

20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Sobrenadantes de bacterias lácticas con potencial capacidad anti-patógena e inhibidora del *Quorum-Sensing* de *Pseudomonas aeruginosa*

Díaz, Myriam Anabel; González, Silvia Nelina, Arena, Mario;

anabel.tucuman@gmail.com; sgonzalez@fbqf.unt.edu.ar; arename@fbqf.unt.edu.ar;

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia - INBIOFAL

Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

Entre las bacterias patógenas oportunistas, se sabe que *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno humano que presenta notable capacidad para formar biofilm, lo que le otorga resistencia al tratamiento con antibióticos. La expresión de biofilm y factores de virulencia en *P. aeruginosa* están regulados por un mecanismo de señalización dependiente de la densidad celular conocido como *Quorum Sensing* (QS). Se ha planteado la búsqueda de compuestos con potencial inhibición de QS como alternativa al uso de antibióticos para combatir la patogenicidad de estas bacterias.

En este trabajo se plantea investigar si los compuestos de mediana polaridad extraídos con cloroformo a partir de sobrenadantes de 24 horas de cultivos de *Lactobacillus casei* CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* CRL 730 podrían interferir con la formación de biofilm de cepas de *P. aeruginosa*. Para eso evaluamos el efecto de 500 y 100 µg/mL de los extractos clorofórmicos de sobrenadantes de bacterias lácticas sobre el crecimiento, formación y disrupción de biofilm de *P. aeruginosa* y su capacidad de inhibir el QS utilizando la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* CV026.

Los extractos de sobrenadante de *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730 tienen propiedades inhibitorias del crecimiento y disrupción de biofilm sobre las tres cepas de *Pseudomonas* ensayadas. Tanto en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 y contaminante de agua, los extractos impidieron que se forme biofilm por inhibición del QS bacteriano.

Estos extractos podrían tener componentes con potencial inhibición del QS de *Pseudomonas aeruginosa* lo que amerita un análisis químico más profundo de los mismos para determinar su potencial uso en alimentos y salud.

Palabras clave: Biofilm, Bacterias lácticas, *Pseudomonas*, *Quorum Sensing*

Introducción

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos adheridos a superficies o asociados a interfaces por medio de una matriz polimérica extracelular constituida principalmente por carbohidratos, proteínas y ADN extracelular (Davey y O'Toole, 2000; Fernández Ramírez et al., 2015). Los Biofilms se han considerado muy importantes para la salud pública debido a su participación en varias enfermedades infecciosas. De hecho, el 60% de todas las infecciones nosocomiales se pueden atribuir a los mismos (Ali Ahmed y Taha, 2011; Davey et al., 2000; Donlan, 2002).

Se reconoce que el uso indebido de antibióticos crea una presión selectiva que da lugar al desarrollo generalizado de cepas bacterianas resistentes. También se sabe que los antibióticos matan a las bacterias saprófitas beneficiosas, que pueden tener un papel protector contra las bacterias patógenas. Además es importante considerar que se ha encontrado que los antibióticos son menos efectivos en las bacterias que producen biofilm. Por esa razón y frente a estas limitaciones de los antibióticos, existe una necesidad creciente para el descubrimiento y el desarrollo de agentes antimicrobianos que presenten propiedades nuevas o inexploradas para controlar y gestionar eficazmente las enfermedades infecciosas bacterianas. Entre las bacterias patógenas

oportunistas, se sabe que *P. aeruginosa* es un patógeno humano que produce varios factores de virulencia y es responsable de diversas infecciones, particularmente en personas inmunocomprometidas. Además de esto, presenta notable capacidad para formar biofilm en muchos entornos lo que hace que los tratamientos con antibióticos sean ineficaces y, por lo tanto, promueve las enfermedades infecciosas crónicas.

Se ha demostrado que la expresión de biofilm y factores de virulencia en *P. aeruginosa* están regulados por un mecanismo de señalización dependiente de la densidad celular conocido como *Quorum Sensing* (Smith y Iglewski, 2003). Este sistema tiene dos componentes, *lhl*, y utiliza dos autoinductores, N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona y N-butil-L-homoserina lactona, respectivamente (Fuqua et al., 2001).

Hentzer et al. (2002) y Wu et al. (2004) demostraron que el sistema QS podría usarse como un objetivo eficaz de medicamentos antimicrobianos al alterar la tolerancia del Biofilm de *P. aeruginosa* al tratamiento con antibióticos y promover una eliminación más rápida utilizando el inhibidor QS modificado químicamente (QSI) furanona C-30.

Entre las terapias alternativas el uso de probióticos se ha incrementado como una alternativa que impide el uso de antibióticos y, por tanto, reduce la

aparición y la propagación de bacterias resistentes a antibióticos y antibióticos residuales en los productos lácteos, carne y leche (Abu-Tarboush et al., 1996).

Adicionalmente se conoce que las bacterias lácticas pueden producir sustancias o modificar metabolitos de los medios de cultivo que interfieran con la virulencia y/o comunicación química de bacterias patógenas (Ramos et al., 2015) y se comprobó que un extracto de diclorometano del sobrenadante de *L. planturum*, interfiere con el *Quorum sensing* e impide el funcionamiento normal del mismo en *P. aeruginosa*. Este proceso, llamado *Quorum quenching* es esencial en la actividad antipatogénica ejercida sobre *P. aeruginosa*, inhibiendo la adhesión in vitro, biofilm y factores de virulencia como elastasa, pirocianina y ramnolípidos (Ramos et al., 2010a, 2012; Valdez et al., 2005).

Lactobacillus casei CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730, ambas cepas de origen humano han sido seleccionadas por sus propiedades probióticas ampliamente documentadas (Gonzalez et al. 1990).

En este trabajo se plantea investigar si compuestos de mediana polaridad presentes en los sobrenadantes de bacterias lácticas de flora intestinal humana podrían interferir con el crecimiento bacteriano, formación,

disrupción de biofilm y las señales de QS de *P. aeruginosa*.

Objetivos

Ensayar los extractos clorofórmicos de sobrenadantes de Bacterias lácticas en:

1. El crecimiento y viabilidad de bacterias patógenas y contaminantes de alimentos en diferentes estados fenotípicos: planctónico y Biofilm.
2. La inhibición de la formación de Biofilm por bacterias patógenas y contaminantes de alimentos (BPCA).
3. La capacidad de disrupción del Biofilm previamente formado por BPCA.
4. El sistema químico de comunicación microbiano, detectando moléculas que actúan como autoinductores bacterianos de virulencia usando como bioindicador la bacteria *Chromobacterium violaceum* Cv026

Materiales y Métodos

Ensayos microbiológicos

Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Las cepas probióticas utilizadas fueron: *Lactobacillus casei* CRL 431, *Lactobacillus acidophilus* CRL 730 ambas de origen humano (aisladas de heces de niños sanos) cultivadas en caldo LAPTg y en condiciones de microaerofilia a 37°C.

Las cepas patógenas empleadas fueron: *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA14,

Pseudomonas aeruginosa aislada de agua contaminada, cultivadas en Caldo LB a 37°C.

Como Bioindicador de la presencia de AHL se empleó *Chromobacterium violaceum* CV026, cultivada en Caldo LB Tripteína a 28°C.

Preparación de extractos de sobrenadantes de cultivos de Bacterias Lácticas

Se prepararon 5 litros de sobrenadante de *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730. Para ello ambas bacterias se hicieron crecer durante 24 horas en caldo LAPTG. Los sobrenadantes se separaron en ambos casos a las 24 horas ya que en ese tiempo está asegurada la fase estacionaria para ambos cultivos donde se supone que ya han producido todos los compuestos responsables de la actividad antipatogénica. Los sobrenadantes se separaron mediante centrifugación por 15 minutos a 8000 rpm y posterior filtrado con filtros.

Extractos de los sobrenadantes:

Se colocó en una ampolla de decantación, 500 ml del sobrenadante de *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730 y se realizaron 3 extracciones sucesivas con cloroformo. En cada extracción se dejaron separar las fases y en caso de que se formara una emulsión, se facilitó la separación de fases mediante el agregado de NaCl. Se transfirió la fase orgánica a

un balón y se redujo la misma en baño de 40°C en un rotavapor hasta sequedad.

Preparación de las muestras

Se pesaron, en balanza analítica, 4 y 20 mg de los extractos de sobrenadantes obtenidos y se disolvieron en 1 mL de DMSO.

El autoinductor N - hexanoil homoserina lactona (HHL) de Sigma - Aldrich (Argentina) se disolvió en etanol absoluto.

Bioensayo de actividad antibacteriana

Se procedió a determinar la inhibición en el crecimiento bacteriano a las 24 horas. Se realizaron cultivos overnight de las cepas (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Y *Pseudomonas aeruginosa* contaminante de agua) en caldo LB. A partir de estos cultivos se realizó una dilución 1/100 (v/v) en medio fresco y se inocularon 195 µl de los mismos (DO de 0,05 UFC/ml) en los pocillos de una microplaca de poliestireno. A continuación, se sembraron 5 µl de cada una de las soluciones de extractos preparadas anteriormente, de tal forma de alcanzar concentraciones finales de 100 y 500 µg/ml.

Como control positivo de crecimiento bacteriano se utilizó el medio de cultivo fresco sembrado con la cepa en estudio adicionado con 5 µl de la mezcla de DMSO, en el cual la concentración final de DMSO fue de 2.5% y no inhibió el crecimiento ni la formación del biofilm

bacteriano. Como control negativo se usó un antibiótico perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas con efecto bactericida, Ciprofloxacina.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado a 560 nm en microplacas de poliestireno, usando un lector espectrofotométrico de microplacas (*Power Wave XS2. Biotek, Vermont, USA*). El incremento de la absorbancia que se observó fue indicativo del crecimiento bacteriano.

Cada una de las concentraciones de extractos se ensayó en seis repeticiones y el bioensayo se realizó por duplicado.

Efectos sobre el biofilm

Determinación de la inhibición de la formación de biofilm

Para la cuantificación de biofilm se utilizó un método colorimétrico de revelado de microplaca basado en un protocolo descrito previamente (O'Toole et al., 1998). Se cuantifico el biofilm a 24 horas empleando una solución de cristal violeta (0,1%), según modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (D'Almeida y col. 2017).

Luego de 24 h se descarta el sobrenadante y a los pocillos se agrega 200 µl de cristal violeta, se incuba 30 minutos. El biofilm adherido al poliestireno es teñido, luego se lava para descartar exceso de colorante. Teniendo en cuenta la mayor solubilidad del cristal violeta en etanol que su afinidad por el biofilm, se

agregan 200 µl de etanol absoluto con agitación suave a 37°C durante 30 minutos. Se mide la absorbancia a 595 nm. Como control negativo se utilizó un antibiótico conocido por sus propiedades anti-biofilm, Ciprofloxacina, a una concentración de 5 µg/mL. Y como control positivo el cultivo adicionado con 2,5% de DMSO.

Ensayo de Disrupción de Biofilm

Se procedió a determinar la disrupción del biofilm a 24 horas. Para la cuantificación del mismo se utilizó un método colorimétrico de revelado de microplaca basado en un protocolo descrito previamente (O'Toole et al., 1998). A partir de cultivos overnight de *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PA14 Y *P. aeruginosa* contaminante de agua en caldo LB se realizó una dilución 1/100 (v/v) en medio fresco y se inocularon 195 µl del mismo (DO de 0,05 UFC/ml) en los pocillos de una microplaca de poliestireno.

Se incubó respectivamente durante 24 horas en cámara húmeda a 37°C para permitir la formación del biofilm. Posteriormente se sembraron 5 µl de cada una de las soluciones de extractos de sobrenadante de bacterias lácticas preparadas anteriormente, de tal forma de alcanzar concentraciones finales de 100 y 500 µg/ml y se incubó 24 horas más a 37°C.

Luego, de este período de tiempo, se tiñó empleando una solución de cristal violeta

(0,1%). Para ello, se agregaron 200 μ l de dicha solución en cada uno de los pocillos de la microplaca de poliestireno y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, en condiciones estáticas. A continuación, se disolvió el biofilm adherido al material plástico con 200 μ l de etanol absoluto, durante 15 minutos, a 37°C con agitación suave. Finalmente, se procedió a leer la absorbancia a 595 nm usando el lector *espectrofotométrico Power Wave XS2. (Biotek, Vermont, USA)*. La DO a esta longitud de onda es directamente proporcional a la biomasa de biofilm formada. Como control positivo se empleó DMSO al 2,5%. Como control negativo se utilizó un antibiótico conocido por sus propiedades anti-biofilm, Ciprofloxacina, a una concentración de 5 μ g/ml

Producción de Violaceína

La detección de la inhibición de QS por los extractos se lleva a cabo mediante el ensayo biosensor utilizando la cepa reportera *C. violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997)

La cepa de *C. violaceum* CV026 es una mutante que no produce autoinductor de virulencia bacteriana (AI), pero responde a presencia de AI, formando el pigmento violaceína.

El ensayo indirecto que se realiza, consiste en agregar el autoinductor de QS en Bacteria Gram negativas: N-hexanoil homoserina lactona (HHL, *Sigma-*

Aldrich), el cual se disuelve en etanol absoluto.

Si los extractos poseen un compuesto que compite por el sitio activo con el AI agregado; entonces, disminuye o se inhibe la producción de violaceína, indicando su potencialidad como anti-QS.

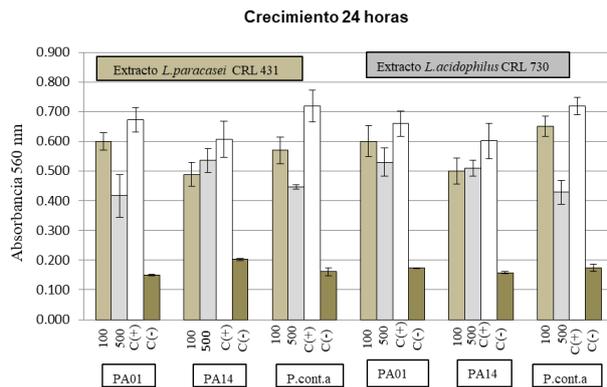
Sobre las placas se coloca agar nutritivo al 2% y se deja solidificar de manera que forme la base del pocillo. A continuación, se coloca LB Tripteína agar 0,75% inoculado con *C. violaceum* CV026, suplementado con 50 μ g/mL de HHL (0,1 mg/mL). Una vez solidificado el medio, se realizan los pocillos empleando un sacabocado de 6 mm de diámetro.

Luego, se pesan en balanza analítica, 100 mg de los extractos y se disuelven en 1 mL de DMSO (100 mg/mL). Los pocillos se siembran con 10, 20 y 50 μ L de la misma, para obtener una dosis de 1, 2 y 5 mg de los extractos y se incuban a 28°C.

A las 24 h de incubación se miden los halos de inhibición. Si no se observa desarrollo alrededor del disco, el efecto es antimicrobiano. Mientras que, la inhibición de QS se detecta por la presencia de una zona de células incoloras pero viables, alrededor del disco. El tamaño de los halos de inhibición en ambos casos es indicativo de las actividades evaluadas.

Resultados y Discusión

Inhibición del Crecimiento y Biofilm



Los extractos de sobrenadante de cultivo presentaron los siguientes porcentajes de inhibición con respecto al Control positivo:

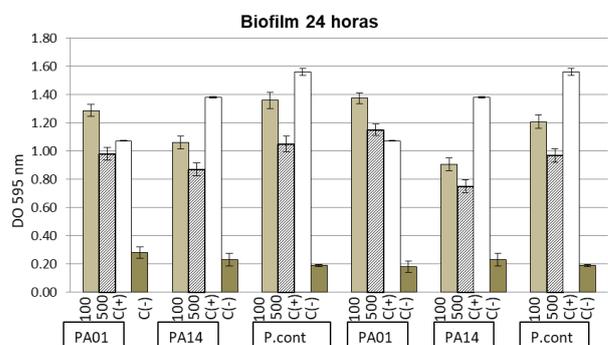
-El extracto clorofórmico del sobrenadante de *L. casei* CRL 431 presentó una capacidad inhibitoria del crecimiento a 24 horas de *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* contaminante de alimento de un: 13%, 24% y 24% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100 µg/mL y de un: 45%, 14% y 53% cuando se emplea a 500 µg/mL.

Con respecto al extracto del sobrenadante de *L. acidophilus* CRL 730, el mismo presentó una capacidad inhibitoria del crecimiento a 24 horas de *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* contaminante de alimento de un: 11%, 20% y 11% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100 µg/mL y de un: 23%, 19% y 27% cuando se emplea a 500 µg/mL.

-Estos resultados indican un aumento marcado en la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PA01 (de 13% a 45%) y *P. aeruginosa* aislada de agua (24% a 53%) al aumentar la

concentración del extracto de *L. casei*. Mientras que no produjo diferencia significativa dosis dependiente en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PA14

-El extracto de *L. acidophilus* produjo un aumento más leve dosis dependiente en la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* PA01 y contaminante de agua. En el caso de *P. aeruginosa* PA14 no se observó diferencia significativa en el crecimiento dependiente de la concentración de extracto empleada.



Los extractos clorofórmicos de sobrenadante de cultivo presentaron los siguientes porcentajes de inhibición en la Formación de Biofilm con respecto al Control positivo:

El extracto del sobrenadante de *L. casei* CRL 431 presentó una capacidad inhibitoria sobre el Biofilm de *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* contaminante de agua de un: 23% y 13% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100 µg/mL. Cuando se emplea a 500 µg/mL la inhibición fue de 37% y 33%, respectivamente.

El extracto clorofórmico del sobrenadante de *L. acidophilus* CRL 730, presentó una

capacidad inhibitoria en la formación de biofilm de: *P. aeruginosa* Pa14 y *Pseudomonas aeruginosa* contaminante de alimento de un: 34% y 23% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100 µg/mL y de un 46% y 36% cuando se emplea a 500 µg/mL

-Estos resultados indican un aumento en la inhibición de la formación de Biofilm de *P. aeruginosa* PA14 y contaminante de agua al aumentar la concentración de ambos extractos de sobrenadante.

Para el caso de *P. aeruginosa* PA01 no se observó a las 24 hs capacidad inhibitoria en la formación de biofilm con ninguno de los extractos de sobrenadantes a las concentraciones ensayadas.

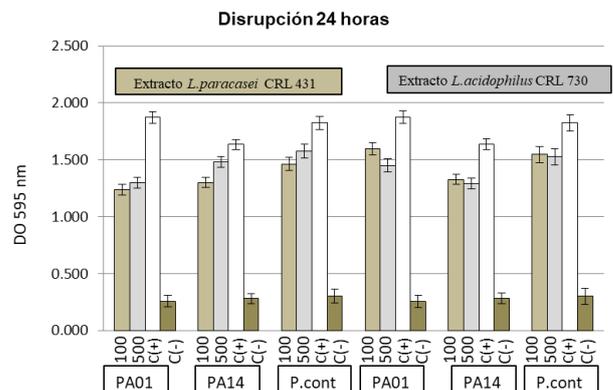
Los estudios realizados sobre el Crecimiento y Biofilm indican que si bien ambos extractos inhiben el crecimiento de *P. aeruginosa* PA01, los mismos no tienen capacidad de inhibir la formación de biofilm.

Por el contrario ambos extractos presentaron capacidad de inhibir tanto el crecimiento como la formación de Biofilm en las cepas de *P. aeruginosa* PA14 y contaminante de agua. Siendo 500 µg/mL la dosis más efectiva para inhibir la formación de Biofilm.

Esto indica que la inhibición del mismo no está relacionada con la disminución del número de células capaces de formarlo,

sino con una inhibición en el sistema de QS. Por lo se investigó la capacidad de inhibir competitivamente con un AI por el sitio activo que dispara el QS

Disrupción de Biofilm



Los extractos clorofórmicos de sobrenadante de cultivo presentaron los siguientes porcentajes de disrupción con respecto al Control positivo:

El Extracto del sobrenadante de *L. casei* CRL 431 presento una capacidad de disrupción sobre el biofilm de *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* contaminante de alimento de un: 47%, 32% y 29% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100µg/mL y de un: 48%, 34% y 19% cuando se emplea a 500µg/mL.

Con respecto al extracto del sobrenadante de *L.acidophilus* CRL 730, este presento una capacidad disruptora sobre el biofilm de *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* contaminante de alimento de un: 21%, 28% y 22% respectivamente cuando se emplea en una concentración de 100 µg/mL y de un:

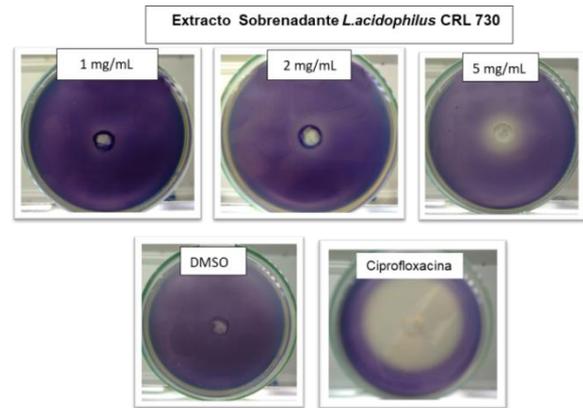
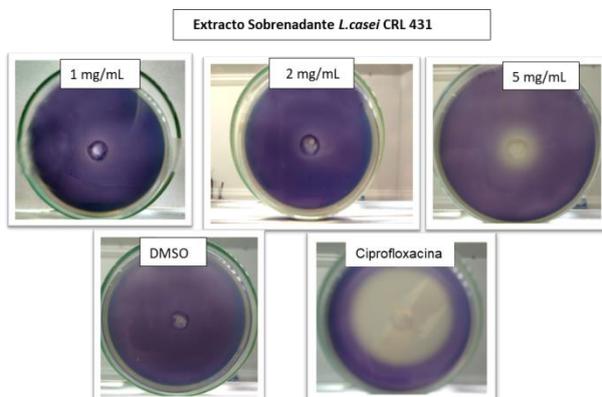
29%, 30% y 21% a una concentración de 500 µg/mL.

Estos resultados indican que no hay diferencia significativa entre ambos extractos empleados a las concentraciones ensayadas en la capacidad disruptora del biofilm formado.

En este trabajo ambos extractos fueron capaces de producir disrupción sobre el Biofilm formado por *P. aeruginosa* PA01 en contraposición con su incapacidad para Inhibir su formación.

Este efecto también se observó en otros trabajos en el que un extracto de diclorometano del sobrenadante de cultivo de *L. plantarum* ATCC 10241 presento una gran capacidad de disrupción de Biofilm (Ramos et al., 2010a, 2012)

Efecto anti Qs por difusión en agar utilizando *Chromobacterium violaceum* CV026



Se observa un crecimiento en césped sin producción de violaceína en las inmediaciones de los pocillos inoculados con los Extracto de sobrenadante de *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730 (1mg /mL y 2mg/mL) e Inhibidores de la producción de Violaceína y el crecimiento de *C. violaceum* CV026 a una concentración de 5 mg/mL.

En este trabajo la inhibición de producción de violaceína inducida con 25 µg/mL de AI por los extractos de sobrenadantes indica que son inhibidores competitivos de los sitios activos que inducen los factores de virulencia y del crecimiento bacteriano, que suele producir bacterias resistentes a antibióticos.

Por otros trabajos se conoce que sobrenadantes de cultivos de cepas de lactobacilos como *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* NCIMB8826, *L. johnsonii* VP11088 y *L. casei* ATCC 393 producen moléculas tipo AI-2 que inhiben el *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa*. (De Keersmaecker y col.2003)

Por lo tanto estos extractos clorofórmicos de sobrenadantes de Bacterias Lácticas

son una promisoriosa fuente de compuestos con potencial antipatogénico para *P. aeruginosa*

Conclusiones

- Estos resultados demuestran que los compuestos de mediana polaridad extraídos del sobrenadante de bacterias lácticas probióticas tienen propiedades inhibitorias del crecimiento y disrupción de biofilm sobre las tres cepas de *Pseudomonas* ensayadas.

- Los extractos presentaron capacidad de inhibir la formación de biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 y *Pseudomonas aeruginosa* contaminante de agua; Pero no así sobre el biofilm formado por *Pseudomonas aeruginosa* PA01

- Tanto en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 y contaminante de agua, los extractos impidieron que se forme biofilm por inhibición del QS bacteriano.

- Estos extractos podrían tener componentes con potencial Quorum quenching lo que amerita un análisis químico más profundo de los mismos para determinar su naturaleza.

Bibliografía

1. Abu-Tarboush, H.M., Al-Saiady, M.Y., Keir El-Din, A.H. (1996). Animal Feed Science and Technology, 57, 39-49.
2. Ali Ahmed, A.B and Taha, R.M.(2011).The perspectives of the application of biofilm in the

prevention of chronic infections. Advances in Food and Nutrition Research 64: 403-416.

3. Beaugerie, L and Petit, J.C.(2004). "Antibiotic-associated diarrhoea," *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, vol. 18, no.2, pp. 337–352.
4. Bjarnsholt, T. (2013).The role of bacterial biofilms in chronic infections".*APMIS Supplementum*, no. 136, pp. 1–51,
5. Blackledge, M. S., Worthington, R.J and Melander,C. (2013). Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms.*Current Opinion in Pharmacology*, vol. 13, no. 5, pp. 699–706.
6. Cegelski.L., Marshall G, R., Eldridge, G. R, and Hultgren, S. J. (2008).The biology and future prospects of antivirulence therapies". *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 17–27.
7. D'Almeida, R.E., Molina, R., Viola, C, Luciardi, M.C., Nieto, C., Bardón, A, Arena, M.E.(2017).Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*.
8. Davey, M.E. and O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology*

- and Molecular Biology Reviews 64: 847-867.
9. Deep, A., Chaudhary, U and Gupta, V. (2011). Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *Journal of Laboratory Physicians*, vol. 3, no. 1, pp. 4–11.
 10. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890.
 11. English, B. K and Gaur .A. H. (2010). The use and abuse of antibiotics and the development of antibiotic resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 659, pp. 73–82, 2010.
 12. Epps, L.C. and Walker, P.D. (2006). Fluoroquinolone consumption and emerging resistance. *US Pharmacology*, vol. 10, pp. 47–54.
 13. Fernández-Ramírez, M.D., Smid, E.J, Abee, T and Nierop Groot, M.N. (2015). Characterization of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology* 207: 23-29
 14. Fuqua, C, Parsek. M., Greenberg. E. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Ann Rev Genet* 35:439–68.
 15. Gonzalez, S.N., Morata de Ambrosini, V.I., Oliver, G. (1999). Study of Adhesion of *Lactobacillus casei* CRL 431 to Ileal Intestinal Cells of Mice. *Journal of Food Protection*, Vol. 62, No. 12.
 16. Guarner F and Malagelada J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, vol. 361, no. 9356, pp. 512–519.
 17. Hentzer, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 148:87–102.
 18. Høiby, N., Ciofu, O and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 1663–1674.
 19. McClean, K.H., et al. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143, 3703–3711.
 20. O’Toole, G.A and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28: 449-461.
 21. Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragón, I.M and Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv.

- savastanoi*: some like it knot. Mol Plant Pathol 13:998-1009.
22. Ramos, A., Gobbato, N., Rachid M., et al. (2010b). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas aeruginosa* culture supernatants on polymorphonuclear damage and inflammatory response. Int Immunopharmacol 10:247–51.
 23. Ramos, A.N., Sesto Cabral, M.E., Arena, M.E., Arrighi, C.F., Arroyo Aguilar, A.A., Valdéz J.C. (2015). Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. J Pharm Biol., en prensa.
 24. Smith, R.S., Iglewski, B.H.(2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 6:56–60
 25. Valdez, J., Peral, M., Rachid, M, et al.(2005).Interference of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns. The potential use of probiotic in wound treatment. Clin Microbiol Infect 11:472–9.
 26. Wu, H., et al. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. J. Antimicrob. Chemother. 53:1054 –1061.