artículo original

FOS como alternativa contra el crecimiento y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

FOS as alternative against growth and virulence of pseudomonas aeruginosa PAO1

Resumen

Objetivo: estudiar el efecto y el mecanismo de modulación de FOS e inulina sobre el crecimiento y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Métodos**: para determinar el efecto de FOS e inulina sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*, el cultivo se realizó en medio mínimo M9 suplementado con citrato 50 mM como fuente de carbono a 37 ºC durante 24 horas. Se determinaron los niveles de citotoxicidad de un co-cultivo o de *P. aeruginosa* y células intestinales *IEC18.* Se extrajeron proteínas y se cuantificaron mediante los niveles de la exotoxina A secretada para la extracción de mediante western-blot. Se estudió, a través de ensayos de PCR a tiempo real, el efecto de FOS e inulina sobre la expresión de genes codificantes de proteínas ampliamente implicadas en los sistemas de secreción III y VI de *P. aeruginosa* PAO1. **Resultados**: 1. FOS inhiben el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1; sin embargo, inulina causó solo cambios insignificantes; 2. FOS e inulina muestran efectos opuestos ya que mientras que la inulina estimula la formación de biopelículas, FOS ejerce un efecto inhibitorio; 3. FOS inhibe la secreción del factor de virulencia exotoxina A al citosol dependiente del sistema de secreción tipo II, limitando su virulencia para las células IEC18; 4. FOS inhibe la expresión de genes que codifican proteínas indispensables para el funcionamiento adecuado de los sistema de secreción III y VI en *P. aeruginosa.* **Conclusiones**: FOS reduce la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1 actuando sobre diferentes mecanismos de virulencia.

ABSTRACT

Objective: to study the effect and mechanism of FOS and inulin modulation on the growth and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Methods: To determine the effect of FOS and inulin on *P. aeruginosa* growth, culture was performed in M9 minimal medium supplemented with 50 mM citrate as a carbon source at 37 ° C for 24 hours. Cytotoxicity levels of a co-culture or of *P. aeruginosa* and IEC18 intestinal cells were determined. Proteins were extracted and quantified by the secreted exotoxin A levels for the extraction of western-blot. The effect of FOS and inulin on the expression of protein coding genes widely implicated in *P. aeruginosa* PAO1 secretion systems III and VI was studied through real-time PCR assays. Results: 1. FOS inhibited the growth of *P. aeruginosa* PAO1, however inulin caused only insignificant changes; 2. FOS and inulin show opposite effects; While inulin stimulates the formation of biofilms FOS exerts an inhibitory effect; 3. FOS inhibits the secretion of virulence factor exotoxin A to the cytosol dependent on the type II secretion system by limiting its virulence for IEC cells18; 4. FOS inhibits the expression of genes encoding proteins essential for the proper functioning of the secretion system III and VI in *P. aeruginosa*. Conclusions: FOS reduces the pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1 by acting on different mechanisms of virulence.

Keyword: FOS, inulin, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Biofilms, secretion system II, III and VI, IEC18 cells.

Olga Martínez-Augustin[1], Fermín Sánchez de Medina[2], Tino Krell[3], y Abdelali Daddaoua[4*]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II; [2] Departamento de Farmacología; [3]Tino Krell y [4]Abdelali Daddaoua, Estación Experimental de Zaidín. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada España CP, 18008

*abdelali.daddaoua@eez.csic.es.

Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F, Krell T, y Daddaoua A. FOS como alternativa contra el crecimiento y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Alianzas y Tendencias. 2017, 2 (1): 30-36.

Recibido: 7 febr 2017. Aceptado: 24 febr 2017.

INTRODUCCIÓN

El curso de la medicina cambió con el descubrimiento de los antibióticos iniciando con la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Desde entonces, los antibióticos han representado la única opción de tratamiento eficaz para las infecciones bacterianas [1]. Sin embargo, su eficacia ha sido seriamente comprometida por el uso abusivo e indebido de estos fármacos, que han provocado la aparición de bacterias resistentes a muchos antibióticos de uso común, lo cual se entiende desde una perspectiva evolutiva ya que los mecanismos de resistencia bacteriana han evolucionado con compuestos antimicrobianos naturales durante décadas [2].

La aparición de múltiples mecanismos de resistencia ha llevado a la utilización de multi-estrategias, combinando distintos antibióticos y realizando grandes esfuerzos en la investigación y desarrollo de nuevos agentes antibióticos químicos, para superar las deficiencias de los existentes. Sin embargo, el desarrollo y la aprobación de la comercialización de nuevos antibióticos no han seguido el ritmo de la creciente amenaza para la salud pública debido a la resistencia bacteriana a los medicamentos. Una alternativa a este problema sería el desarrollo de nuevos compuestos de origen natural y vegetal con propiedad antibacteriana, una alternativa menos costosa. En este contexto, distintos tipos de oligosacáridos no digeribles (OND) son utilizados en la industria alimentaria (como alimentos funcionales) y farmacéutica (como nutracéuticos) por su efecto probióticos [3]. Además, son utilizados como aditivos para la preparación de bebidas y alimentos. Por tanto, son productos de gran interés tanto desde el punto de vista económico como sanitario.

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo responsable de gran número de infecciones oportunistas en pacientes que presentan quemaduras y pacientes con fibrosis quística e inmuno-deprimidos [4-6]. De hecho, se considera la principal causa de morbilidad y mortalidad en dichos pacientes [7]. Esta bacteria presenta una alta resistencia frente a los antibióticos, lo que le hace muy difícil de combatir [8], por lo cual es muy recomendable la búsqueda de nuevas alternativas y compuestos. Uno de los importantes mecanismos de resistencia a los antibióticos reside en el establecimiento de biopelículas [10-14], basada en el empaquetamiento de microorganismos que crecen adheridas a una superficie. Se han realizado importantes esfuerzos de investigación para estudiar los mecanismos moleculares de su formación, maduración y dispersión [11,12]. Se ha demostrado que los flagelos y el tipo IV pili mediada por la motilidad es un requisito para la formación eficiente de la biopelícula [13,14].

La movilidad bacteriana incrementa la formación de biopelículas; esta bacteria posee tres tipos de movilidad característicos de esta cepa: swimmig, swarming y twitching [9]. Los dos primeros son dependientes de flagelos funcionales, un flagelo unipolar para el desplazamiento de tipo swimming y flagelos peritricos para swarming; sin embargo, twitching es un tipo de motilidad dependiente de pili tipo IV.

La bacteria utiliza diferentes sistemas de secreción para inyectar factores de virulencia desde la superficie al citoplasma de las células eucariotas, lo que permite la replicación bacteriana dentro de los macrófagos y consecuentemente la evasión del sistema inmune [15,16]. Actualmente, se han descrito seis tipos distintos de sistema de secreción desde el sistema de secreción tipo 1 (T1SS) hasta el tipo VI (T6SS) [17], los cuales se diferencian en el mecanismo molecular de secreción y en el tipo de sustancia tóxica liberada, que condiciona la gravedad de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Además, la activación del sistema de secreción tipo VI (T6SS) induce la expresión de genes que codifican la proteína hemolisina-coregulada (Hcp) y la familia de proteínas VgrG1, VgrG2 y VgrG3, que forman parte del grupo de genes T6SS [18] . La deleción de los genes hcp o vgrG previene la secreción de proteínas de virulencia, lo que indica que Hcp y VgrG son componentes estructurales del sistema T6SS. Estos datos también sugieren que la inhibición de este sistema de secreción puede ser una estrategia alternativa para combatir la infección bacteriana, lo que hace muy recomendable la búsqueda de nuevos agentes con este fin.

Un número significativo de compuestos naturales se han encontrado para inhibir el crecimiento bacteriano, aunque su mecanismo de acción sigue siendo poco claro [19, 20]. Recientemente, se han descrito algunos OND los cuales ejercen efectos antibacteriano frente a *P. aeruginosa*, especialmente los fructooligosacáridos (FOS) [9]. Los OND son aquellos oligosacáridos con distintos grados de polimerización que son resistente a la acción de enzimas digestivas del organismo debido al tipo de enlace glucosídico que se da entre los monómeros. Distintos estudios en animales han demostrado el efecto prebiótico de los OND, principalmente de FOS [21, 22].

La inulina y FOS son fructooligosacáridos lineales β(1-2) que difieren tan solo en el grado de polimerización, siendo de 2-20 en el caso de FOS y

de 20 a 60 en la inulina. Son de origen natural, puesto que se encuentran en raíces de plantas como la achicoria, la dalia, la cebolla y el ajo. Inulina y FOS se consideran prebióticos basándose en la observación de que diversos estudios demuestran que son capaces de promover el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas, principalmente bifidobacterias [23,24], y en menor proporción lactobacilos y probablemente otras especies, dando lugar a efectos beneficiosos en el hospedador. Además de los efectos relacionados con alteración de la defensa gastrointestinal, se ha demostrado su efecto, especialmente FOS, frente al crecimiento de *P. aeruginosa* [9].

En este trabajo demostramos que la adición de FOS a los cultivos de *P. aeruginosa* inhibe el crecimiento y la formación de biopelícula. Este efecto parece ser específico para FOS, ya que el tratamiento con inulina no mostró ningún efecto. FOS actúa sobre el sistema de secreción tipo II inhibiendo la secreción del primer factor de virulencia exotoxina A. Además modula el funcionamiento de los sistemas de secreción III y VI reduciendo la expresión de los genes codificantes de proteínas estructurales indispensables para su adecuado funcionamiento.

En conjunto, los datos sugieren que FOS puede ser un componente útil para incluir en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas utilizadas en este estudio. *P. aeruginosa* PAO1 se cultivó en medio LB o medio mínimo M9 [25]. Cuando se necesitó, se añadió ampicilina al medio de cultivo (50 µg/ml).

Efectos de la inulina y FOS en el crecimiento de *P. aeruginosa*. Se recogieron colonias individuales de *P. aeruginosa* PAO1 recién crecidas de la superficie de placas LB agar y se cultivaron durante una noche en medio mínimo M9 suplementado con citrato 5 mM de 37ºC. El cultivo durante la noche se diluyó con medio fresco a una DO660 nm de 0,05. A continuación, en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, se pusieron 180 µl por pocillo de esta suspensión. Luego se añadieron 20 µl de inulina o FOS para alcanzar concentraciones finales de 20 mg/ml. Las placas se incubaron a 37ºC bajo agitación continua en un sistema de analizador de MBR de Bioscreen C FP-1100-C (OY Growth Curves Ab Ltd., Raisio, Finlandia). La turbidez se midió cada 60 min durante un periodo de 24 h, usando un filtro de banda ancha a 420-660 nm. Las mediciones a 580 nm se utilizaron para generar curvas de crecimiento.

Determinación semicuantitativa de la formación de biopelícula. La determinación semicuantitativa de la formación de biopelícula se realizó como se describe [26]. Los experimentos se realizaron en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano en medio M9 suplementado con 0,2% (p/v) de glucosa y casaminoácidos en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones (hasta 35mg/ml) de inulina o FOS. La formación de biopelícula se cuantificó después de 8 h utilizando el método del cristal violeta [27] y determinando los valores de densidad óptica.

Determinación de la concentración de exotoxina A en células IEC18 de rata. Las células IEC 18 se cultivaron en placas de 6 pocillos. En la confluencia se infectaron células IEC18 con *P. aeruginosa* a razón de 5 células bacterianas por célula eucariota en ausencia y en presencia de 5 mg/ml de FOS e inulina. Las placas que contenían células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con una solución de gentamicina (100 µg/ml) durante 1 hora para eliminar las bacterias. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con PBS antes de la recolección de células utilizando tampón RIPA que contenía el cóctel inhibidor de proteasa (Sigma). Las proteínas se extrajeron para análisis mediante Western-blot usando anticuerpo frente Exotoxina A (Sigma) en una dilución 1:2000 (v/v). Después de la incubación durante la noche con el anticuerpo primario, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, Sigma) a una dilución de 1: 3000 (v/v) durante dos horas. Las bandas se detectaron mediante quimioluminiscencia (PerkinElmer, Waltham, MA) y se cuantificaron con el software NIH (Scion Image).

Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se estudió la expresión de los genes *pcrV*, *exAs*, *hcp* y *vrgG* usando PCR cuantitativa a tiempo real. El ARN total se obtuvo mediante el método TRI reagent®/BCP (Ambion). Un µg de ARN se retrotranscribió siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (iScript, BioRad, Alcobendas, España) y se amplificaron secuencias de ARN específicas con el dispositivo de PCR a tiempo real MX3005P (Stratagene).

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR, a través de GoTaq @qPCR Master Mix (PromegaMadison, WI, EE.UU.), utilizando 1 µg de cDNA como molde y los cebadores a 61ºC como temperatura de hibridación y durante 40 ciclos. Los valores se normalizaron mediante la transcripción del gene de referencia 16S.

RESULTADOS

Efecto de FOS e inulina sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1

Basándose sobre los datos descritos por Ortega-González *et al* (2014) [9] y para estudiar el efecto de la inulina y FOS sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1, se utilizó una concentración de 20 mg/ml de ambos productos en medio mínimum M9 suplementado con citrato a 5 mM como fuente de carbono. Mientras que la inulina causó sólo cambios mínimos sobre el crecimiento bacteriano, la adición de FOS inhibió claramente el crecimiento (Fig 1). Dado que FOS e inulina tan solo difieren en el grado de polimerización, nuestros resultados indicarían que éste es un parámetro importante en la actividad antibacteriana.

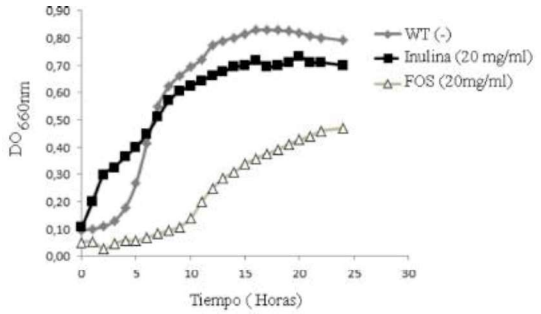

Figura 1: Efecto de la inulina y FOS sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. Se muestra el efecto de inulina (cuadros negros) o FOS (triangulos blancos) sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 a concentración de 20 mg/ml [9]. El crecimiento se realizó en medio mínimo M9 suplementado con citrato 5 mM como fuente de carbono a 37 ºC durante 24 horas.

Efecto de FOS e Inulina sobre la formación de biopelículas por Pseudomonas aeruginosa PAO1

Con el propósito de estudiar la influencia de FOS e Inulina en la formación de biopelículas, se cultivó *P. aeruginosa* en presencia de distintas concentraciones de ambos compuestos (5-35 mg/ml) durante 8 horas. En la figura 2 se representan el porcentaje de crecimiento de la biopelícula en función de la concentración de inulina y FOS en el medio de cultivo. El crecimiento de la biopelícula fue determinado mediante tinción con cristal violeta de las bacterias y posterior determinación de la absorbancia. Los resultados muestran que estos compuestos tienen efectos opuestos; mientras que la inulina estimula la formación de la biopelícula, FOS ejerce un efecto inhibitorio.

Análisis de la actividad del sistema de secreción III y VI por detección de exotoxina A intracelular

P. aeruginosa emplea una serie de sistemas para secretar proteínas que juegan diferentes papeles durante la infección. El sistema de secreción tipo II es responsable de la secreción de la mayoría de los exoproductos en el entorno circundante, incluyendo la exotoxina A, mientras que los sistemas III y VI regulan la secreción de las proteínas directamente al citoplasma de la célula huésped. Para analizar el papel de los sistemas de secreción en los efectos mediados por FOS/inulina, se cuantificó la exotoxina A en el sobrenadantes de co-cultivos bacterianos con células eucariotas y dentro de células eucariotas. Para garantizar una completa separación de las células eucariotas y las bacterias, se utilizó la línea de células de epitelio intestinal de rata IEC-18, exhibe respuestas inflamatorias

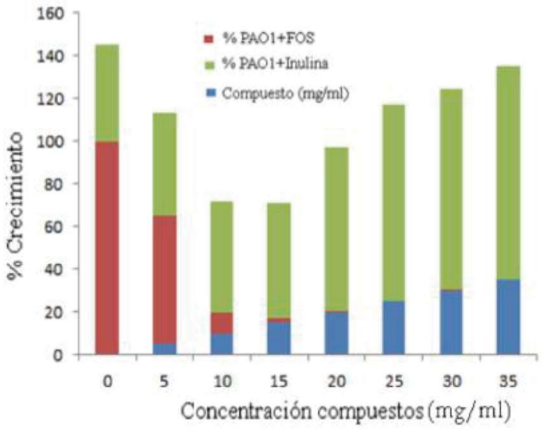

Figura 2: Formación de biopelículas por *P. aeruginosa*. Cuantificación de la formación de biopelícula en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de FOS e inulina (5-35 mg/ml). La formación de biopelícula se monitorizó en medio M9 suplementado con glucosa al 0,2% (p / v) y casaminoácidos y se cuantificó después de 6 h mediante medida de la DO a 560 nm de las bacterias teñida mediante violeta de cristal.

Los resultados de western-blot usando anticuerpos frente a exotoxina A mostraron que la adición de FOS e inulina no alteró los niveles de exotoxina A presentes en el medio de cultivo. No obstante, se observó que FOS reduce los niveles intracelulares de exotoxina A en células IEC-18 cuando se co-cultivaron con *P. aeruginosa*, mientras que no se observó cambio significativo en presencia de inulina (Figura 3A).

Basándonos en los datos anteriores, formulamos la hipótesis de que la reducción mediada por FOS en la concentración intracelular de exotoxina A puede ser debida a la inhibición de la transcripción de proteínas implicadas en el sistema de secreción. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizaron experimentos de PCR a tiempo real con el fin de caracterizar la expresión de 4 genes que participan en la acción y el funcionamiento adecuado de los sistemas de secreción III y VI. Los productos de los genes *pcrV* y *exAs* controlan la activación del sistema de secreción

tipo III [28], mientras que las proteínas codificadas por *hcp1* y *vrgG1* son necesarias para el sistema de secreción tipo VI [29]. La inulina causó una estimulación significativa de la expresión de *pcrV* y *exAs* (Figura 3B), mientras que la transcripción de los otros dos genes permaneció sin cambios. Por el contrario, la expresión de *exAs* y *hcp1* fueron dramáticamente reducidos su expresión por factores de aproximadamente 20 y 7, respectivamente, en presencia de FOS (Fig. 3B).

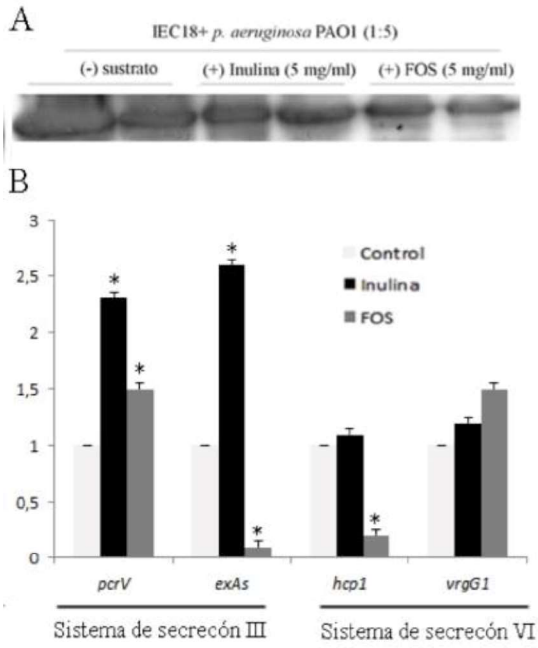

Figura 3: Efecto de FOS e inulina en la expresión de genes de sistemas de secreción de *P. aeruginosa*. A) Determinación por Western blot de la concentración celular de exotoxina A en células IEC18 después del co-cultivo con *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de FOS e inulina. B) Estudios de PCR a tiempo real de *P. aeruginosa* cultivadas en presencia y ausencia de inulina. Se muestran la expresión de genes que codifican proteínas de los sistemas de secreción III y VI.

DISCUSIÓN

FOS, uno de los OND más empleados, tiene efectos específicos sobre *P. aeruginosa* al inhibir su crecimiento y la formación de biopelículas. Es interesante destacar que FOS e inulina afectaron de forma opuestas a la formación de biopelículas, lo que podría ser de gran interés en sanidad. Con el objetivo de determinar si FOS efectivamente disminuye la virulencia de *P. aeruginosa*, se seleccionó el gene toxA, que codifica la exotoxina A que es el factor de virulencia determinante de patogenicidad en esta especie bacteriana. Se utilizaron células de epitelio intestinal (IEC18), que por crecer en monocapa adherida a la superficie permiten eliminar los restos de bacterias por medio de lavados sucesivos más fácilmente que en cultivos en suspensión. Nuestros estudios confirmaron que FOS, pero no inulina, reduce la cantidad de exotoxina A presente en las células infectadas. La variedad de procesos celulares modulados por FOS fue un hallazgo ciertamente sorprendente. Es posible que estos efectos impliquen la interacción con receptores de adhesión, señalizando a través de diferentes cascadas y modulando en último término distintos procesos celulares. Este mecanismo seria comparable al de otros glucósidos antimicrobianos [28]. Globalmente, nuestros resultados indican que FOS puede reducir la patogenicidad de *P. aeruginosa in vitro* de forma específica, actuado a varios niveles. La gravedad de la infección depende de los factores de virulencia expresados por la bacteria y de su incorporación mediante los sistemas de secreción al interior del huésped. Como resultado, las infecciones por *P. aerugionosa* son generalmente difíciles de tratar.

Nuestros datos sugieren que FOS podría ser útil para combatir infecciones por *P. aeruginosa* como componente de una mezcla de antibióticos. También podría emplearse vía oral como profiláctico con el objetivo de prevenir infecciones gastrointestinales. Sin embargo, cualquier aplicación clínica requeriría un estudio más exhaustivo del efecto de FOS en humanos.

CONCLUSION

FOS modula la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1 actuando sobre diferentes mecanismos de virulencia; además de su efecto sobre el crecimiento y la reducción de la formación de biopelícula, FOS reduce la secreción del primer factor de virulencia exotoxina A y modula el funcionamiento adecuada de los sistemas de secreción III y VI.

CONFLICTO DE INTERES

Se declara que el presente documento no tiene conflicto de intereses, ya que no existe relación económica, personal o política que interfiera o influya en la credibilidad del mismo.

REFERENCIAS

[1]. Alekshun, M.N., and Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 2007; 128:1037-1050.

[2]. D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. Sampling the antibiotic resistome. Science 2006; 311: 374-377.

[3]. Kleessen, B., Hartmann, L., Blaut, M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. Br.J Nutr. 2001; 86(2): 291-300.

[4]. Cao, H., Baldini, RL., Rahme, LG. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. Annu Rev Phytopathol 2001; 39: 259-284.

[5]. Rahme, LG., Steven,s EJ., Wolfort, SF., Shao, J., Tompkins, RG., *et al*. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 1995; 268: 1899-1902.

[6]. Chastre, J., Fagon, JY. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 867-903.

[7]. Hoiby, N. Bacterial meningitis. Ugeskr Laeger 2005; 167: 2429-2430; author reply 2430.

[8]. Hoiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol 2010; 5: 1663-1674.

[9]. Ortega-González, M., Sánchez de Medina, F., Molina-Santiago, C., López-Posadas, R., Pacheco, D., Krell, T., Martínez Augustin, O., Abdelali Daddaoua. Fructooligosacharides reduce pseudomonas aeruginosa PAO1 pathogenicity through distinct mechanisms. Plos One 2014; 22; 9(1): e85772.

[10]. Hoiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. Microbes Infect 2001; 3: 23-35.

[11]. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, DG., Costerton, JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 187-209.

[12]. Flemming, HC., Neu, TR., Wozniak, DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". J Bacteriol 2007; 189: 7945-7947.

[13]. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., *et al*. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol Microbiol 2003; 48: 1511-1524.

[14]. O'Toole, GA., Kolter, R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 1998; 28: 449-461.

[15]. Durand, E., Verger, D., Rego, AT., Chandran, V., Meng, G. *et al*. Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens--potential for new drug targets. Infect Disord Drug Targets 2009; 9: 518-547.

[16]. Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, GP., Filloux, A. *et al*. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. Int J Med Microbiol 2010; 300: 534-543.

[17]. Llosa, M., Roy, C., Dehio, C. Bacterial type IV secretion systems in human disease. Mol Microbiol 2009; 73: 141-151.

[18]. Suarez, G., Sierra, JC., Sha, J., Wang, S., Erova, TE. *et al*. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. Microb Pathog 2008; 44: 344-361.

[19]. Amer, LS., Bishop, BM., van Hoek, ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against Francisella. Biochem Biophys Res Commun 2010; 396: 246-251.

[20]. Johansson, EM., Crusz, SA., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, RU. *et al*. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB. Chem Biol 2008; 15: 1249-1257.

[21]. Capitán-Cañadas, F., Ocón, B., Aranda, CJ., Anzola, A., Suárez, MD., Zarzuelo, A., de Medina, FS., Martínez-Augustin, O. Fructooligosaccharides exert intestinal anti-inflammatory activity in the CD4+ CD62l+ T cell transfer model of colitis in C57BL/6j mice. Eur J Nutr 2016; 55(4):1445-54.

[22]. Ortega-González, M., Ocón, B., Romero-Calvo, I., Anzola, A., Guadi,x E., Zarzuelo, A., Suárez, MD., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. Nondigestible oligosaccharides exert nonprebiotic effects on intestinal epithelial cells enhancing the immune response via activation of TLR4-NFκB. Mol Nutr Food Res 2014; 58(2): 384-93.

[23]. Gibson, GR., Beatty, ER., Wang, X., Cummings, JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology 1995; 108: 975-982.

[24]. Bosscher, D., Van Loo, J., Franck, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. Nutr Res Rev 2006; 19: 216-226.

[25]. Abril, MA., Michan, C., Timmis, KN., Ramos, JL. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. J Bacteriol 1989; 171: 6782-6790.

[26]. Christensen, GD., Simpson, WA., Younger, JJ., Baddour, LM., Barrett, FF. *et al*. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 22: 996-1006.

[27]. Fredheim, EG., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P. *et al*. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 2009; 47: 1172-1180.

[28]. Lee, PC., Stopford, CM., Svenson, AG., Rietsch, A. Control of effector export by the

Pseudomonas aeruginosa type III secretion proteins PcrG and PcrV. Mol Microbiol 2010; 75: 924-941.

[29]. Hachani, A., Lossi, NS., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S. *et al*. Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. J Biol Chem 2011; 286: 12317-12327.

[30]. Nenaah., G. World, J. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. Microbiol Biotechnol 2013; 29(7):1255-62. 17.