante libre de células. (.), cocultivo. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicados.

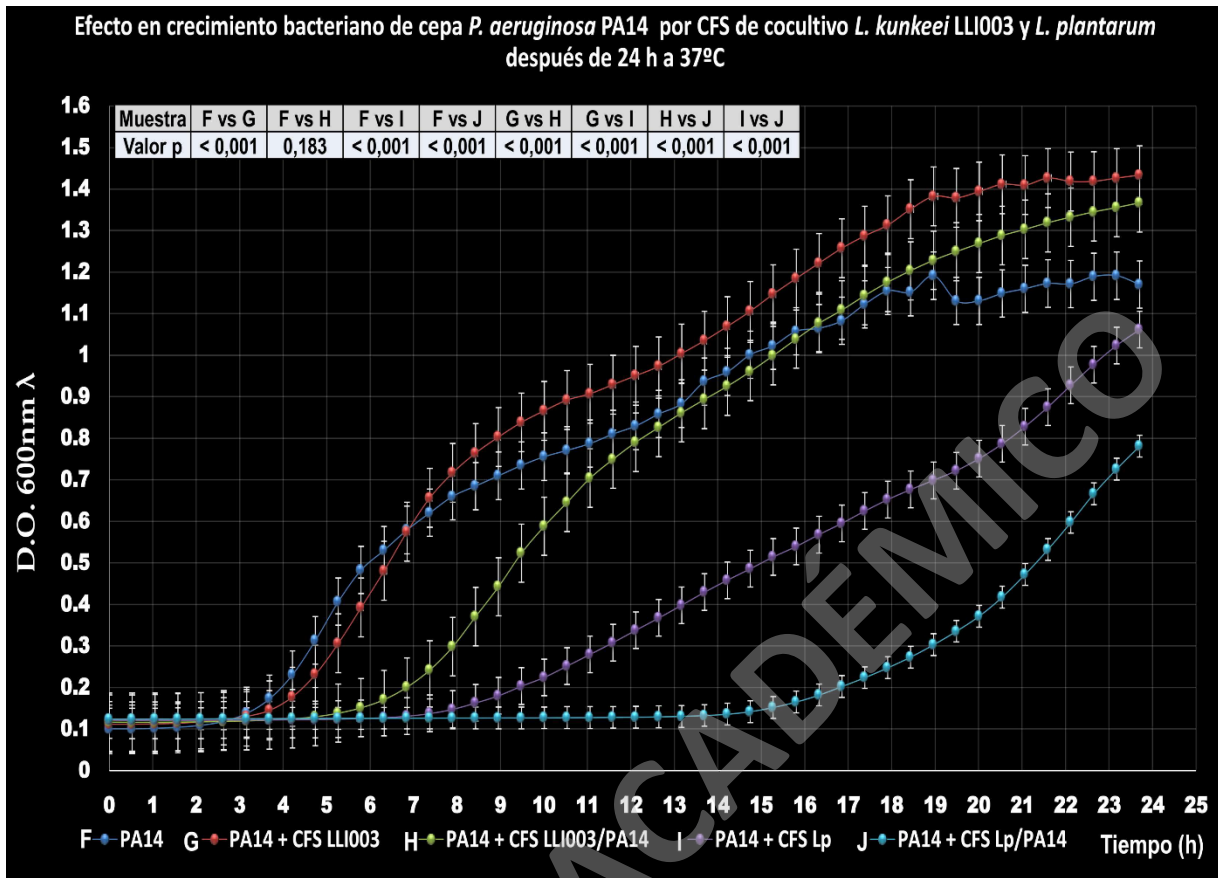


Figura 8: Efecto en los CFS de cocultivo de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* PA14. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600 nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (Lp), *L. plantarum*. (PA14), *P. aeruginosa* PA14. (CFS), sobrenadante libre de células. (/), cocultivo. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicados.

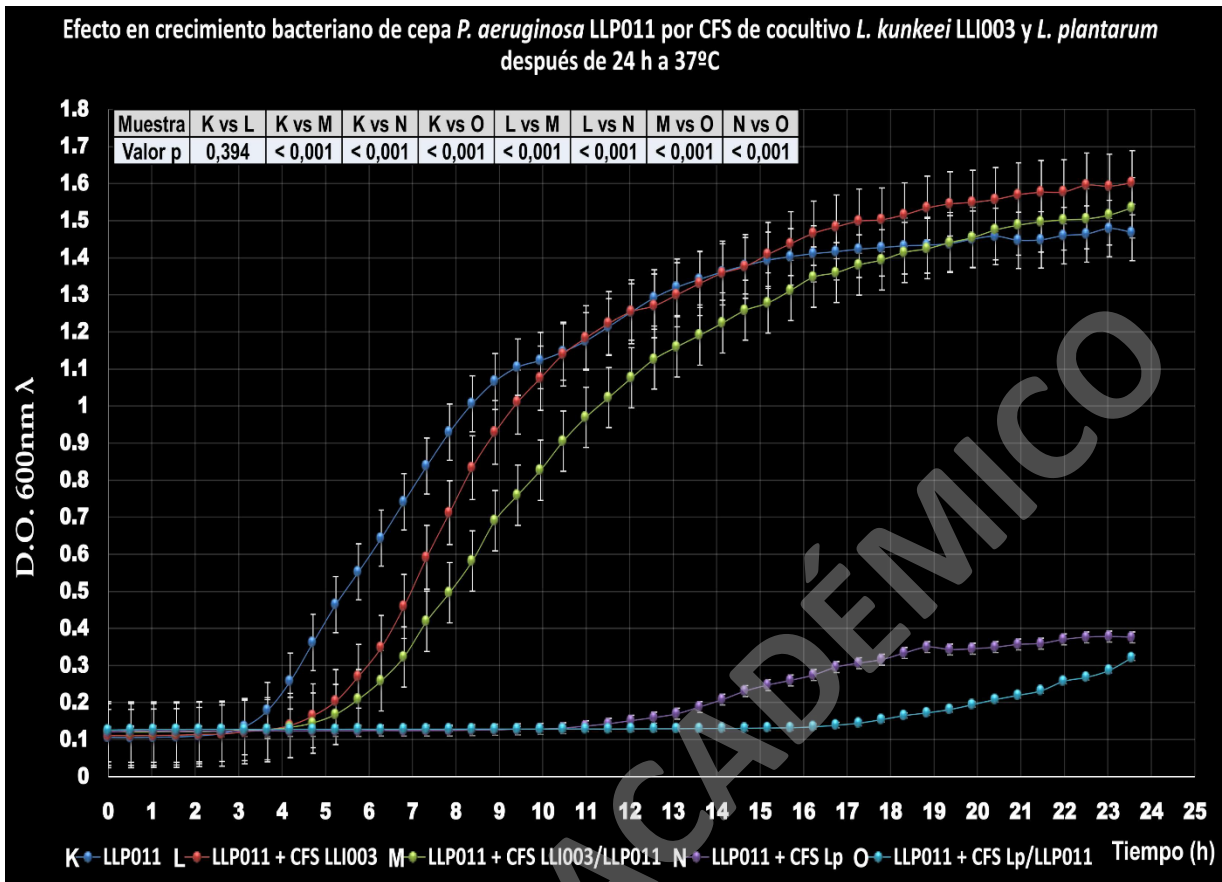


Figura 9: Efecto en los CFS de cocultivo de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 h con medición en cada 30 minutos a λ 600 nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (Lp), *L. plantarum*. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (CFS), sobrenadante libre de células. (/), cocultivo. Se muestra el promedio de ensayos independientes, realizados en triplicado: LLP011 (n=23); LLP011+CFS LLI003 (n=9); LLP011+CFS LLI003/LLP011 (n=9); LLP011+CFS Lp/LLP011 (n=9); LLP011+CFS Lp/LLP011 (n=9).

4.4. Efecto inhibitorio en cultivo líquido en especie de *Pseudomonas aeruginosa* LLP011 mediante sobrenadante libre de células proveniente de cocultivo tratadas con enzimas y temperatura

Con la finalidad de analizar la estabilidad del efecto antimicrobiano observado frente diferentes condiciones, se realizó un Ensayo de Inhibición en Curva de Crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011 junto CFS *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* previamente cocultivadas con el patógeno bajo tratamiento enzimático (Proteinasa K y Tripsina por 2 horas, a 40°C y 4,8mg/mL de concentración final) y térmico (95°C por 15 minutos en baño maria) en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 horas, con el propósito de saber si el efecto de inhibición observado es afectado negativamente por condiciones denaturantes para compuestos peptídicos (**figura 10**). Los resultados mostraron que CFS de cocultivo de *L. kunkeei* LLI003 con *P. aeruginosa* LLP011 tratados por peptidasas presentaron una disminución significativa en el efecto inhibitorio, lo que habla de la presencia de compuestos peptídicos, pero que no se afectaron por el tratamiento térmico (**figura 10**). Por otra parte, el efecto inhibitorio de *L. plantarum* no se vió afectado bajo ninguna de las condiciones ensayadas (**figura 11**).

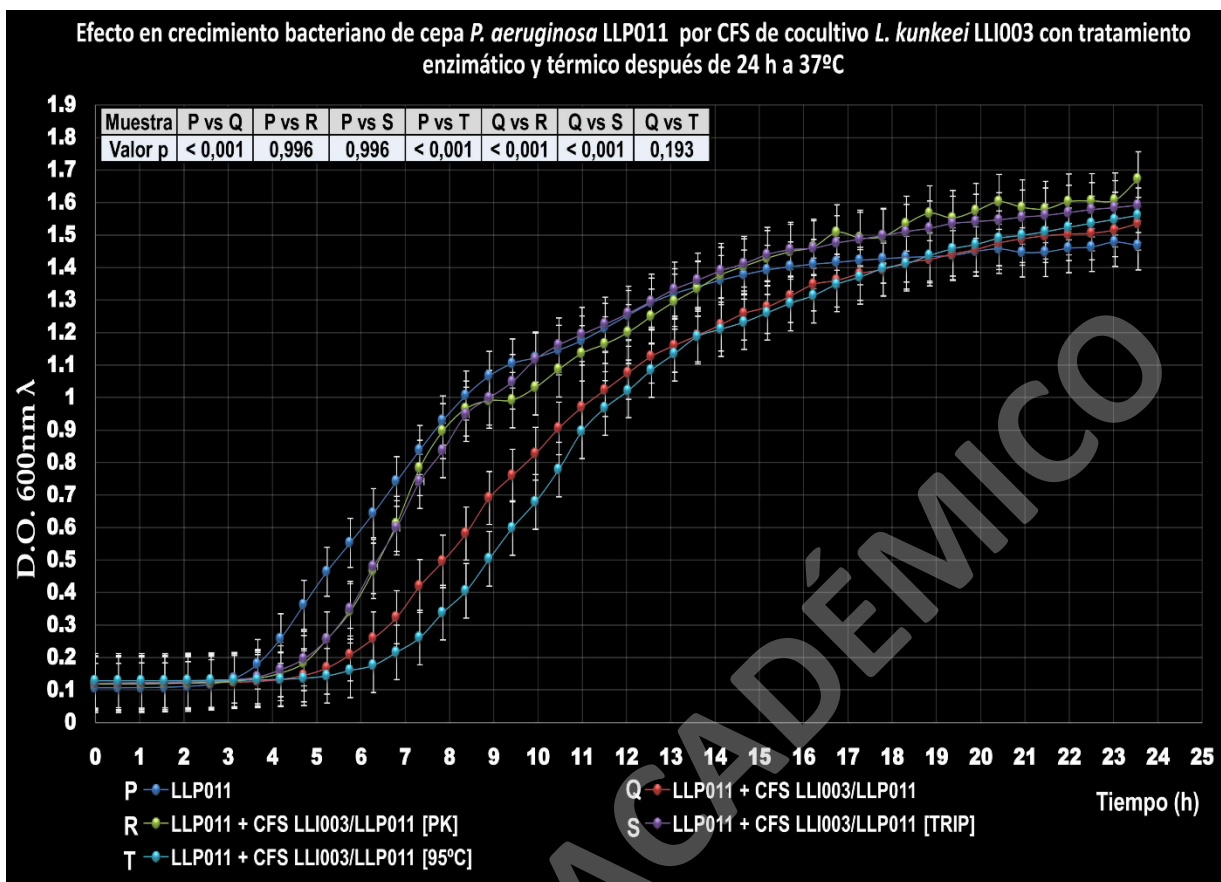


Figura 10: Efecto del tratamiento enzimático y térmico en los CFS de cocultivo de *L. kunkeei* LLI003 en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600 nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (LLI003), *L. kunkeei* LLI003. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (CFS), sobrenadante libre de células. (/), cocultivo. Tratamiento Enzimático: Proteinasa K (PK); Tripsina (TRIP) por 2 horas a 40°C, concentración final 4,8 mg/mL. Tratamiento Térmico: 95°C por 15 minutos mediante baño maría. Se muestra el promedio de ensayos independientes, realizados en triplicado: LLP011 (n=23); LLP011+CFS LLI003/LLP011 (n=9); LLP011+CFS LLI003/LLP011 [PK] (n=4); LLP011+CFS LLI003/LLP011 [TRIP] (n=2); LLP011+CFS LLI003/LLP011 [95°C] (n=4).

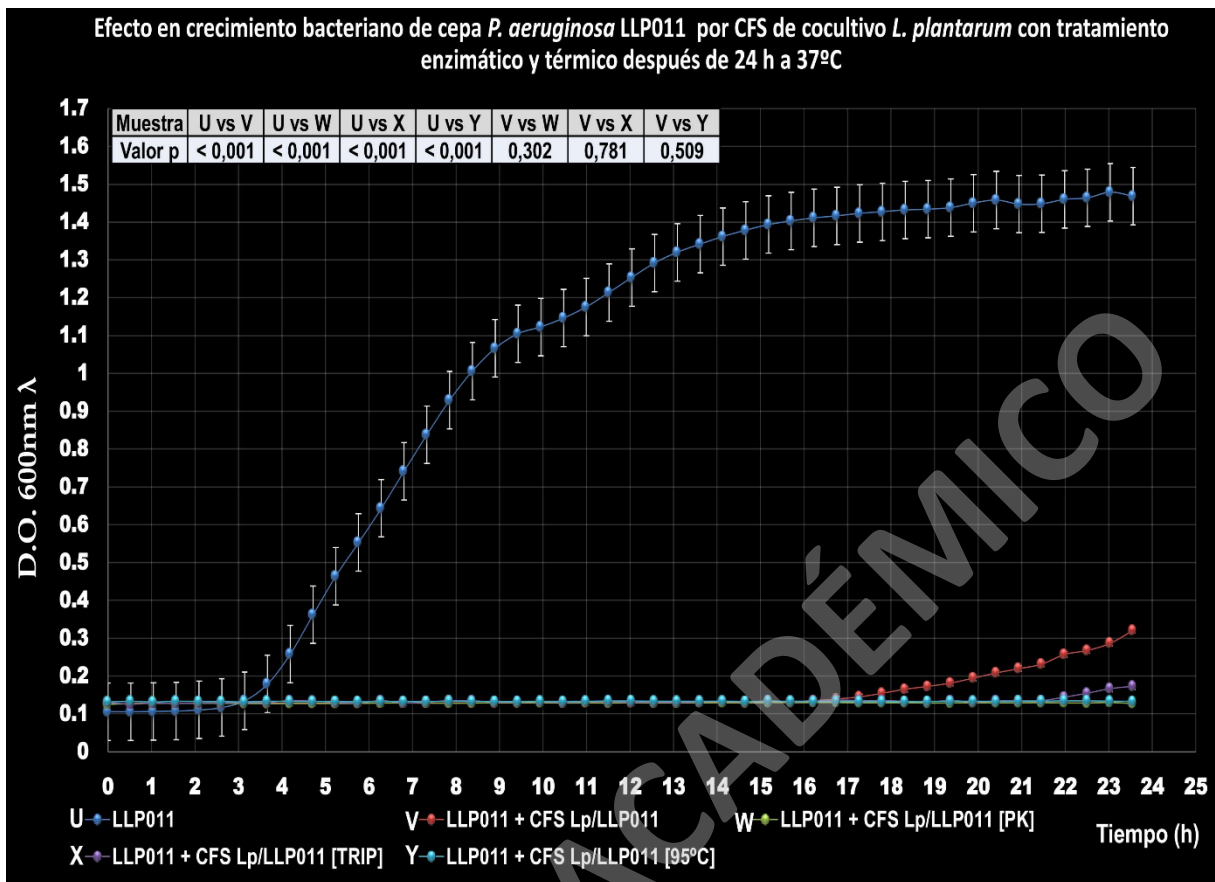


Figura 11: Efecto del tratamiento enzimático y térmico en los CFS de cocultivo de *L. plantarum* en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* LLP011. El crecimiento bacteriano se mide por ciclo cinético de 24 horas con medición en cada 30 minutos a λ 600 nm, la incubación a 37°C y agitación por cada 30 minutos. (Lp), *L. plantarum*. (LLP011), *P. aeruginosa* LLP011. (CFS), sobrenadante libre de células. (/), cocultivo. Tratamiento Enzimático: Proteinasa K (PK); Tripsina (TRIP), por 2 horas a 40°C, concentración final 4,8 mg/mL. Tratamiento Térmico: 95°C por 15 minutos mediante baño maría. Se muestra el promedio de ensayos independientes, realizados en triplicado: LLP011 (n=23); LLP011+CFS Lp/LLP011 (n=9); LLP011+CFS Lp/LLP011 [PK] (n=4); LLP011+CFS Lp/LLP011 [TRIP] (n=2); LLP011+CFS Lp/LLP011 [95°C] (n=4).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos antimicrobianos contra patógenos resistentes a los antibióticos

La evaluación y aplicación de compuestos bioactivos por parte de bacterias ácido lácticas (LAB) puede ser una alternativa contra bacterias patógenas resistentes a los antibióticos y causantes de enfermedades en humanos, animales y vegetales, debido a sus propiedades probióticas, cuyas características incluyen la capacidad de producción de compuestos con propiedades bacteriostáticas o bactericidas según concentración y célula blanco, tales como ácidos orgánicos (acético, propiónico, fórmico, succínico y láctico), peróxido de hidrógeno etanol, ácido benzoico y péptidos antimicrobianos como bacteriocinas (**63, 64 y 104-106**). Estos compuestos afectan blancos bacterianos implicados en la integridad, metabolismo, supervivencia celular y la estructura de membrana, alterando su funcionalidad, acidificando el citoplasma y promoviendo la oxidación de proteínas, lípidos, ácido desoxirribonucleico, etcétera. Algunos de ellos tienen como mecanismo de acción principal la generación de poros en la membrana celular provocando disminución de ATP, liberación de macromoléculas y lisis celular, o bien, disrupción del potencial de membrana, aunque también pueden inhibir la síntesis proteica, provocar desnaturalización del ADN o promover la activación de autolisinas (**105 y 107-109**), mediar señales de *quorum-sensing* en biopelículas, densidad bacteriana y alterar finalmente, los mecanismos de protección del nicho ecológico (**60, 110 y 111**). Estos metabolitos y las bacteriocinas suelen ser producidos y secretados *in situ* en el nicho establecido (**60, 62-64 y 66**). Para obtener estos compuestos y/o analizar su actividad antimicrobiana, se suele analizar el sobrenadante (CFS) o el cultivo completo (WBC) de las diferentes LABs. Las estrategias que se suele utilizar para el análisis de inhibición del CFS o WBC, son mediante el análisis de los halos de inhibición de alícuotas del sobrenadante libre de células (CFS) o del WBC sobre césped de la bacteria blanco (o "*Spot-on-lawn Assay*") (**112 y 113**), y/o el método de difusión en agar (o "*Agar Diffusion Assay*") (**113 y 114**), el método de difusión por pocillo en agar (o "*Well Diffusion Assay*") (**114 y 115**).

Entre las LABs, el género *Lactobacillus spp.* es uno de los más estudiados por sus propiedades probióticas de varios de sus miembros y entre estos, la especie más caracterizada genética, metabólica y biotecnológicamente es *Lactobacillus plantarum*, que otorga el respaldo como modelo de referencia en la búsqueda de compuestos bioactivos como bacteriocinas y entre otros compuestos ya

mencionados (116). Entre sus bacteriocinas o plantaricinas (plan) mejor caracterizadas están; plan UG1 (*L. plantarum* UG1), plan 35d (*L. plantarum* 35d), plan 154 (*L. plantarum* LT154), plan ST202Ch (*L. plantarum* ST202Ch), plan bac ST216 (*L. plantarum* ST216Ch), plan W (*L. plantarum* PMU 33), plan F (*L. plantarum* BF001), plan ST28MS (*L. plantarum* ST28MS), plan ST16MS (*L. plantarum* ST16MS), plan EF, plan JK y factor de inducción A (plan A, *L. plantarum* C11), plan S y plan T (*L. plantarum* LPC010), plan ST16Pa (*L. plantarum* ST16Pa), plan 163 (*L. plantarum* 163), plan AMA-k (*L. plantarum* AMA-K), pediocin AcH (*L. plantarum* WHE92), plan pediocina LB-B1 (*L. plantarum* LB-B1), plan ST13BR (*L. plantarum* ST13BR), plan ST194BZ alfa y ST194BZ beta (*L. plantarum* ST194BZ), plan 423 (*L. plantarum* 423), que tienen acción antimicrobiana contra bacterias como; *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *S. aureus*, *A. hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter Cloacae*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *A. baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* (117). Las diversas plantaricinas se dividen en diferentes clases I, II, IIa, IIb, IIc, IId y III (118), donde en su mayoría al ser termo estables (excepto clase III) posibilita su amplia aplicación industrial en la industria farmacéutica, agronómica y médica.

La búsqueda de nuevos probióticos por sus propiedades benéficas durante años han sido en productos lácteos, alimentos frescos o fermentados, alimentos diarios en general, tractos digestivos e incluso leche materna, no obstante, en los últimos años ha incrementado el interés en la búsqueda de probióticos en ambientes ecológicos o nichos específicos y en organismos no convencionales (119).

Entre las especies nuevas de bacterias LABs que han comenzado a ser descritas y caracterizadas, está *Lactobacillus kunkeei*, un subgrupo de bacterias LABs categorizadas como bacterias fructófilas de ácido láctico (bacterias FLABs), que durante años las investigaciones sólo han descrito genomas, procedencia en el ecosistema y caracterizaciones al microorganismo (81-86 y 120-123), pero recientemente ya han descrito poseer propiedades profilácticas en insectos y humanos (87-89 y 124-126), así también propiedades antimicrobianas contra patógenos de interés clínico y apícola (127-130), sin embargo, en su mayoría, salvo algunos pocos ejemplos, no indica si los efectos inhibitorios corresponden a bacteriocinas u otros metabolitos. Uno de estos ejemplos es un estudio de Butler y cols. (2013), donde demostraron que *L. kunkeei* Fhon2N, cuando se somete a estresores microbianos tales como lo son el ácido lipoteicoico de *Streptococcus pyogenes* y el lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* en

cocultivo, en comparación a condiciones sin estresores, secreta proteínas del tipo bacteriocina de clase III y lisozimas, lo que habla del potencial de esta especie, altamente ubicua y, por ende, una excelente candidata a fuente de metabolitos antimicrobianos y bacteriocinas (131).

5.2. Efecto antimicrobiano de *L. kunkeei* y *L. plantarum* sobre el patógeno *P. aeruginosa*

En nuestro estudio, en la **figura 4** se puede observar que entre las cepas de *L. kunkeei* estudiadas, la cepa LLI003 presentó mayor efecto inhibitorio incluso sobre la bacteria que era control de referencia, *L. plantarum*, lo que sugiere que esta cepa produce posiblemente agentes antimicrobianos que son más específicos contra las cepas de *P. aeruginosa* ensayadas (131). Por ejemplo, en el estudio Todorov & Dicks (2005), *L. plantarum* ST194BZ inhibió a la cepa *P. aeruginosa* 7, no así contra *P. aeruginosa* 22, lo que sugiere que existiría una sensibilidad específica frente a los microorganismos por parte de las diferentes cepas del patógeno. En éste caso, puede que *L. plantarum* sea menos inhibitoria que *L. kunkeei* por características intrínsecas de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1, PA14 y LLP011. Por otra parte, la diferencia en la actividad también puede deberse a la cepa de *L. plantarum* utilizada (132). En un estudio de Alebiosu y cols. (2017), en ensayos con CFS, *L. plantarum* 10 no mostró inhibición contra *P. aeruginosa*, pero sí contra *Providencia vermicola* y *Alcaligenes faecalis*, sin embargo especies *L. plantarum* 7, 9 y 11 sí mostraron inhibición contra *P. aeruginosa*. Por lo tanto, es posible que la cepa de *L. plantarum* utilizada no fuera altamente inhibitoria contra las cepas *P. aeruginosa* utilizada por sus características intrínsecas. Así, y para realmente poder concluir que *L. kunkeei* LLI003 tiene mayor capacidad inhibitoria que *L. plantarum* bajo estas condiciones, la cepa debería ser comparada con una mayor cantidad de cepas de *P. aeruginosa* y con diferentes cepas de *L. plantarum* (133).

Otra posibilidad de la mayor capacidad de inhibición de *L. kunkeei* LLI003 frente a *L. plantarum* contra *P. aeruginosa* es la concentración de el (los) agente (s) antimicrobiano(s) ya que esto(s) es (son) determinante(s) en el efecto inhibitorio final (134). En el estudio de Lin y cols. (2017), el extracto de CFS de *L. plantarum* NTU102 a una concentración de 75 mg/mL generó una zona de inhibición aproximadamente de 12 mm contra césped de *P. aeruginosa* BCRC 11864, mientras que el extracto de CFS a una concentración de 200 mg/mL generó una zona de inhibición de aproximadamente 25 mm (134). Así, *L. kunkeei* puede estar generando una mayor concentración de algún metabolito o bacteriocina que lo hace más eficiente frente al microorganismo control.

Además de la concentración, los antimicrobianos tienen condiciones óptimas donde su actividad es máxima. Dado esto, es necesario evaluar la estabilidad de la potencial sustancia antimicrobiana ante diferentes condiciones, una de ellas es el pH. Así se analizó el efecto inhibitorio de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* contra *P. aeruginosa*, creciendo estas cepas en MRS a diferentes valores de pH 5,7, 6,2 y 7,4. En **figura 5** observamos que LLI003 mejoró el efecto inhibitorio a un pH 6,2 significativamente en comparación a los pHs 5,7 y 7,4. Mientras que *L. plantarum* mejoró a un pH de 7,4 en comparación a los pHs 5,7 y 6,2, pero de manera no significativa. Entre ambas cepas, *L. kunkeei* LLI003 mostró siempre mayor efecto inhibitorio que *L. plantarum* a pH's ácidos. De esta manera, la(s) sustancia(s) o bacteriocina(s) producidas por esta cepa son más estables o se producen en mayor concentración a valores de pH ácido lo que favorece también la existencia de ácidos orgánicos. Se sabe que el efecto de los ácidos orgánicos se potencia en valores menores pH 7,0, por lo que no se puede descartar que el mayor efecto inhibitorio observado en la cepa de *L. kunkeei* sea un efecto sinérgico entre potenciales bacteriocinas y ácidos orgánicos sobre el patógeno. Por otra parte, es posible que la actividad de las bacteriocinas se vea potenciado a valores de pH de 6,2. Esto último ya fue observado en un estudio de Yang y cols. (2018), donde los investigadores notaron que sus bacterias LABs, cultivadas a 37°C en MRS a pH 6,2 obtuvieron mayor actividad de los CFS, mientras que en MRS pH 7,4 incrementaron sólo la razón de crecimiento, con lo que finalmente determinaron que la condición óptima para producir bacteriocinas en sus bacterias LAB es en medio MRS a pH 6,2 en 37°C (**100**). Es decir, una mayor tasa de crecimiento no determina, necesariamente, una mayor actividad antimicrobiana. Por otro lado, y aunque las especies de *L. plantarum* pueden producir bacteriocinas en un amplio rango de valores de pH (plan 423 estable a pH 1-10, plan DL3 estable a pH 2,5-5,5, plan ZI008 estable a pH 4,0-5,0, plan ZJ5 estable a pH 2,0-6,0 y plan LBP102 estable a PH 1,0-4,0 (**134**, **135** y **136**) hay antecedentes que cepas de *L. plantarum* sintetizan mayor cantidad de bacteriocinas a valores de pH más alcalino. En un estudio de Todorov and Dicks (2005) observaron que el nivel de bacteriocinas en *L. plantarum* ST194BZ en medio MRS pH 4,5 fue de 3.200 unidades activas por mililitro (AU/mL), mientras que en MRS pH 6,5 aumentó los niveles de bacteriocina a 12.800 AU/mL (**132**) Dado que en este estudio se observó la actividad antimicrobiana en tres valores de pH en específico, lo ideal es realizar una cinética en un amplio rango de valores de pH donde se pueda corroborar la tasa de crecimiento y actividad antimicrobiana desde un pH extremadamente ácido (pH 2,0) a un pH extremadamente alcalino (pH 12)

tal y como se han hecho en estudios para analizar la actividad antimicrobiana de otra especie de *Lactobacillus*, *L. fermentum* F6 (137).

Así *L. kunkeei* LLI003, podría producir metabolitos como ácido láctico, acetato y CO₂ durante el proceso fermentativo (82, 86 y 138), se desconoce la presencia de otros componentes antimicrobianos, a excepción en la posible existencia de bacteriocina, tal como sugirieron en el estudio de Butler *et al.* (2013), pero se hace evidente, en este experimento en particular, que la actividad de los mismos se evidencia sólo en el WBC.

Debido a los antecedentes y que los cultivos WBC de LLI003 y *L. plantarum* mostraron inhibición contra las especies de *P. aeruginosa*, pero los CFS no mostraron efecto en agar, se evaluó el efecto inhibitorio en curva de crecimiento (en inglés; “Time-Kill Curve”, “Time-Kill Test” o “Killing-Curve Method”) de los CFS frente contra *P. aeruginosa* LLP011, el cual al ser una técnica más sensible permitiría observar algún efecto por parte de los CFS, que posiblemente por la baja concentración o la baja capacidad de difusión de los compuestos no fue posible la detección del efecto en placa agar. Por otra parte, la sensibilidad de las curvas permite obtener información sobre la dinámica del efecto antimicrobiano sobre el patógeno, mediante las interacciones dependientes del tiempo y/o dependientes de la concentración (139, 140 y 141).

En la **figura 6**, mediante una curva de crecimiento del patógeno LLP011 sin y con tratamiento de CFS durante periodo de tiempo de 14 h, y fue posible identificar el efecto antimicrobiano dependiente del tiempo, tanto para los CFS de LLI003 en MRS pH 6,2 como para *L. plantarum* en MRS pH 7,4 de manera significativa, sugiriendo que los *Lactobacillus* inhiben al patógeno durante la generación de la curva de crecimiento. En contraste a lo observado en agar, donde siempre se observó mayor actividad de *L. kunkeei* LLI003 que *L. plantarum*, en la curva se observa que *L. plantarum* presentó significativamente mayor inhibición que LLI003. Esta diferencia puede deberse a los mecanismos diferenciales respecto a la síntesis y/o producción de compuestos antimicrobianos por parte de las cepas que están siendo comparadas. Existen al menos tres factores o condiciones que pueden estar involucrados en este fenómeno: uno de ellos, es la difusión de los de los compuestos. Es probable que los compuestos antimicrobianos producidos por *L. plantarum* no sean fácilmente difusibles en medio MRS agar, a

diferencia de aquellos que produce *L. kunkeei*. Lo segundo, es el mecanismo mediante el que se producen: *L. kunkeei* podría requerir de la presencia de un estresor o inductor fisiológico o ambiental (alguna macromolécula del patógeno, alguna señal de quorum-sensing, metabolitos, etc.) para inducir la síntesis de las sustancias antimicrobianas, no así *L. plantarum* necesariamente. Por ejemplo, la biosíntesis de las bacteriocinas de clase II está regulada por un operón conformado por el gen de proteína inductora IF (factor de inducción) o feromona, gen proteína quinasa de histidina y gen regulador de respuesta, que sensan y regulan la expresión de bacteriocinas clase II por el umbral de autoinducción procedido por el factor de inducción, este mismo sería dependiente de la señalización celular o ambiental (76). Y tercero, como no se sabe la naturaleza de las sustancias antimicrobianas generadas por *L. kunkeei*, estas pueden ser mucho más inestables en CFS (o quedar retenidas en el filtro durante la esterilización) que aquellas producidas por *L. plantarum*.

Para evaluar dos de estas posibilidades, se realizaron dos acciones: primero, cocultivos de las cepas de *Lactobacillus* con las cepas de *P. aeruginosa* (Figuras 7, 8 y 9, ver más adelante) y segundo, caracterización preliminar mediante el tratamiento térmico y con proteasas (Figuras 10 y 11) lo que sólo nos dará punto de referencia de su naturaleza (ver más adelante).

5.3. Análisis del efecto del modelo de cocultivo entre las cepas de *Lactobacillus* y las cepas de *P. aeruginosa* sobre la actividad antimicrobiana

En las figuras Figura 7, 8 y 9, fue posible determinar el efecto inhibitorio dependiente del tiempo en curva de crecimiento contra las tres cepas de *P. aeruginosa* mediante los CFS procedentes de cocultivos entre especies de *Lactobacillus* y *Pseudomonas*. Se observó que el efecto de CFS tanto por LLI003 como *L. plantarum* aumenta significativamente el efecto inhibitorio contra el patógeno cuando existe interacción *in vitro* mediante co-cultivo con las diferentes cepas de *Pseudomonas* (PAO1, PA14 y LLP011). Tanto para *L. kunkeei* LLI003 como para *L. plantarum* se observó un mayor efecto antimicrobiano contra las diferentes cepas del patógeno siempre que se cocultivaba previamente con alguna de ellas. En los resultados anteriores se mostró que la interacción por cocultivo entre *L. kunkeei* y patógenos permitió mejorar los efectos antimicrobianos de manera significativa, sugiriendo que

especies de *Lactobacillus* regulan la expresión de compuestos antimicrobianos de síntesis inductiva o constitutiva. Se ha observado que el modelo de cocultivo puede ser eficiente para obtener sustancias antimicrobianas y de hecho, varios antibióticos se han identificado de esta forma (142 y 143).

La tecnología de cocultivo, corresponde a una incubación anaeróbica o aeróbica de diferentes cepas microbianas especificadas en condiciones asépticas produciendo la degradación y metabolización de sustratos por la actividad metabólica combinada de las cepas microbianas conocidas. Dichas interacciones microbianas pueden conducir a relaciones simbióticas, como también relaciones de competencia involucrando de esta manera mecanismos de protección y antagonismo, efectuadas por interacciones celulares directas de célula a célula o por sustancias de señalización o metabolitos secretados (144). Aunque esta técnica no es innovadora, aún no es una práctica habitual en los procedimientos de microbiología clásica, donde predomina el monocultivo estéril. Estudios de este tipo de estrategia han demostrado que son útiles para la aplicación en industria, puesto que permite la producción de distintas sustancias como ácidos orgánicos, etanol, enzimas y antimicrobianos, como también, procura ser una buena aproximación para estudios en biología sintética (145).

Respecto a la sensibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* frente al efecto antimicrobiano de *L. kunkeei* y/o *L. plantarum*, cuando se observan los resultados del cocultivo, se observan resultados similares a lo obtenido en medio sólido, en que *P. aeruginosa* PAO1 es menos susceptible que las cepas PA14 y LLP011. Este fenómeno había sido observado en trabajos previos donde la biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1 también era menos susceptible a la acción de diferentes cepas de *L. kunkeei* y *L. rhamnosus* en comparación con las cepas virulentas (89). Entre *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 existen diferencias genéticas relacionadas con el cluster de genes involucrados en la biogénesis en el antígeno-O entre otros, lo que permite deducir que las cepas pueden tener diferente composición molecular a nivel de pared celular lo que hace a algunas cepas más susceptible que otras a la acción de antimicrobianos (89 y 146).

Estudios en aislados clínicos de *P. aeruginosa* en pacientes que padecían fibrosis quística, presentaban un fenotipo con mayor producción de biopelículas y una predisposición de hipermutaciones en su genoma, generando de esta forma nuevas variantes en el nicho pulmonar. Esta alta tasa de variabilidad

a nivel de las cepas de *P. aeruginosa* hace que pueda presentar fenotipos diversos frente a un mismo tratamiento con antimicrobianos y, por tanto, hace altamente necesaria el análisis de efectividad de potenciales tratamientos en colecciones amplias de cepas (147-150). Esto último puede ser objetivo de un próximo estudio.

Debido a que estos cambios se producen también en los sucesivos pasajes de cultivo en los laboratorios (de donde provienen las cepas PAO1 y PA14) (151), el estudio fue focalizado en sus etapas finales al aislado clínico *P. aeruginosa* LLP011, cepa que había sido recientemente aislada desde un paciente chileno de fibrosis quística (152, 153 y 154).

5.4. Análisis del efecto de la temperatura y proteasas en la actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* sobre el sobrenadante de cocultivo *L. kunkeei* LLI003 y cepas de *P. aeruginosa*

Con la finalidad de conocer preliminarmente si existe presencia de proteínas del tipo bacteriocina involucradas en el efecto antimicrobiano o un metabolito de bacterias LAB sintetizado durante el proceso fermentativo, se efectuaron dos procedimientos que forman parte en la caracterización de bacteriocinas o proteínas antimicrobianas: el tratamiento enzimático para análisis de susceptibilidad proteolítica y el tratamiento térmico para evaluar la estabilidad térmica en altas temperaturas. Para el análisis de susceptibilidad proteolítica, las enzimas más comúnmente utilizadas son Proteinasa K y Tripsina entre un rango de 75 µg/mL y 5 mg/mL de concentración, entre 1h a 4 h de digestión a 37°C (o en temperatura óptima) de cada enzima con pH óptimo o bien pH del CFS en estudio, mientras que el análisis en la estabilidad térmica puede ser desde 30°C hasta 121°C en un período de tiempo de 5 minutos hasta 2 horas, todos estos parámetros son dependientes del autor o investigador (134, 136 y 155-164).

Se analizaron las muestras de CFS procedentes de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* con LLP011 con y sin tratamiento enzimático y térmico (Figura 10 y 11). Se observó que las muestras bajo tratamiento enzimático disminuyeron su efecto antimicrobiano contra *P. aeruginosa*, pero lejos de anularse, sugiriendo que el efecto final en los experimentos de inhibición es sinérgico por la coacción entre distintos compuestos antimicrobianos en el CFS y no sólo por compuestos peptídicos, como también es posible la existencia de proteínas resistentes a Proteinasa K y Tripsina (165-171), debido al

impedimento de acción enzimático en los sitios de corte por la estructura peptídica. Ejemplo de esto es la Plantaricina C, que es sensible a Tripsina pero no lo es a Proteinasa K (**172**).

Entre los compuestos no proteicos que pueden producirse es el ácido acético (acetato), que mostró efecto a una concentración mínima inhibitoria (MIC) al 2% contra aislados clínicos, y en casos más contemporáneos el MIC puede llegar al 3%-5% (**173 y 174**), tanto *L. kunkeei* LLI003 como *L. plantarum* son capaces de producir ácido acético, por lo que esto puede ser una posibilidad entre los componentes con actividad antimicrobiana.

Un factor posible a considerar es la participación de señalización celular como *quorum-sensing*, por ejemplo compuestos de acil-homoserina-lactonas (AHLs), que son sintetizadas por *P. aeruginosa* el cual permite modular la virulencia y formación de biopelículas. Existen estudios que observaron la disminución en la actividad o síntesis en AHLs, debido al CFS de *L. plantarum* ATCC 10241 (**175 y 176**). Este es un dato importante dado que se observa un aumento de la actividad antimicrobiana de las dos especies de *Lactobacillus* lo que puede llevarse por mecanismos de comunicación que pueden darse con el patógeno.

Existen evidencias por literatura que estudios en *L. plantarum* NC8 indicaron que la producción de plantaricina NC8 es mediado por mecanismo de autoinducción, que consiste en un sistema de regulación síntesis bacteriocina conformado por un péptido inductor o feromona que actúa como indicador de densidad celular, una proteína quinasa y un regulador de respuesta, como también por señalización de *quorum-sensing* debido a una condición ambiental o celular como la presencia de bacterias foráneas. Se observó que después de la cocultivación con cepas Gram positivo específicas o la adición de células muertas por calor de algunas cepas indicadoras, lograron identificar mayor número de transcritos, mientras que CFS de dichas cepas inductoras no tuvieron ningún efecto. Por lo demás este sistema de producción de bacteriocina es un fenotipo inestable, debido a la reducción en la síntesis del péptido inductor en condiciones de laboratorio, en contraparte con los altos niveles basales del péptido inductor en condiciones ambientales, lo que sugiere que la síntesis de péptidos por expresión constitutiva pueden variar bajo presión dinámica del ambiente y densidad celular o poblacional (**177, 178 y 179**). Por otra parte, existe evidencia de las amplias funciones de las bacteriocinas no solo como

moléculas bacteriostáticas, bacteriocidas o bacteriolíticas, sino que también como moléculas señalizadoras; *quorum-quenching* y *quorum-sensing* en comunicaciones interespecies y *quorum-sensing* en comunicaciones intraespecies, incluso como antivirales, anticancerígenos y espermatocidas (110 y 111).

De esta manera es posible que exista una comunicación de célula a célula entre nuestras especies de *Lactobacillus* y *Pseudomonas aeruginosa*, debido a moléculas de señalización o productos metabólicos, que por cierto debe ser corroborado y caracterizado por experimentaciones y análisis genómicos, transcriptómicos, *in silico* y bioquímico.

Por otra parte, el tratamiento térmico para ambos CFS de *L. kunkeei* LLI003 y *L. plantarum* no disminuyeron el efecto antimicrobiano. Como indica la literatura, existen bacteriocinas que son resistentes a las altas temperaturas (117, 118 y 135) no obstante se desconoce por qué no presenta un patrón en la curva similar o incluso menor a la muestra sin tratamiento. Una posibilidad puede ser que los productos que se obtienen como consecuencia del tratamiento térmico, que afecta tanto al medio de cultivo así como a las sustancias producto de la acción bacteriana, sean tóxicas contra *P. aeruginosa*.

En resumen con respecto a la caracterización parcial de los CFS de cocultivos, se puede sugerir que el efecto observado tanto de *L. kunkeei* así como *L. plantarum* sobre cultivos de *P. aeruginosa*, puede ser producto de un conjunto de compuestos de diferente naturaleza que actúan de forma sinérgica, sobre todo en cuando se encuentran conviviendo al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Lo anterior también tiene toda una implicancia ecológica ya que muestra el fuerte impacto que tiene la convivencia de sólo dos tipos de especies y, por lo tanto, lo significativo que es escalar esto a nivel de microbiota, que es el escenario real donde los patógenos se desenvuelven. El estudio de interacciones bacteria-bacteria en comunidades será crucial para el descubrimiento de nuevos tratamientos y mecanismos antimicrobianos.

6. CONCLUSIONES

En base a la hipótesis planteada, los objetivos estimados y los resultados obtenidos, es posible concluir que:

- 1) Las especies de *Lactobacillus kunkeei* pueden actuar contra el crecimiento del patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, donde la cepa *L. kunkeei* LLI003 es la más efectiva.
- 2) Tanto la cepa *L. kunkeei* LLI003 como *L. plantarum*, mejoraron significativamente el efecto antimicrobiano contra *P. aeruginosa* cuando son previamente co-cultivadas con el patógeno.
- 3) El efecto antimicrobiano observado parece ser debido al efecto de tanto moléculas de naturaleza proteica como no proteicas.

Por lo tanto *L. kunkeei* es una especie novedosa que tiene la capacidad de generar sustancias antimicrobianas contra *P. aeruginosa* y con esto ser fuente de nuevos tratamientos para este y otros patógenos de importancia en medicina humana.

SOLO USO ACADÉMICO

7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

El presente trabajo busca contribuir en la investigación de nuevos compuestos antimicrobianos con potencial aplicación como tratamiento contra patógenos resistentes a los antibióticos, específicamente *P. aeruginosa*.

Acorde a lo anterior, es fundamental investigar la existencia de bacteriocina(s) de la especie *L. kunkeei* en el CFS derivado del cocultivo, dado a la implicancia biotecnológica y el poder comercial que posee dicho metabolito en industrias alimentarias, farmacéutica y médica. Para ello se recomienda experimentaciones futuras que permitan concentrar y precipitar péptidos existentes, por ejemplo precipitación por sulfato de amonio, luego identificar el compuesto por geles de proteína y HPLC acoplado a espectrometría de masa e identificar las secuencias aminoacídicas (o enviar a secuenciar los residuos). Posteriormente por análisis bioinformático para identificar por comparación y similitud contra otras bacteriocinas, e incluso, predecir la secuencia nucleotídica.

Finalmente, el estudio del potencial antimicrobiano en bacterias ambientales o de fuentes novedosas, como la microbiota de las abejas u otros animales, permitirá el descubrimiento de nuevas sustancias y/o mecanismos antimicrobianos que contribuyan a la industria farmacéutica y al tratamiento de las infecciones actualmente difíciles de tratar o intratables disminuyendo los costos, efectos y tiempos de la terapias sobre todo en aquellos pacientes más susceptibles a infecciones.

8. REFERENCIAS

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>. Available from: www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html. [Accessed 16th March 2020].
2. Review on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*, December 11, 2014. Available from: <https://amr-review.org/Publications.html>. [Accessed 30th October 2019].
3. Review on Antimicrobial Resistance. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations*, May 19, 2016. Available from: <https://amr-review.org/Publications.html>. [Accessed 30th October 2019].
4. CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. [Accessed 11th March 2020].
5. Thorpe K. E., Joski P. and Johnston K. J. Antibiotic-Resistant Infection Treatment Costs Hve Doubled Since 2002, Now Exceeding \$2Billion Annually. *Health Affairs*. (2018); 37 (4): 662-669.
6. Millanao A. R., Barrientos-Schaffeld C., Siegel-Tike C. D., Tomova A., Ivanova L. and Godfrey H. P., *et al.* Resistencia a los antimicrobianos en Chile y el paradigma de *Una Salud*: manejando los riesgos para la salud pública humana y animal resultante del uso de antimicrobianos en la acuicultura del salmón y en medicina. *Revista chilena de infectología*. (2018); 35 (3): 299-303.
7. World Health Organization. *Critically important antimicrobials for human medicine, 5th revision*, 2017. Available from: <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>. [Accessed 20th November 2020].
8. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. *Plan Nacional Contra La Resistencia a Los Antimicrobianos*, 2017. Available from: https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2017/08/Plan-Nacional-contr-la-resistencia-a-los-antimicrobianos.pdf. [Accessed 19th November 2020].
9. The Lancet One Health Comission. *The One Health*. Available from: <https://www.med.uio.no/helsam/english/research/centres/global-health/lancet-commision-one-health/>. [Accessed 4th Abril 2020].

10. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. *ISP informa sobre la resistencia a los antimicrobianos y los antibióticos más vendidos en Chile*, 2019. Available from: <http://www.ispch.cl/noticia/29305>. [Accessed 19th November 2020].
11. Instituto de Salud Pública de Chile|Ministerio de Salud. *Programa de Control de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Boletín de Resistencia Antimicrobiana*, 2018. Available from: <https://www.ispch.cl/boletin/>. [Accessed 5th March 2020].
12. The European Antimicrobial Resistance Surveillance. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2018*. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>. [Accessed 5th March 2020].
13. World Health Organization. *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report Early implementation, 2017-2018*. Available from: <https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2017-2018/en/>. [Accessed 5th March 2020].
14. Centre for Health Protection, Department of Health, The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. *Summary Report on Antimicrobial Resistance in Public Hospitals, Blood Culture for Year 2012-2017*. Available from: <https://www.chp.gov.hk/en/resources/29/index.html>. [Accessed 5th March 2020].
15. Johnson A. P. Surveillance of antibiotic resistance. *Philosophical Transactions B*. (2015); 370 (20140080): 1-12.
16. Perez Montoya L. H., Zurita Villarroel I. M., Pérez Rojas N., Patiño Cabrera N. and Calvimonte O. R. Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. *Revista Científica Ciencia Médica*. (2010); 13 (2): 90-94.
17. Tocornal Cooper J. Responsabilidad Civil por Infecciones Intrahospitalarias. *Revista Chilena de Derecho*. (2010); 37 (3): 1-28.
18. Ministerio de Salud, Republica de Chile. *Informe de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias, Chile 2018*. Available from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/08/INFORME-DE-VIGILANCIA-DE-IAAS-2018.pdf>. [Accessed 1th January 2021].

19. Brenner F. P., Nercelles M. P., Pohlenz A. M., Otaíza O. F., *et al.* Costo de las Infecciones Intrahospitalarias en hospitales chilenos de alta y mediana complejidad. *Revista Chilena de Infectología.* (2003); 20 (4): 285-290.
20. World Health Organization. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. [Accessed 27th October 2019].
21. Lister P. D, Wolter D. J. and Hanson N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews.* (2009); 22 (4): 582-610.
22. Wu W., Jin Y., Bai F. and Jin S. Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. In: Tang Y.-W., Sussman M., Liu D., Poxton I. and Schwartzman J. (eds.) *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Academic Press. Science Direct, Elsevier; 2015. p.753-767.
23. Szmolka A., Cramer N. and Nagy B. Comparative genomic analysis of bovine, environmental, and human strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters.* (2012); 335 (2): 113-122.
24. Botzenhart K. and Doring G. Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Campa M., Bendinelli M and Friedman H. (eds.) *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen*. Infectious Agents and Pathogenesis. Springer, Boston, MA.; 1993. p.1-18.
25. Blanc D. S., Francioli P. and Zanetti G. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units - A Reviews. *The Open Microbiology Journal.* (2007); 1: 8-11.
26. Moradali M. F., Ghods S. and Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* (2017); 7 (39): 1-29.
27. Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A. C., Levy S. B. & Jackson R. W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews.* (2011); 35 (4): 652-680.
28. Lee C.-H., Su T.-Y., Ye J.-J, Hsu P.-C. Kuo A.-J., Chia J.-H., *et al.* Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* (2017); 50 (5): 677-683.

29. Lucena A., Dalla Costa L. M., Nogueira K. S., Matos A. P., Gales A. C., Paganini M. C., *et al.* Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *Journal of Hospital Infection.* (2014); 87 (4): 234-240.
30. Picazo de la Garza J. J., Prieto Prieto J., *et al.* Capítulo 16 *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. In: Picazo de la Garza J. J. & Prieto Prieto J. (eds.) *Compendio de Microbiología (Segunda Edición)*. Elsevier, Elsevier España, S.L.U.; 2016. p.141-147.
31. Ahmad S., Alotaibi M. A and Alamri M. S. Antibiotic Sensitivity Pattern of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* at a Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences.* (2020); 19 (1): 79-82.
32. Sader H. S., Huband M. D., Castanheira M. and Flamm R. K. *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Susceptibility Results from Four Years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (2017); 61 (3): 1-7.
33. Javiya V. A., Ghatak S. B., Patel K. R. and Patel J. A. Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian Journal of Pharmacology.* (2008); 40 (5): 230-234.
34. Silva V., Marcoleta A., Silva V., Flores D., Aparicio T., Aburto I., *et al.* Prevalencia y perfil de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de úlceras crónicas infectadas en adultos. *Revista chilena de infectología.* (2018); 35 (2): 155-162.
35. Calvo J. and Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* (2009); 27 (1): 44-52.
36. Suárez C. J., Kattán J. N., Guzmán A. M. and Villegas M. V. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio.* (2006); 10 (2): 85-93.
37. Tafur J. D., Torres J. A. and Villegas M. V. Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos en Bacterias Gram Negativas. *Infectio.* (2008); 12 (3): 217-226.
38. Gómez Álvarez C. A., Leal Castro A. L., Pérez de González M. de J. and Navarrete Jiménez M. L. Mecanismos de Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: Entendiendo a un Peligroso Enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina.* (2005); 53 (1): 27-34.

39. Wang C. Y., Jerng J. S., Cheng K. Y., Lee L. N., Yu C. J. Hsueh P. R., *et al.* Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features risk-factors and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*. (2006); 12 (1): 63-68.
40. Gilla J. S., Arora S., Khanna S. P. and Kumar H. Prevalence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary level Intensive Care Unit. *Journal of Global Infectious Diseases*. (2016); 8 (4): 155-159.
41. Murray J. L., Kwon T., Marcotte E. M. and Whiteley M. Intrinsic Antimicrobial Resistance Determinants in the Superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. (2015); 6 (6): 1-10.
42. Jiménez Pearson M. A., Galas M., Corso A., Hormazábal J. C., Duarte Valderrama C., Salgado Marcano N, *et al.* Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*. (2019); 43: 1-8.
43. Chang R. Y. K., Wallin M., Lin Y., Leung S. S. Y., Wang H., Morales S., *et al.* Phage Therapy for Respiratory Infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2018); 133: 1-28.
44. Domenech M., Sempere J., de Miguel S. and Yuste J. Combination of Antibodies and Antibiotics as a Promising Strategy Against Multidrug-Resistant Pathogens of the Respiratory Tract. *Frontiers in Immunology*. (2018); 9 (2700): 1-8.
45. Cripps A. W., Peek K., Dunkley M., Vento K., Marjason J. K., McIntyre M. E., *et al.* Safety and Immunogenicity of an Oral Inactivated Whole-Cell *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine Administered to Healthy Human Subjects. *Infection and Immunity*. (2006); 7 (2): 968-974.
46. Gholizadeh P., Köse S, Dao S., Ganbarov K., Tanomand A., Dal T., *et al.* How CRISPR-Cas System Could Be Used to Combat Antimicrobial Resistance. *Infection and Drug Resistance*. (2020); 13: 1111-1121.
47. Dizaj S. M., Lotfipour F., Barzegar-J. M., Zarrintan M. H. and Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*. (2014); 44: 278-284.
48. Azam A., Ahmed A. S., Oves M., Khan M. S., Habib S. and Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. (2012); 7: 6003-6009.

49. Lakshminarayanan R., Ye E., Young D. J. Li Z. and Loh X. J. Recent Advances in the Development of Antimicrobial Nanoparticles for Combating Resistant Pathogens. *Advanced Healthcare Materials*. (2018); 7 (13): 1-13.
50. Bachir R. G. and Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*. (2012); 2 (9): 739-742.
51. Lai P. K., Roy J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medical Chemistry*. (2004); 11 (11): 1451-1460.
52. Singh V. K., Mishra A. and Jha B. Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. (2017); 7 (337): 296-307.
53. Zhao X., Yu Z. and Ding T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*. (2020); 8 (425): 1-21.
54. Bhardwaj A. K., Vinothkumar K and Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents On Anti-Infective Drug Discovery*. (2013); 8 (1): 68-83.
55. Rawson T. M., Ahmad R., Toumazou C., Georgiou P. & Holmes A. H. Artificial intelligence can improve decision-making in infection management. *Nature Human Behaviour*. (2019); 3: 543-545.
56. Deshpande D., Pasipanodya J. G., Mpagama S. G., Bendet P., Srivastava S., Koeuth T., *et al.* Levofloxacin Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Dosing, Susceptibility Breakpoints, and Artificial Intelligence in the Treatment of Multidrug-resistant Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. (2018); 67 (Suppl3): S293-S302.
57. Skariyachan S., Rao A. G., Patil M. R., Saikia B., Bharadwaj KN V. and Rao GS J. Antimicrobial potential of metabolites extracted from bacterial symbionts associated with marine sponges in coastal area of Gulf of Mannar Biosphere, India. *Letters in Applied Microbiology*. (2013); 58: 231-241.

58. Pandey A., Kumar S. Antibiotic Activity of Antimicrobial Metabolites Produced From Soil Microorganisms: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. (2015); 4 (4): 28-32.
59. Saud B., Pandey P., Paudel G., Dhungana G. and Shrestha V. In-Vitro Antibacterial Activity of Probiotic Against Human multidrug Resistant Pathogens. *Archives of Veterinary Science and Medicine*. (2020); 3 (1): 31-39.
60. Indira M., Venkateswarulu T. C., Peele K. A., Bobby Md. N. and Krupanidhi S. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech*. (2019): 306.
61. Stanojevic-Nikolic S., Dimic G., Mojovic L., Pejin J., Djukic-Vukovic A. and Kocic-Tanackov S. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*. (2015); 40 (5): 1-10.
62. Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R. J., *et al*. The extracellular biology lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*. (2010); 34 (2): 199-230.
63. Reis J. A., Paula A. T., Casarotti S. N. & Penna A. L. B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*. (2012); 4: 124-140.
64. Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Lebos Pavunc A., Habjanic K. and Matosic S. Antimicrobial Activity-The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. (2010); 4 (3): 296-307.
65. Sauer M., Russmayer H., Grabherr R., Peterbauer C. K and Marx H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology*. (2017); 35 (8): 756-769.
66. Beshkova D. and Frengova G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*. (2012); 12 (4): 419-432.
67. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*. (2003); 21 (6): 465-499.
68. Nissen-Meyer J. and Nes I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*. (1997); 167 (2-3): 67-77.

69. Jenssen H., Hamill P. and Hancock R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. (2006); 19 (3): 491-511.
70. Zasloff M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature*. (2002); 415 (24): 389-395.
71. Browne K., Chakraborty S., Chen R., Willcox M. D. P., StClair Black D., Walsh W. R, *et al.* A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*. (2020); 21 (19): 1-23.
72. Magana M., Pushpanathan M., Santos A. L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. (2020); 20 (9): 1-15.
73. Boparai J. B. and Sharma P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources Mechanism and Recent Applications. *Protein & Peptide Letters*. (2020); 27 (1): 4-16.
74. Zhang Q. Chapter 4 Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins. In: Chen W. (ed.) *Lactic Acid Bacteria. Bioengineering and Industrial Applications*. (First Edition). Springer Nature Singapore Pte Ltd. Springer, Singapore. 2019. p.61-91.
75. Tagg J. R. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. In: James R., Lazdunski C. and Pattus F. (eds.) *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*. (NATO ASI series. Series H, Cell biology; vol. 65). (First Edition). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1992. p.33-35.
76. Cintas L. M., Casaus M. P., Herranz C., Nes I. F. and Hernández P. E. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. (2001); 7 (4): 281-305.
77. Karpinski T. M. and Szkaradkiewicz A. K. Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*. (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00053-2>
78. Baquero F., Lanza Val F., Baquero M.-R., del Campo R. and Bravo-Vazquez D. A. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Frontiers in Microbiology*. (2019); 10 (2261): 1-25.
79. Hernández-González J C., Martínez-Tapia A., Lazcano-Hernández G., García-Pérez B. E. and Castrejón-Jiménez N. S. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*. (2021); 11 (979): 1-17.

80. Di Cerbo A., Palmieri B., Aponte M. Morales-Medina J. C. and Iannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*. (2016); 69 (3): 187-203. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202976.
81. Edwards C. G., Haag K. M., Collins M. D., Hutson R. A. and Huang Y. C. *Lactobacillus kunkeei* sp. no.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. (1998); 84 (5): 698-702.
82. Endo A., Maeno S., Tanizawa Y., Kneifel W., Arita M., Dicks L. et al. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*. (2018); 84 (19): 1-14.
83. Olmos A., Henríquez-Piskulich P., Sanchez C., Rojas-Herrera M., Moreno-Pino M., Gómez M et al. Draft Genome of Chilean Honeybee (*Apis mellifera*) Gut Strain *Lactobacillus kunkeei* MP2. *Genome Announcements*. (2014); 2 (5): 1-2.
84. Porcellato D., Frantzen C., Rangberg A., Umu O. C., Gabrielsen C., Nez I., et al. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus kunkeei* AR114 Isolated from Honey Bee Gut. *Genome Announcements*. (2015); 3 (2): 1-1.
85. Asenjo F., Olmos A., Henríquez-Piskulich P., Polanco V., Aldea P., Ugalde J., et al. Genome sequencing and analysis of the first complete genome of *Lactobacillus kunkeei* strain MP2, an *Apis mellifera* gut isolate. *Peer J*. (2016); 4 e1950: 1-21.
86. Endo A., Irisawa T., Futagawa-Endo Y., Takano K., du Toit M., Okada S., et al. Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as fructophilic lactic acid bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (2012); 62 (3): 500-504.
87. Arredondo D., Castelli L., Porrini M. P., Garrido P. M., Eguaras M. J., Zunino P., et al. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*. (2017); 9 (2): 279-290.
88. Asama T., Arima T.-H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y., et al. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*. (2015); 119 (3): 818-826.
89. Berríos P., Fuentes J. A., Salas D., Carreño A., Aldea P., Fernández F., et al. Inhibitory effect of biofilm-forming *Lactobacillus kunkeei* strains against virulent *Pseudomonas aeruginosa* in vitro

- and in honeycomb moth (*Galleria mellonella*) infection model. *Beneficial Microbes*. (2017); 9 (2): 257-268.
90. Zendo T., Ohashi C., Maeno S., Piao X., Salminen S., Sonomoto K., *et al.* Kunkecin A, a New Nisin Variant Bacteriocin Produced by the Fructophilic Lactic Acid Bacterium, *Apilactobacillus kunkeei* FF30-6 Isolated From Honey Bees. *Frontiers in Microbiology*. (2020); 11 (571903): 1-9.
91. Heatley N. G. A Method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*. (1944); 38 (1): 61-65.
92. Holder I. A. and Boyce S. T. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*. (1994); 20 (5): 426-429.
93. Er Y., Sivri N. and Mirik M. Antimicrobial Activity of Essential Oil Against *Rhizobium* (Agrobacterium) vitis Using Agar Well and Disc Diffusion Methods. *Bacteriology Journal*. (2018); 8 : 1-11.
94. Valgas C., Machado de Souza S., Smania E. F. A. and Smania A., Jr. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2007); 38 (2): 369-380.
95. Moran J. C., Crank. E. L., Ghabban H. A. and Horsburgh M. J. Deferred Growth Inhibition Assay to Quantify the Effect of Bacteria-derived Antimicrobials on Competition. *Journal of Visualized Experiments*. (2016); (115), 54437: 1-5.
96. Hockett K. L and Baltrus D. A. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *Journal of Visualized Experiments*. (2017); (119), 55064: 1-5.
97. Maricic N. and Dawid S. Using the Overlay Assay to Qualitatively Measure Bacterial Production of and Sensitivity to Pneumococcal Bacteriocins. *Journal of Visualized Experiments*. (2014); (91), 51876: 1-4.
98. Fijan S. Chapter 10: Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. In: Rao V. and Rao L. G (eds.) *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. INTECH; (2016). p.191-221. <http://dx.doi.org/10.5772/63141>.
99. Tharmaraj N. and Shah N. P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. *International Food Research*. (2009); 16: 261-276.

100. Yang E., Fan L., Yan J., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S., *et al.* Influence of culture media, pH and temperatura on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*. (2018); 8 (10): 1-14.
101. Tecan. *Automated solution for monitoring of Staphylococcus aureus, Optimizing bacterial growth studies on the Infinite® 200 PRO multimode reader plataform using permanent shaking and heating, 2012.* Available from: https://ww3.tecan.com/platform/apps/datainterface/downloadctrl.asp?odl=1&file=%2Fmandant%2Ffiles%2Fdoc%2F148%2FAN_Infinite200PRO_Bacterial+growth_31012012%2Epdf&title=Automated+solution+for+monitoring+growth+of+Staphylococcus+aureus&submissionGuid=c3163b0d-bc90-499d-8ffe-c596ef3fda11. [Accessed 5th April 2019].
102. Lin T.-H. and Pan T.-M. Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. (2019); 52 (3): 409-417.
103. Bader J., Mast-Gerlach E., Popovic M. K., Bajpai R. and Stahl U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. (2010); 109 (2): 371-387.
104. Zacharof M. P. and Lovitt R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. *Procedia APCBEE*. (2012); 2: 50-56.
105. Dicks L. M. T., Heunis T. D. J., Van Staden D. A., Brand A., Sutyak Noll K. and Chikindas M. L. Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: Drider D. and Rebuffat S. (eds.) *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Applied Microbiology. (1). New York, Springer-Verlag; (2011). p.391-421.
106. Parada J. L., Caron, C. R., Medeiros A. B. P. and Soccol C. R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. (2007); 50 (3): 521-542.
107. Ansari A. Bacteriocin from LAB for Medical and Health Applications. In: Liong Min-Tze (ed.) *Benefical Microorganims in Medical and Health Applications*. Microbiology Monographs. 28 (1). Switzerland. Springer International Publishing; 2015. p.199-221.

108. Linley E., Denyer S. P., McDonnell G, Simons C. and Maillard J.-Y. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2012); 67: 1589-1596.
109. McDonnell G. The use of hydrogen peroxide for disinfection and sterilization applications. *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*, by John Wiley & Sons. (2014); 67: 1-34.
110. Chikindas M. L., Weeks R., Drider D., Chistyakov V. A. and Dicks L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. (2018); 49: 23-28.
111. Drider D., Bendali F., Naghmouchi K. and Chikindas M. L. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. (2016); 8: 177-182.
112. Milillo S. R., Story R. S., Pak D., O'Bryan C. A., Crandall P. G. & Ricke S. C. Antimicrobial properties of three lactic acid bacterial cultures and their cell free supernatants against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*. (2012); 48 (1): 63-68.
113. Li D., Ni K., Pang H., Wang Y., Cai Y. and Jin Q. Identification and Antimicrobial Activity Detection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Stover Silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. (2015); 28 (5): 620-631.
114. Awaisheh S. S. and Ibrahim S. A. Screening of Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Against Different Pathogens Found in Vacuum-Packaged Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*. (2009); 6 (9): 1125-1132.
115. Hartmann H. A, Wilke T. and Erdman R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*. (2011); 146 (2): 192-199.
116. Dinev T., Beev G., Tzanova M., Denev S., Dermendzhieva D. and Stoyanova A. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AGAINST PATHOGENIC AND FOOD SPOILAGE MICROORGANISMS: A REVIEW. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. (2017): 1-16.
117. Da Silva Sabo S., Vitolo M., Domínguez González J. M. and Pinheiro de Souza Oliveira R. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*. (2014); 64: 527-536.

118. Todorov S. D. BACTERIOCINS FROM *LACTOBACILLUS PLANTARUM*-PRODUCTION, GENETIC ORGANIZATION AND MODE OF ACTION. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2009); 40: 209-221.
119. Sornplang P. and Piyadeatsoontorn S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*. (2016); 58 (26): 1-11.
120. Filanino P., Di Cagno R., Tlais A. Z. A., Cantatore V. and Gobbetti M. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Critical Reviews in Microbiology*. (2019); 45 (1): 65-81.
121. Duar R. M., Lin X. B., Zheng J., Martino M. E., Grenier T., Pérez-Muñoz M. E., *et al.* Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*. (2017); 41 (1): 27-48.
122. Djukic M., Poehlein A., Straub J., Tan F. J., Leimbach A., Hoppert M., *et al.* High quality draft genome of *Lactobacillus kunkeei* EFB6, isolated from a German European foulbrood outbreak of honeybees. *Standards in Genomic Sciences*. (2015); 10 (16): 1-9.
123. Parichehreh S., Tahmasbi G., Sarafrazi A., Imani S. and Tajabadi N. Isolation and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the gastrointestinal tract of the dwarf honey bee, *Apis florea* Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*. (2018); 49: 430-438.
124. Vásquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R. J., Flaberg E., Szekely L., *et al.* Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLOS ONE*. (2012); 7 (3): 1-9.
125. Rangberg A., Mathiesen G., Amdam G. V. and Diep D. B. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Beneficial Microbes*. (2015); 6 (4): 513-523.
126. Bisson L. F., Walker G., Ramakrishnan V., Luo Y., Fan Q., Wiemer E., *et al.* The Two Faces of *Lactobacillus kunkeei*: Wine Spoilage Agent and Bee Probiotic. *Catalyst: Discovery into Practice*. (2017); 1: 1-11.
127. Sandi N. A. and Salasia S., I., O. Alternative Antibiotics Source from Symbiont of Lactic Acid Bacteria Inside Stomach of Honeybees (*Apis mellifera* and *Apis dorsata*) Against Multiresistant Antibiotics Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Microbiology*. (2016); 11: 93-100.

128. Kacániová M., Kunová S., Ivanisová E., Terentjeva M., Gasper J. Antimicrobial Effect of *Lactobacillus kunkeei* Against Pathogenic Bacteria Isolated from Bees` Gut. *Animal Science and Biotechnologies*. (2019); 52 (2): 100-104.
129. Kacaniová M., Gasper J., Terentjeva M., Kunová S., Kluz M. and Puchalski C. Antibacterial Activity of Bees Gut *Lactobacilli* against *Paenibacillus Larvae In Vitro*. *Advanced Research In Life Sciences*. (2018); 2 (1): 7-10.
130. Iorizzo M., Lombardi S. J., Ganassi S., Testa B., Ianiro M., Letizia F, *et al*. Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. *Antibiotics*. (2020); 9 (262): 1-16.
131. Butler E., Alsterfjord M., Olofsson T. C., Karlsson C., Malmstrom J. and Vásquez A. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiology*. (2013); 13 (235): 1-11.
132. Todorov S. D. and Dicks L. M. T. Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology*. (2005); 43 (2): 165-173.
133. Alebiosu K. M., Adetoye A and Ayeni F. A. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria against *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia vermicola*, *Alcaligenes faecali* and methicillin resistant *S. aureus*. *West African Journal of Pharmacy*. (2017); 28 (2): 132-142.
134. Lin T.-H. and Pan T.-M. Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. (2019); 52 (3): 409-417.
135. Kareem R. A. and Razavi S. H. Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation- A review. *Journal of Food Safety*. (2019); 40 (1): 1-12.
136. Ohenhen R. E., Isibor J. O, Emonfonmwan G. and Enabulele S. A. Effects of PH and Storage Temperatures on Antimicrobial Activity of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From OGI. *Microbiology Research Journal International*. (2015); 9 (3): 1-9.
137. Zhang Y., Liu Y., Bao Y. and Zhang H.-P. Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Antibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China*. (2010); 9 (6): 911-920.

138. Filannino P., Di Cagno R., Addante R., Protonio E., and Gobetti M. Metabolism of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the *Apis mellifera* L. Bee Gut: Phenolic Acids as External Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. (2016); 82 (23): 6899-6911.
139. Norden C. W., Wentzel H. and Keleti E. Comparison of Techniques for Measurement of in Vitro Antibiotic Synergism. *THE JOURNAL OF INFECTIONS DISEASES*. (1979); 140 (4): 629-633.
140. Balouiri M., Sadiki M. and Ibsouda S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. (2016); 6 (2): 71-79.
141. Zhanel G. G., Karlowsky J. A, Hoban D. J. and Davidson R. J. Antimicrobial Activity of Subinhibitory Concentrations of Aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* as Determined by the Killing-Curve Method and the Postantibiotic Effect. *Chemotherapy*. (1991); 37 (2): 114-121.
142. Ueda K. and Beppu T. Antibiotics in microbial coculture. *The Journal of Antibiotics*. (2017); 70: 361-365.
143. Mariam S. H., Zegeyr N., Aseffa A. and Howe R. Diffusible substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in a co-culture model. *BMC Microbiology*. (2017); 17 (35): 1-11.
144. Bader J., Mast-Gerlach E., Popovic M. K., Bajpai R. and Stahl U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. (2010); 109 (2): 371-387.
145. Goers L., Freemont P. and Polizzi K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY Interface*. (2014); 11: 1-13.
146. Murphy K., Park A. J., Hao Y., Brewer D., Lam J. S. and Khursigara C. M. Influence of O Polysaccharides on Biofilm Development and Outer Membrane Vesicle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. (2014); 196 (7): 1306-1317.
147. Hoboth C., Hoffman R., Eichner A., Henke C., Schmildt S., Imhof A, *et al.* Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic

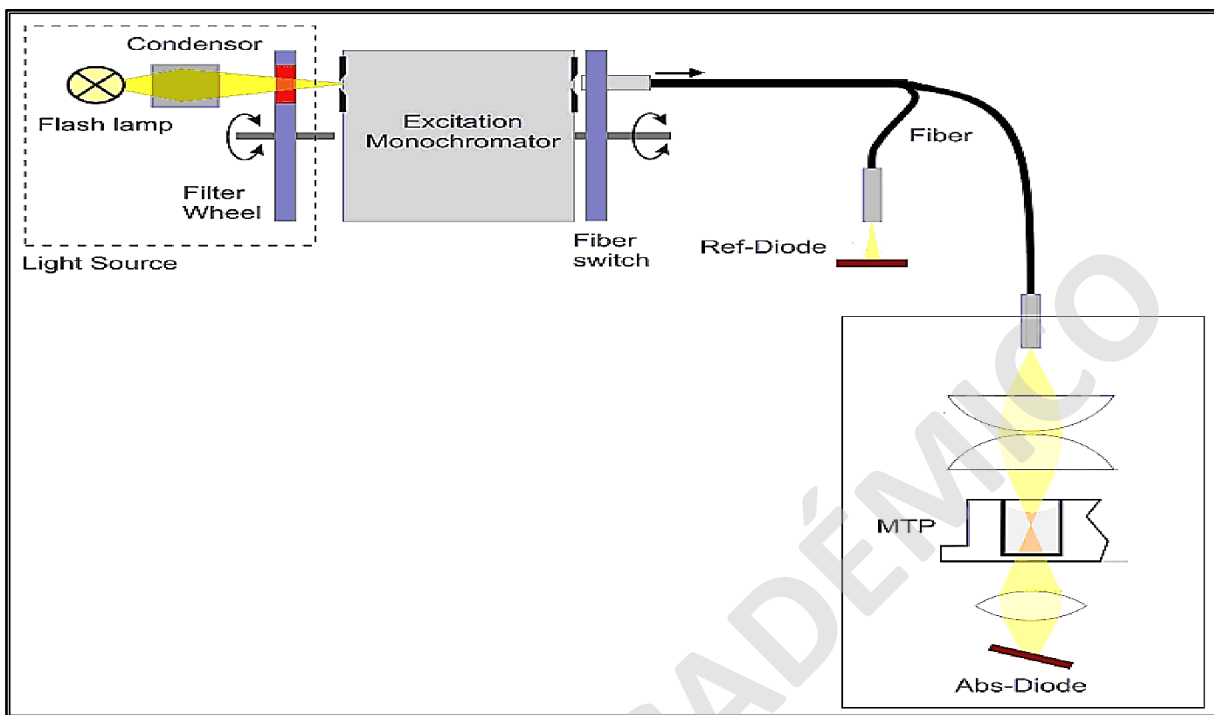
- Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*. (2009); 200 (1): 118-130.
148. Hogardt M. and Heesemann J. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a Chronic Pathogen of the Cystic Fibrosis Lung. In: Dobrindt U., Hacker J. and Svanborg C. (eds). Between Pathogenicity and Commensalism. *Currents Topics in Microbiology and Immunology*. (2011); 358: 91-118.
149. Bragonzi A., Paroni M., Nonis A., Cramer N., Montanari S., Rejman J, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Microevolution during Cystic Fibrosis Lung Infection Establishes Clones With Adapted Virulence. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. (2009); 180 (2): 138-145.
150. Bianconi I., D`Arcangelo S., Esposito A., Benedet M., Piffer E., Dinnella A., *et al.* Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study. *Frontiers in Microbiology*. (2019); 9 (3242): 1-15.
151. Kukavica-Ibrulj I., Bragonzi A., Paroni M., Winstnaley C., Sanschagrin F., O`Toole G. A., *et al.* *In Vivo* Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14 and the Hypervirulent Strain LESB58 in a Model of Chronic Lung Infection. *Journal of Bacteriology*. (2008); 190 (8): 2804-2813.
152. Grosso-Becerra M.-V., Santos-Medellín C., González-Valdez A., Méndez J.-L., Delgado G., Morales-Espinosa R., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*. (2014); 15 (318): 1-14.
153. Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J. M., Koehrsen M., *et al.* Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *PNAS*. (2008); 105 (8): 3100-3105.
154. Diaz Iglesias Y. and Van Bambeke F. Activity of Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Model of Biofilms in the Context of Cystic Fibrosis: Influence of the Culture Medium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2020); 64 (4): 1-14.
155. Zhang J., Yang Y., Yang H., Bu Y., Yi H., Zhang L. *et al.* Purification and Partial Characterization of Bacteriocins Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* J23, Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Frontiers in Microbiology*. (2018); 9: 1-7.

156. Bromberg R., Moreno I., Lopes Zaganini C., Delboni R. R. and de Oliveira J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2004); 35 (1-2): 137-144.
157. Banerjee S. P., Dora K. C. and Chowdhury S. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish. *Journal of Food Science and Technology*. (2013); 50 (1): 17-25.
158. Lei S., Zhao R., Sun J., Ran J., Ruan X. and Zhu Y. Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* zrx03 isolated from infant's feces. *Food Science & Nutrition*. (2020); 8 (5): 2214-2222.
159. Elayaraja S., Annamalai N., Mayavu P. and Balasubramanian T. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. (2014); 4 (1): S305-S311.
160. Ghrairi T., Frere J., Berjeaud J. M. and Manai M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*. (2008); 19 (2): 162-169.
161. Zhou F., Zhao H., Bai F., Dziugan P., Liu Y. and Zhang B. Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*, Isolated from Chinese Pickle. *Czech Journal of Food Sciences*. (2014); 32 (5): 430-436.
162. Fen Goh H. and Philip K. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *PLOS ONE*. (2015); 10 (10): 1-17.
163. Wang Y., Qin Y., Xie Q., Zhang Y., Hu J and Li P. Purification and Characterization of Plantaricin LPL-1, a Novel Class IIa Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 Isolated From Fermented Fish. *Frontiers in Microbiology*. (2018); 9 (2276): 1-12.
164. Jiang H., Zou J., Cheng H., Fang J. and Huang G. Purification, Characterization, and Mode of Action of Pentocin JL-1 a Novel Bacteriocin Isolated from *Lactobacillus pentosus*, against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. (2017); 2017 (7657190): 1-11.
165. O`Shea E. F., O`Conor P. M., Cotter P. D., Ross R. P. and Hill C. Synthesis of Trypsin-Resistant Variants of the *Listeria*-Active Bacteriocin Salvaricin P. *Applied and Environmental Microbiology*. (2010); 76 (16): 5356-5362.

166. Yi L., Dang Y., Wu J., Zhang L., Liu X., Liu B., *et al.* Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang China. *Journal of Dairy Science*. (2016); 99 (9): 7002-7015.
167. Barman S., Ghosh R. and Mandal N. C. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*. (2018); 16 (3): 286-296.
168. Ouzari H., Najjari A., Amairi H., Gtari M., Hassen A. and Boudabous A. Comparative analysis of *Lactococcus lactis* bacteriocins and preliminary characterization of a new proteinase K resistant lactococcin member. *Annals of Microbiology*. (2008); 58 (3): 83-88.
169. Oh S., Kim S. H. and Worobo R. W. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*. (2000); 83 (12): 2747-2752.
170. Mantovani H. C., Hu H., Woroboro R. W. and Russell J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiology*. (2002); 148 (11): 3347-3352.
171. Heredia-Castro P. Y., Méndez-Romero José I., Hernández-Mendoza A., Acedo-Félix E., González-Córdova F. and Vallejo-Cordoba B. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*. (2015); 98 (12): 8285-8293.
172. Olasupo N. A. Bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* strains from fermented food. *Folia Microbiologica*. (1996); 41 (2): 130-136.
173. Sloss J. M., Cumberland N. and Milner S. M. Acetic acid used for the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* from burn and soft tissue wounds. *BMJ Military Health*. (1993); 139 (49): 49-51.
174. Nagoba B. S., Selkar S. P., Wadher B. J. and Gandhi R. C. Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections-A review. *Journal of Infection and Public Health*. (2013); 6: 410-415.
175. Valdéz J. C., Peral M. C., Rachid M., Santana M and Perdigón G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clinical Microbiology and Infection*. (2005); 11 (6): 472-479.

176. Ramos A. N., Sesto Cabral M. E., Nosedá D., Bosch A., Yantorno O. M. and Valdéz J. C. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. (2012); 20 (4): 1-11.
177. Maldonado A., Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J. L. Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. *Journal of Bacteriology*. (2004); 186 (5): 1556-1564.
178. Maldonado A., Ruiz-Barba J. L. and Jiménez-Díaz R. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*. (2003); 69 (1): 383-389.
179. Sturme M. H. J., Francke C., Siezen R. J., de Vos W. M. and Kleerebezem M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*. (2007); 153 (12): 3939-3947.
180. Tecan. *Instructions for Use for Infinite 200 PRO, 2016*. Available from: <http://biomimetic-lab.vscht.cz/wp-content/uploads/2017/04/Infinite-200-PRO.pdf>. [Accessed 5th April 2019].
181. Tecan. *Automated solution for monitoring of Staphylococcus aureus, Optimizing bacterial growth studies on the Infinite® 200 PRO multimode reader platform using permanent shaking and heating, 2012*. Available from: https://ww3.tecan.com/platform/apps/datainterface/downloadctrl.asp?odl=1&file=%2Fmandant%2Ffiles%2Fdoc%2F148%2FAN_Infinite200PRO_Bacterial+growth_31012012%2Epdf&title=Automated+solution+for+monitoring+growth+of+Staphylococcus+aureus&submissionGuid=c3163b0d-bc90-499d-8ffe-c596ef3fda11. [Accessed 5th April 2019].

9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO



Anexo 1: Sistema Optico de Absorbancia del equipo Infinite M200 PRO. Referencia: Tecan, 2016 (180).

Bacterial growth protocol	
Plate	see table 1
Temperature	37 °C
Wait for Temperature	36.5 - 37.5 °C
Kinetic cycle (duration)	14 hrs
Kinetic interval	30 min
Shaking (10 sec)	Orbital; variation of amplitudes: 1, 3, 6 mm
Absorbance	600 nm, 25 flashes, 100 ms settle time
Incubation	Shaking (800 sec): orbital, variation of amplitudes : 1, 3, 6 mm Shaking (800 sec): orbital, variation of amplitudes : 1, 3, 6 mm Remaining wait (timer)

Anexo 2: Protocolo de Curva de Crecimiento para *S. aureus*, elaborado por Tecan. Parametros de referencia en la cinética de crecimiento para el monitoreo automatico en *P. aeruginosa*, mediante i-control v1.12 2016 ©de Infinite M200 PRO por Tecan. Referencia: Tecan, 2012 (181).

Curva de crecimiento bacterias - Tecan i-control

File Edit View Instrument Settings Help

Send Feedback | i-control™ on the Web

Lab Ware

- Plate
- Part of Plate
- Well

Measurements

- Absorbance
- Absorbance Scan

Actions

- Temperature
- Shaking
- Move Plate

Kinetic

- Kinetic Cycle
- Kinetic Condition

Miscellaneous

- Comment
- User Request
- Wait for Temperature
- Wait (Timer)
- Incubation

Plate

Plate definition: [GRE96H] - Greiner 96 Flat Transparent

Plate with cover

Microplaca con cobertura: Greiner de 96 pocillos transparente.

Part of Plate

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A B C D E F G H

Ajustes del ensayo, pocillos a medir.

Temperature

Parameter

On: Temperature: 37,0 °C

Off

Temperatura: 37°C.

Wait for Temperature

Parameter

Minimum: 36,5 °C Maximum: 37,5 °C

Rango de temperatura: 36,5°C min. // 37,5°C max.

Kinetic Cycle

Cycles

Number of cycles

Duration: 23:59:59 (h:m:ss)

Kinetic Interval

Use kinetic interval:

Time: 00:30:00 (h:m:ss)

Time: 1800000 ms

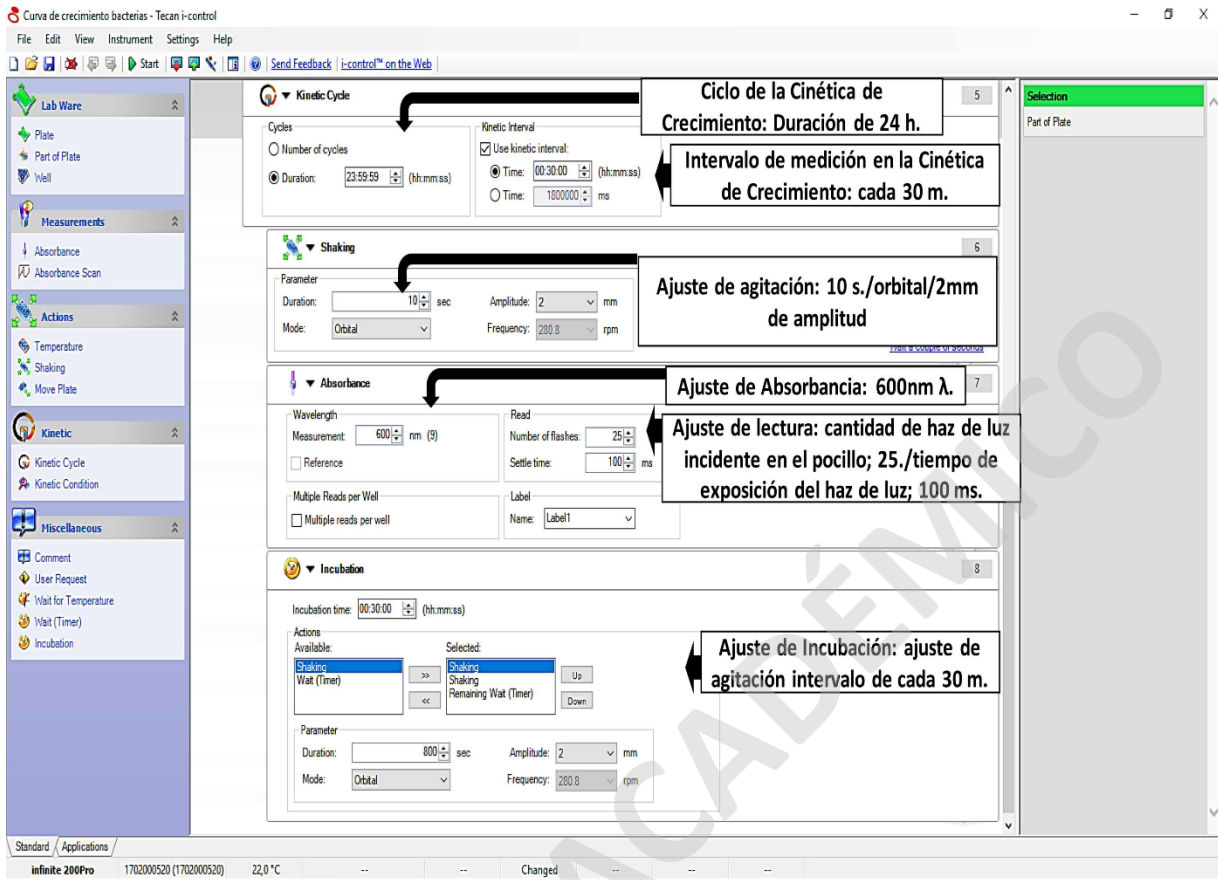
Ciclo de la Cinética de Crecimiento: Duración de 24 h.

Intervalo de medición en la Cinética de Crecimiento: cada 30 min.

Standard / Applications

Infinite 200Pro 1702000520 (1702000520) 22,1 °C

Anexo 3: Ajustes del Ensayo de Inhibición en Curva de Crecimiento para *Pseudomonas aeruginosa* (Parte 1). Ajuste y programación de la cinética de crecimiento mediante i-control v1.12 2016 © 2016, Tecan Austria GmbH del equipo Infinite M200 PRO.



Anexo 4: Continuación de los Ajustes del Ensayo de Inhibición en Curva de Crecimiento para *Pseudomonas aeruginosa* (Parte 2). Ajuste y programación de la cinética de crecimiento mediante i-control v1.12 © 2016, Tecan Austria GmbH del equipo Infinite M200 PRO.



i-control 1.12

Disclaimer

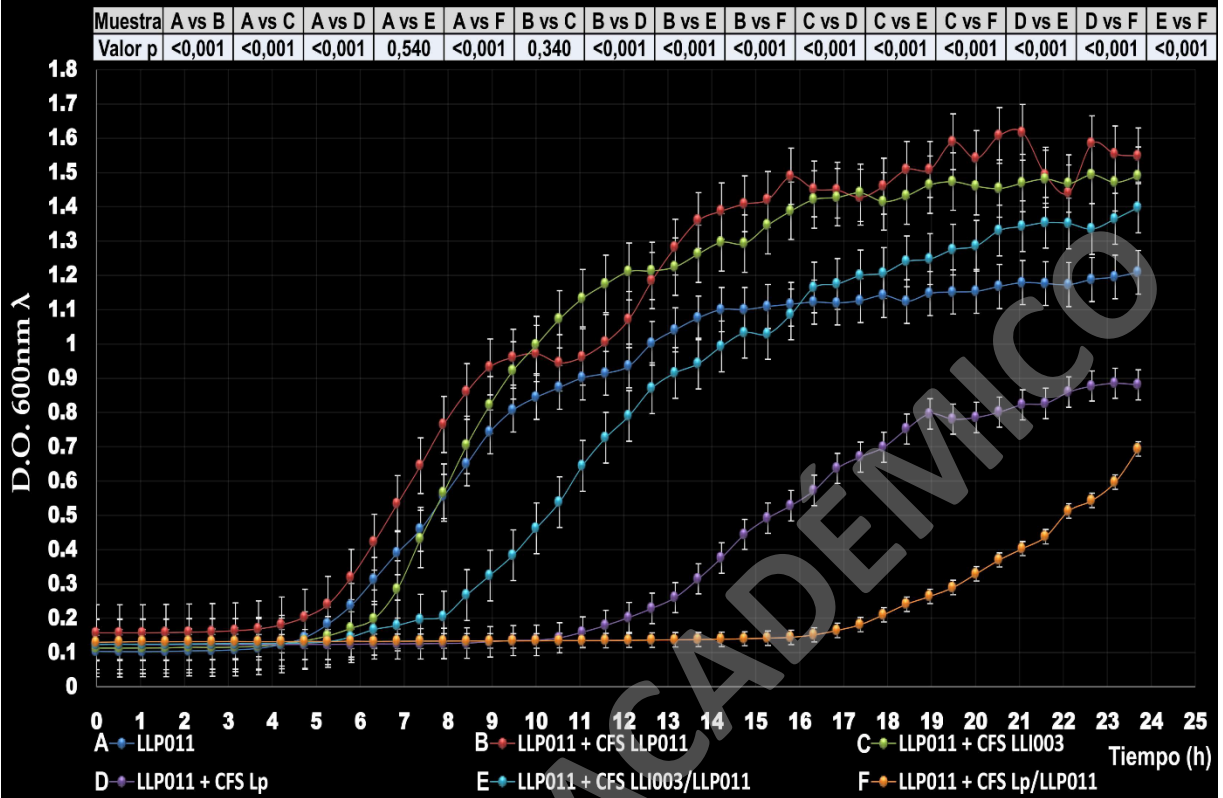
(c) 2016, Tecan Austria GmbH, all rights reserved.

The software, the designs and views are protected by copyright law.
Certain names and logos are either registered trademarks or
trademarks of the Tecan Group Ltd., Switzerland.

Anexo 5: Software i-control 1.12 © 2016, Tecan Austria GmbH.

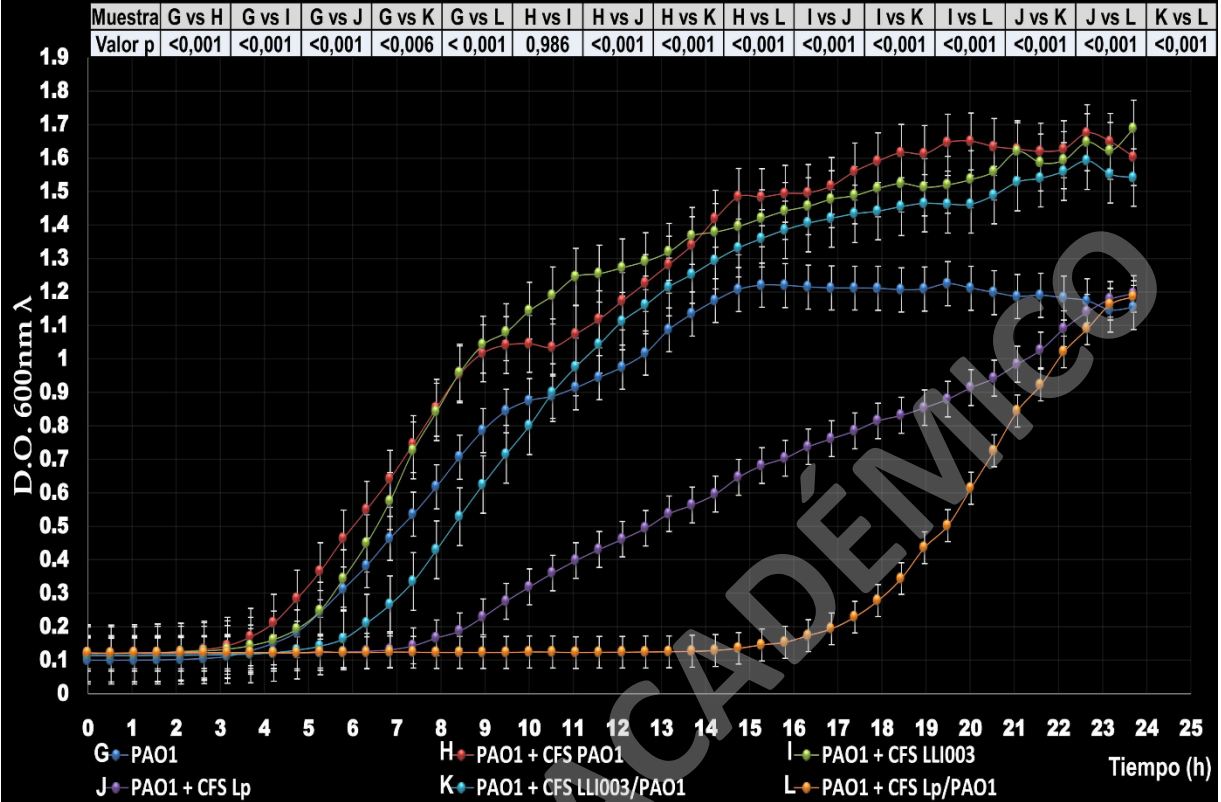
SOLO USO ACADÉMICO

Efecto en crecimiento bacteriano en *P. aeruginosa* LLP011 frente a CFS de mono y cocultivo después de 24 h a 37°C.



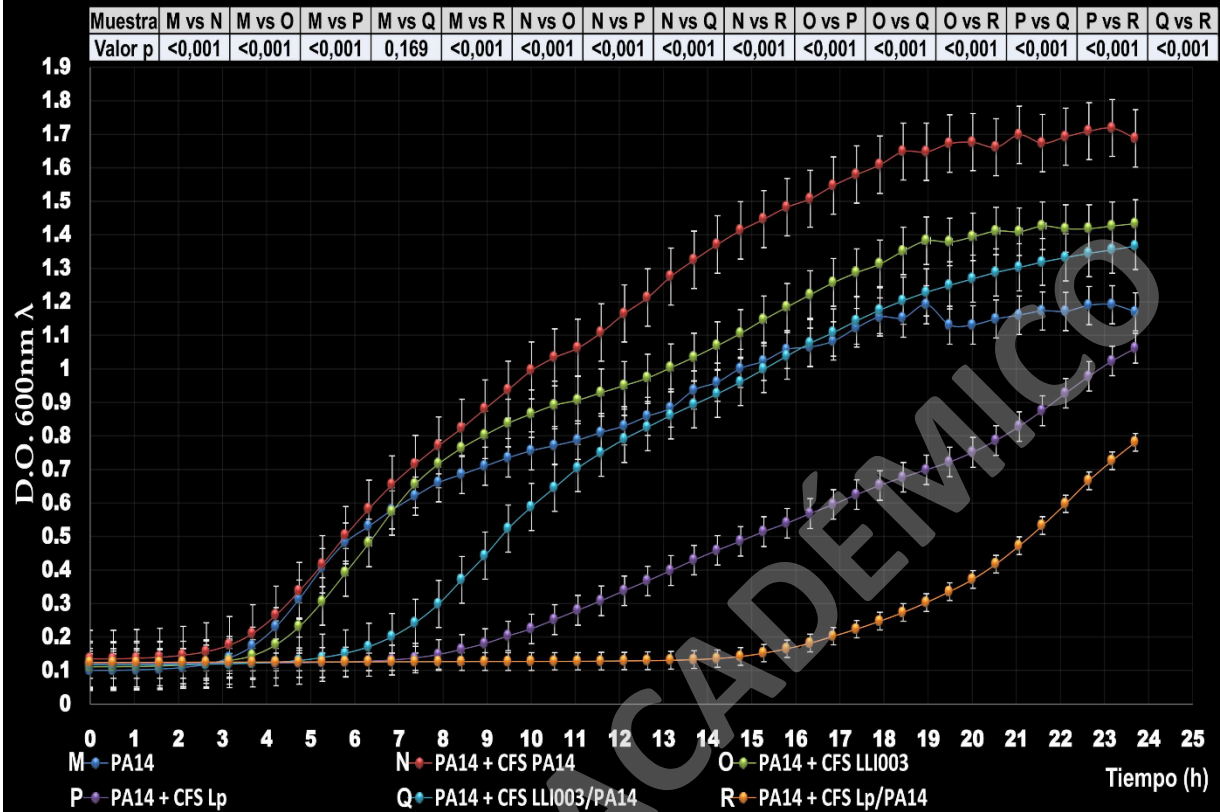
Anexo 6: Efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* LLP011 bajo tratamiento de CFS de mono y cocultivo, durante 24 h a 37°C. (CFS LLP011), sobrenadante libre de células de *P. aeruginosa* LLP011. (CFS LLI003), sobrenadante libre de células de *L. kunkeei* LLI003. (CFS Lp), sobrenadante libre de células de *L. plantarum*. (CFS LLI003/LLP011), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. kunkeei* LLI003 y *P. aeruginosa* LLP011. (CFS Lp/LLP011), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. plantarum* y *P. aeruginosa* LLP011. (LLP011), Cultivo bacteriano de *P. aeruginosa* LLP011. Se muestra promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.

Efecto en crecimiento bacteriano en *P. aeruginosa* PAO1 frente a CFS de mono y cocultivo después de 24 h a 37°C.



Anexo 7: Efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bajo tratamiento de CFS de mono y cocultivo, durante 24 h a 37°C. (CFS PAO1), sobrenadante libre de células de *P. aeruginosa* PAO1. (CFS LLI003), sobrenadante libre de células de *L. kunkeei* LLI003. (CFS Lp), sobrenadante libre de células de *L. plantarum*. (CFS LLI003/PAO1), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. kunkeei* LLI003 y *P. aeruginosa* PAO1. (CFS Lp/PAO1), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. plantarum* y *P. aeruginosa* PAO1. (PAO1), Cultivo bacteriano de *P. aeruginosa* PAO1. Se muestra promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.

Efecto en crecimiento bacteriano en *P. aeruginosa* PA14 frente a CFS de mono y cocultivo después de 24 h a 37°C.



Anexo 8: Efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 bajo tratamiento de CFS de mono y cocultivo, durante 24 h a 37°C. (CFS PA14), sobrenadante libre de células de *P. aeruginosa* PA14. (CFS LLI003), sobrenadante libre de células de *L. kunkeei* LLI003. (CFS Lp), sobrenadante libre de células de *L. plantarum*. (CFS LLI003/PA14), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. kunkeei* LLI003 y *P. aeruginosa* PA14. (CFS Lp/PA14), sobrenadante libre de células de cocultivo entre *L. plantarum* y *P. aeruginosa* PA14. (PA14), Cultivo bacteriano de *P. aeruginosa* PA14. Se muestra promedio de tres ensayos independientes, realizados en triplicado.



Anexo 9: Ensayo de inhibición en placa agar sobre *P. aeruginosa* LLP011. Halos de inhibición por WBC de *L. kunkeei* LLI003, el CFS de *L. kunkeei* LLI003 no presentó inhibición.