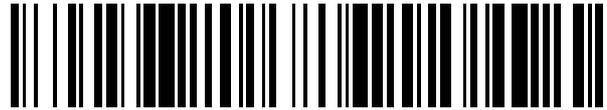


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 386**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12806480 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016** **EP 2809161**

54 Título: **Procedimiento de lucha biológica contra Pseudomonas**

30 Prioridad:

20.12.2011 FR 1162098

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.05.2016

73 Titular/es:

**AMOEBA (100.0%)
38 Avenue des Frères Montgolfier
69680 Chassieu, FR**

72 Inventor/es:

**PLASSON, FABRICE y
BODENNEC, SÉLÉNA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 570 386 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de lucha biológica contra *Pseudomonas*

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de lucha biológica contra la presencia de *Pseudomonas* y su proliferación.

10 **Estado de la técnica**

Pseudomonas es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. En el hombre, esta bacteria es responsable de diversas infecciones cutáneas, viscerales y pulmonares, particularmente fibrosis quística (4, 19). Estas bacterias pueden resistir numerosos antisépticos y antibióticos (2) (7) explicando sin duda en parte su presencia cada vez más frecuente en el medio hospitalario donde pueden aislarse del medio húmedo (lavabos, grifos, vasos, ropa y objetos de aseo, recipientes que contienen agua, etc.). Algunas especies presentan también un poder patógeno hacia las plantas (8), nematodos (10) y amebas (1, 11, 16). Asimismo, la supervivencia y control de esta bacteria constituye una preocupación cada vez más importante.

En general se sabe que, en el medio ambiente, *Pseudomonas* presenta una distribución ubicua (5), ya que esta bacteria se ha aislado del suelo, de aguas residuales o de vertidos industriales y de biopelículas, característica que comparte con las amebas libres. Muchas bacterias potencialmente patógenas (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.*, y *Escherichia coli* 0157: 7) han desarrollado mecanismos para sobrevivir y multiplicarse en el interior de amebas libres (15). Además, se ha demostrado que las bacterias, tal como *Pseudomonas*, pueden desarrollar diferentes estrategias que las permiten escapar de la depredación por las amebas libres (12, 13, 18). En particular, la formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los mecanismos que permiten a la bacteria escapar eficazmente de la depredación por amebas libres como *Acanthamoeba polyphaga* (18). Es bien sabido que, determinadas amebas libres, como *Acanthamoeba*, pueden desarrollar una respuesta quimiotáctica hacia *Pseudomonas* y de alimentarse de estas bacterias (17, 18), también se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* inhibe rápidamente el crecimiento de estas amebas e induce su enquistamiento y su muerte segregando toxinas (11-13, 17, 18). El efecto tóxico de las *Pseudomonas* también se ha demostrado en protozoos ciliados (9).

Por tanto, claramente parece que los protozoos y las amebas libres constituyen un elemento importante de la ecología de *Pseudomonas*. Además, la capacidad de *Pseudomonas* de infectar y sobrevivir intracelularmente en los protozoos es un potente indicador de que estos protozoos son factores que favorecen la resistencia de *Pseudomonas* a los tratamientos biocidas actualmente utilizados, como indican Michel *et al.*, (14).

En este contexto, los autores de la invención han demostrado, de manera totalmente inesperada, que la especie amebiana *Willaertia magna* erradica las bacterias *Pseudomonas*. Este efecto biocida se duplica por la capacidad de depredación ya demostrada de *Willaertia magna* hacia otros agentes amebianos que pueden servir de vector a *Pseudomonas* (3).

Objeto de la invención

Por tanto, la presente invención tiene como objeto en primer lugar un procedimiento de lucha contra la proliferación de *Pseudomonas*, que utiliza protozoos de la especie *Willaertia magna*. Los procedimientos de acuerdo con la invención no incluyen los métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o animal. En el procedimiento según la invención, la mayoría de las veces un flujo de gas o líquido se trata con protozoos de la especie *Willaertia magna*.

El procedimiento según la invención encuentra aplicación particular, en la desinfección de redes de distribución de aguas sanitarias o de aguas industriales, circuitos de refrigeración de instalaciones industriales, o redes de aire acondicionado. Los protozoos podrán añadirse directamente a las aguas o a los líquidos que circulan en las canalizaciones o en las redes a tratar. También es posible pulverizarlos, por ejemplo, en forma de una solución acuosa en aerosol, en las redes, conductos, instalaciones y superficies industriales a desinfectar.

De manera ventajosa, los protozoos utilizados en el ámbito de la invención corresponden, a la cepa depositada en la ATCC el 26 de agosto del 2006 con el número PTA 7824, o a la cepa depositada en la ATCC el 26 de agosto del 2006 con el número PTA 7825, estando estas dos cepas depositadas con los nombres del CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) - 3 rue Michel Ange - 75794 PARIS CEDEX 16/FRANCIA- y UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD - 43 Boulevard du 11 Novembre 1918 - 69622 VILLEURBANNE Cedex/FRANCIA.

Los protozoos que pertenecen al género *Willaertia* que corresponden a la cepa depositada con el número **PTA 7824** en la ATCC o a la cepa depositada con el número **PTA 7825** en la ATCC forman parte integrante de la invención. Dichas cepas depositadas PTA 7824 y PTA 7825 también se describen en la publicación de la solicitud internacional PCT WO2008/043969.

Dichos protozoos podrán por tanto utilizarse como agentes desinfectantes, en particular para eliminar bacterias *Pseudomonas* y luchar contra la proliferación y la contaminación por *Pseudomonas*.

Por otra parte, la invención tiene por objeto un agente desinfectante que contiene protozoos de la especie *Willaertia magna*. Se preferirán los protozoos que corresponden a la cepa depositada con el número **PTA 7824** en la ATCC o a la cepa depositada con el número **PTA 7825** en la ATCC. De manera ventajosa, el agente desinfectante de acuerdo con la invención se presenta en forma de una solución o de una suspensión acuosa, por ejemplo, en agua destilada. El agente desinfectante podrá presentarse en forma pulverizable, por ejemplo, en aerosol o en cualquier otro medio de aplicación.

Los autores de la invención han puesto de manifiesto la actividad de los protozoos de la especie *Willaertia magna*, que inhiben la proliferación de *Pseudomonas* comparando la replicación de *Pseudomonas* en los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* utilizados como modelos amebianos con la observada en el género amebiano *Willaertia*. La actividad de los protozoos de la especie *Willaertia magna*, también se ha puesto de manifiesto demostrando el efecto de depredación de *Willaertia magna* sobre biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

La invención también tiene por objeto la utilización de un agente desinfectante o de un protozoo, como se ha descrito anteriormente, como biocida sobre las *Pseudomonas*.

Dado el papel esencial que desempeñan las amebas en la proliferación y mantenimiento de *Pseudomonas* en el medio exterior, el procedimiento y el agente desinfectante de acuerdo con la invención presentan numerosas ventajas, en cuanto a coste, eficacia y particularmente en lo que respecta al medio ambiente.

25 Descripción de las figuras

Los siguientes ejemplos permiten ilustrar la invención pero no tienen ningún carácter limitativo.

La **Figura 1** muestra la evolución espontánea de poblaciones respectivas de amebas *Hartmannella vermiformis* (símbolo « cuadrado » ■), *Acanthamoeba castellanii* (símbolo « rombo » ♦) y *Willaertia* (*Willaertia magna* - símbolo « triángulo » ▲) después de cocultivar con *Pseudomonas* a una proporción de ameba/ bacteria inicial de 10.

Las diferentes amebas libres se ponen en cocultivos (tiempo 0 horas = T₀) con *Pseudomonas* a una proporción de 10 (10 bacterias / una ameba) como se describe en el apartado de material y métodos. Cada tres horas, se extrajeron alícuotas de suspensiones de cocultivo: es decir, T₀, T+3 h, T₀+6 h. El porcentaje de amebas vivas se determina mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano y una observación microscópica usando una celda de Mallasez. Los datos se expresan en % de células vivas, negativas al ensayo de exclusión con azul de tripano.

La **Figura 2** muestra el crecimiento de *Pseudomonas* en cocultivos con *Acanthamoeba* y *Hartmannella* pero no con *Willaertia*.

Las amebas (5 x 10⁴) se resuspendieron en agua y se sembraron en los pocillos. Después de 1 hora, se añadieron *Pseudomonas* a los pocillos de manera que se alcanzasen diferentes MOI (del inglés *Multiplicity of Infection*, multiplicidad de infección) como se indica en el panel A. Los cocultivos se incubaron a 30 °C y se examinaron después de 24 y 48 horas. **A.** Obsérvese la ausencia de proliferación bacteriana en los pocillos que contienen *Willaertia* con *Pseudomonas*. **B.** 100 µl de sobrenadante de los pocillos que contenían 100 bacterias/1 ameba y 10 bacterias / 1 ameba (MOI de 100 y MOI de 10 respectivamente) se diluyeron sucesivamente (diluciones que variaban de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ con el agua estéril desionizada) y se sembraron en agar TSA. Obsérvese la ausencia de desarrollo de colonias bacterianas en el sobrenadante de cocultivos con *Willaertia magna* (W), y por contra el fuerte desarrollo de *Pseudomonas* en presencia de *Hartmannella* (H).

La **Figura 3** muestra las cinéticas comparadas del desarrollo de *Pseudomonas* (símbolo « rombo » ♦) obtenidas en cocultivo con diferentes géneros amebianos, incluso el género *Willaertia* (*Willaertia magna* - símbolo « cruz » x).

Las diferentes amebas libres se cocultivaron por separado (tiempo 0 horas = T₀) con *Pseudomonas* a una proporción de 10 (10 bacterias / una ameba). Cada tres horas, se extrajeron alícuotas de suspensiones de cocultivo: es decir, T₀, T+3 h, T₀+6 h. y las concentraciones de *Pseudomonas* se determinaron como se describe en el apartado de material y métodos. Un control positivo, que comprendía únicamente la bacteria *Pseudomonas* a una concentración equivalente a la de los cocultivos, servirá de control del crecimiento de *Pseudomonas* en el medio. Obsérvese la multiplicación bacteriana en los cocultivos con *Acanthamoeba castellanii* (símbolo « cuadrado » ■) y *Hartmannella vermiformis* (símbolo « triángulo » ▲).

La **Figura 4** muestra el efecto biocida de *Willaertia magna* en una biopelícula formada por *Pseudomonas*.

Las *Pseudomonas* y *Willaertia magna* se sembraron en agar TSA y se incubaron a 30 °C durante 24 h. **A.** Las zonas de lisis de la biopelícula de *Pseudomonas* se formaron sobre y más allá de los depósitos de *Willaertia magna* como

se indica con las flechas en la Figura 4A. **B.** Frente de una zona de lisis de biopelícula indicada con la flecha. Obsérvese a la derecha, el lugar de depósito de *Willaertia magna* y la ausencia de película bacteriana. Obsérvese a la izquierda el tapiz de *Pseudomonas*.

5 Descripción detallada de la invención

1. Material y métodos

1.1. Cepas utilizadas:

Pseudomonas: la cepa utilizada es la cepa CL 5210 (Oxoid, Francia).

- Se conserva en agar TSA ((agar triptona de soja) (ref PO 5012, Oxoid, Francia) a razón de una réplica por semana. La cepa se sembró en estrías anchas en placas de agar con TSA y se incubó durante 2 días a 30 °C.

- **Amebas:** las cepas utilizadas pertenecen a tres especies amebianas diferentes:

- *Hartmannella vermiformis*,
- *Acanthamoeba castellanii*, (ATCC 30010)
- *Willaertia magna* (cepas depositadas en la ATCC con los n° PTA7824 y PTA 7825),

Estas tres cepas se cultivaron de manera axénica, en presencia de 10 % de suero bovino fetal, sobre medio SCGYEM (medio con suero, caseína, glucosa y extracto de levadura), distribuidas en tubos FALCON® (3033) a razón de 3 ml por tubo. Durante la conservación, las formas vegetativas se replicaron cada 8-9 horas. Para los cocultivos, se utilizaron réplicas de 3 a 4 días de manera que se disponía de trofozoítos en plena fase de crecimiento exponencial.

El medio SCGYEM se obtuvo de la siguiente manera:

- Caseína (MERCK 1.02244.010) 10 g
- Na₂HPO₄ 1,325 g
- KH₂PO₄ 0,8 g
- Glucosa 2,5 g
- Extracto de levadura (DIFCO 0127-17-9) 5 g
- Agua destilada 900 ml
- Suero bovino fetal 100 ml

A los 900 ml de agua destilada, se añadieron 2,5 ml de NaOH (1 N), después Na₂HPO₄ y KH₂PO₄. Se calentó ligeramente sobre una placa térmica, y después se añadió progresivamente la caseína con agitación magnética. Después de la disolución de la caseína, se incorporó la glucosa y el extracto de levadura.

Después de la disolución completa, se filtró sucesivamente sobre fibra de vidrio (SARTORIUS SM 6513400), después sobre una membrana de 1 µm (WHATMAN 7190 004). A continuación, el medio se dividió en alícuotas en matraces de vidrio. Los matraces se esterilizaron con autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Antes de la utilización definitiva y de la distribución del medio, se añadió, el suero bovino fetal, de manera estéril utilizando una campana de flujo laminar, a razón de 10 % de volumen final.

1.2. Cocultivo monoamebiano de Pseudomonas.

1.2.1. Preparación del inóculo bacteriano:

A partir de un cultivo de 2 días en agar TSA, se preparó una suspensión de *Pseudomonas* en agua destilada estéril para obtener 1 unidad de Densidad Óptica a 550 nm, o sea una concentración de 10⁹ UFC (unidades formadoras de colonias) /ml.

1.2.2. Realización de cocultivos monoamebianos

Los cocultivos se realizaron en tubos para cultivos celulares (FALCON® 3033) que contenían 3 ml de agua esterilizada con autoclave. La siembra de los tubos se realizó a razón de 1 x 10⁵ amebas/ml, a partir de una suspensión amebiana axénica previamente contabilizada en un hematímetro de Malassez. La infestación de las amebas por *Pseudomonas* se realizó fijando una proporción de *Pseudomonas* / ameba de 10, es decir 1 x 10⁶ bacterias / ml de medio de incubación. Inmediatamente después de la infestación, los tubos de cocultivo se centrifugaron a baja velocidad (760 g durante 10 min) para favorecer el contacto entre las amebas y las bacterias. Después de 10 min, los tubos se pusieron en suspensión manualmente y se incubaron, en posición inclinada, en una estufa a 30 °C.

El destino de las amebas y de las *Pseudomonas* en cocultivo se determinó de la siguiente manera:

Los cocultivos se siguieron durante 6 horas después de la infestación bacteriana. A cada intervalo de tiempo (cada 3 horas), los tubos de cocultivo se extraían y se examinaban al mismo tiempo desde un punto de vista amebiano y bacteriano después de agitación vorticial intensa para separar las amebas de las paredes. Para cada tubo examinado:

- El recuento de las amebas se efectuó directamente en la celda de Malassez.
- La determinación de las concentraciones de *Pseudomonas* se efectuó por aplicación directa del medio de cultivo sobre agar TSA después de dilución de 10 en 10 en agua destilada estéril, en microtubos Eppendorf. Cada dilución se aplicó por triplicado sobre agar TSA a razón de 100 µl por placa. Las placas se incubaron después a 30 °C durante un mínimo de 48 horas. Se efectuó una primera lectura de las placas de agar TSA 24 horas después de la aplicación contabilizando las colonias; seguido de una segunda lectura el 2º día para la confirmación. Las concentraciones de *Pseudomonas* se expresaron en UFC/ml de medio de incubación teniendo en cuenta el factor de dilución y suponiendo que cada colonia correspondía a 1 bacteria inicialmente presente en la suspensión diluida.

Para cada género amebiano, se representaron las curvas de crecimiento de *Pseudomonas* en función del tiempo.

Además, el efecto citotóxico eventual de *Pseudomonas* sobre las diferentes especies de amebas se determinó de la siguiente manera:

- calculando la proporción de amebas que dieron positivo en el ensayo de exclusión con azul de tripano. Este ensayo se realizó al microscopio calculando con la celda de Malassez, el número de células positivas con azul de tripano/número de células totales.

1.3. Efecto de *Willaertia magna* sobre las biopelículas de *Pseudomonas*.

Las *Willaertia* se depositaron sobre el tapiz de *Pseudomonas* que acababa de aplicarse en agar TSA. Las placas de agar se pusieron a 30 °C durante 24 horas para permitir el desarrollo de una película bacteriana sobre la superficie del agar. Después, las placas de agar se observaron al microscopio óptico (aumento x 400) para detectar la formación de zonas de lisis eventuales del tapiz bacteriano.

2. Resultados

2.1. *Willaertia magna* presenta una resistencia a *Pseudomonas*

El efecto de *Pseudomonas* sobre la supervivencia de diferentes especies amebianas ensayadas se determinó mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano. Inmediatamente después del cocultivo de *Acanthamoeba castellanii* con la bacteria, apareció un efecto citotóxico principal en esta especie amebiana, con una disminución de ~ 30 % de la viabilidad después de 3 horas de cocultivo (véase la **Figura 1**). Al contrario, este fenómeno jamás se había observado cuando *Willaertia magna* se ponía en cocultivo con *Pseudomonas*, incluso hasta 9 horas de incubación con una viabilidad que se mantenía cerca del 100 % (**Figura 1**). Al igual que *Willaertia magna*, la ameba libre *Hartmannella vermiformis* no presentaba disminución en cuanto a viabilidad determinada por exclusión con azul de tripano (**Figura 1**). El conjunto de estas observaciones (sin enquistamiento ni citotoxicidad inducida por *Pseudomonas*) demuestran claramente que *Willaertia magna* y *Hartmannella vermiformis*, al contrario de otras especies amebianas de tipo *Acanthamoeba castellanii*, presentan la facultad original de resistir a *Pseudomonas*.

2.2. Depredación de *Pseudomonas* por *Willaertia magna*

Los resultados de los cocultivos de *Pseudomonas* realizados en presencia de amebas que pertenecían a los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba* demostraron una importante multiplicación de la bacteria en presencia de estos dos géneros amebianos porque se observó un aumento de las concentraciones bacterianas en 6 horas (véase la **Figura 2**). A la inversa, (cuando los cocultivos se realizan en condiciones estrictamente idénticas), en presencia de la ameba *Willaertia magna* se constata una reducción del orden de un logaritmo de las concentraciones de *Pseudomonas* detectables, con respecto al control que solo contiene *Pseudomonas* (véase la **Figura 2** y la **Figura 3**). La disminución medida de las concentraciones de *Pseudomonas*, demuestra un efecto masivo de depredación de *Willaertia magna* hacia *Pseudomonas*.

Willaertia magna y *Hartmannella vermiformis* sobreviven, pero solo *Willaertia magna* impide la proliferación bacteriana. Este efecto de *Willaertia magna* sobre las *Pseudomonas* se ilustra también en las **Figuras 3 y 4**. Después de 48 horas de incubación en agua, los cocultivos de *Acanthamoeba* y *Hartmannella* con la bacteria demuestran una proliferación de *Pseudomonas* (obsérvese el aspecto turbio de los pocillos que contienen *Pseudomonas* y *Hartmannella* o *Acanthamoeba*, debido a la proliferación bacteriana) (**Figura 3, panel A**). Las concentraciones de *Pseudomonas* determinadas en el sobrenadante de los pocillos de cocultivo demuestran la ausencia de bacterias con *Willaertia magna* (**Figura 3, panel B**) cuando estas se han incubado a una MOI de 10 (10

bacterias/ una ameba).

El efecto de depredación de *Willaertia magna* sobre *Pseudomonas* también se demuestra en la **Figura 4**. En efecto, después de 24 horas en presencia de *Willaertia magna*, se ponen muy claramente de manifiesto superficies sobre el agar donde ha desaparecido el tapiz bacteriano (en el presente documento estas zonas se denominan zonas de lisis del tapiz/biopelícula bacteriano(a) **Figura 4 panel A**). El examen microscópico de las placas de agar muestra también que las *Willaertia magna* se concentran en el borde de esta zona de lisis; este efecto también se ilustra en la **Figura 4 panel B**, donde claramente se pone de manifiesto la desaparición del tapiz bacteriano bajo la acción de las *Willaertia magna*. El conjunto de estos datos y observaciones muestran claramente el efecto de depredación de *Willaertia magna* hacia la bacteria patógena *Pseudomonas* que ha desarrollado una película.

Referencias bibliográficas

1. Abd H, Wretlind B, Saeed A, Idsund E, Hultenby K, and Sandstrom G. *Pseudomonas aeruginosa* utilises its type III secretion system to kill the free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol* 55: 235-243, 2008.
2. Ashish A, Shaw M, Winstanley C, Ledson MJ, and Walshaw MJ. Increasing resistance of the Liverpool Epidemic Strain (LES) of *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) to antibiotics in cystic fibrosis (CF)-A cause for concern? *J Cyst Fibros* 2011.
3. Bodennec J, Dey R, and Pernin P. Novel method for biologically combating the proliferation of *Legionella pneumophila*, and novel disinfecting agent containing amoebic protozoa of the *Willaertia* genus. edited by University CBL. Francia: 2010.
4. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, and Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5: 279-313, 1983.
5. Bredenbruch F, Geffers R, Nimitz M, Buer J, and Haussier S. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* 8: 1318-1329, 2006.
6. Davies B, Chattings LS, and Edwards SW. Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. *J Gen Microbiol* 137: 705-710, 1991.
7. Fernandez M, Conde S, de la Torre J, Molina- Santiago C, Ramos JL, and Duque E. Mechanisms of resistance to chloramphenicol by *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob Agents Chemother* 2011.
8. Fones H, and Preston GM. Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Lett* doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02449.x.[Epub ahead of print]: 2011.
9. Hahn MW, Moore ER, and Hofle MG. Role of Microcolony Formation in the Protistan Grazing Defense of the Aquatic Bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1. *Microb Ecol* 39: 175-185, 2000.
10. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhack LG, Cezairliyan BO, and Ausubel FM. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog* 6: e1000982, 2010.
11. Julia AG, and Morgan BM. The effects of selected strains of pigmented microorganisms on small free-living amoeba. *Can J Microbiol* 10: 579-584, 1964.
12. Matz C, Bergfeld T, Rice SA, and Kjelleberg S. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ Microbiol* 6: 218-226, 2004.
13. Matz C, Moreno AM, Alhede M, Manefield M, Hauser AR, Givskov M, and Kjelleberg S. *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *ISME J* 2: 843-852, 2008.
14. Michel R, Burghardt H, and Bergmann H. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 196: 532-544, 1995.
15. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, and Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 71: 20-28, 2005.
16. Qureshi MN, Perez AA, 2nd, Madayag RM, and Bottone EJ. Inhibition of *Acanthamoeba* species by *Pseudomonas aeruginosa*: rationale for their selective exclusion in corneal ulcers and contact lens care systems. *J Clin Microbiol* 31: 1908-1910, 1993.
17. Wang X, and Ahearn DG. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr Microbiol* 34: 212-215, 1997.
18. Weitere M, Bergfeld T, Rice SA, Matz C, and Kjelleberg S. Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode. *Environ Microbiol* 7: 1593-1601, 2005.
19. Yang L, Jelsbak L, and Molin S. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environ Microbiol* 13: 1682-1689, 2011.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de lucha contra la proliferación de *Pseudomonas*, con la excepción de métodos de tratamiento aplicados al cuerpo humano o animal, **caracterizado por que** utiliza protozoos de la especie *Willaertia magna*.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** un flujo gaseoso o líquido, o una superficie sólida, se trata con protozoos de la especie *Willaertia magna*.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 **caracterizado por que** estos protozoos corresponden a la cepa depositada con el número PTA 7824 en la ATCC o a la cepa depositada con el número PTA 7825 en la ATCC.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** se implementa para la desinfección de redes de distribución de aguas sanitarias o aguas industriales, circuitos de refrigeración de instalaciones industriales o redes de aire acondicionado.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** se implementa para luchar contra la formación de biopelículas en canalizaciones de agua, superficies en contacto o no con productos alimenticios humanos o animales.
- 20 6. Uso de un agente desinfectante que contiene protozoos de la especie *Willaertia magna*, como biocida sobre *Pseudomonas*, con la excepción de una utilización para el tratamiento aplicado al cuerpo humano o animal.
- 25 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** los protozoos corresponden a la cepa depositada con el número PTA 7824 en la ATCC o a la cepa depositada con el número PTA 7825 en la ATCC.
8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado por que** el agente desinfectante se presenta en forma de una solución o de una suspensión acuosa.

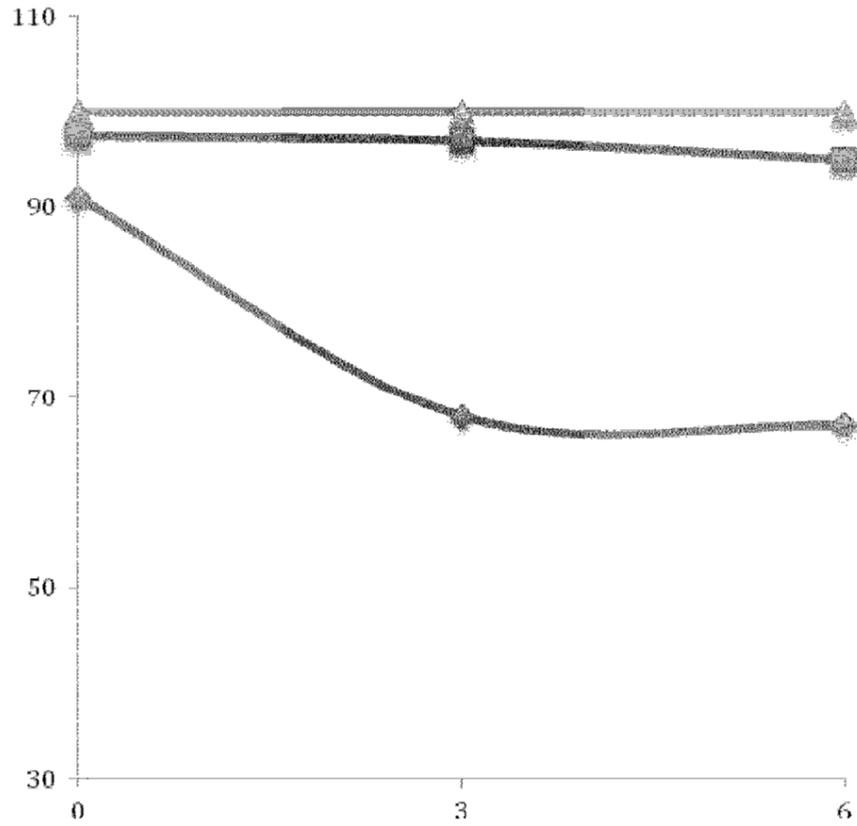


Figura 1.

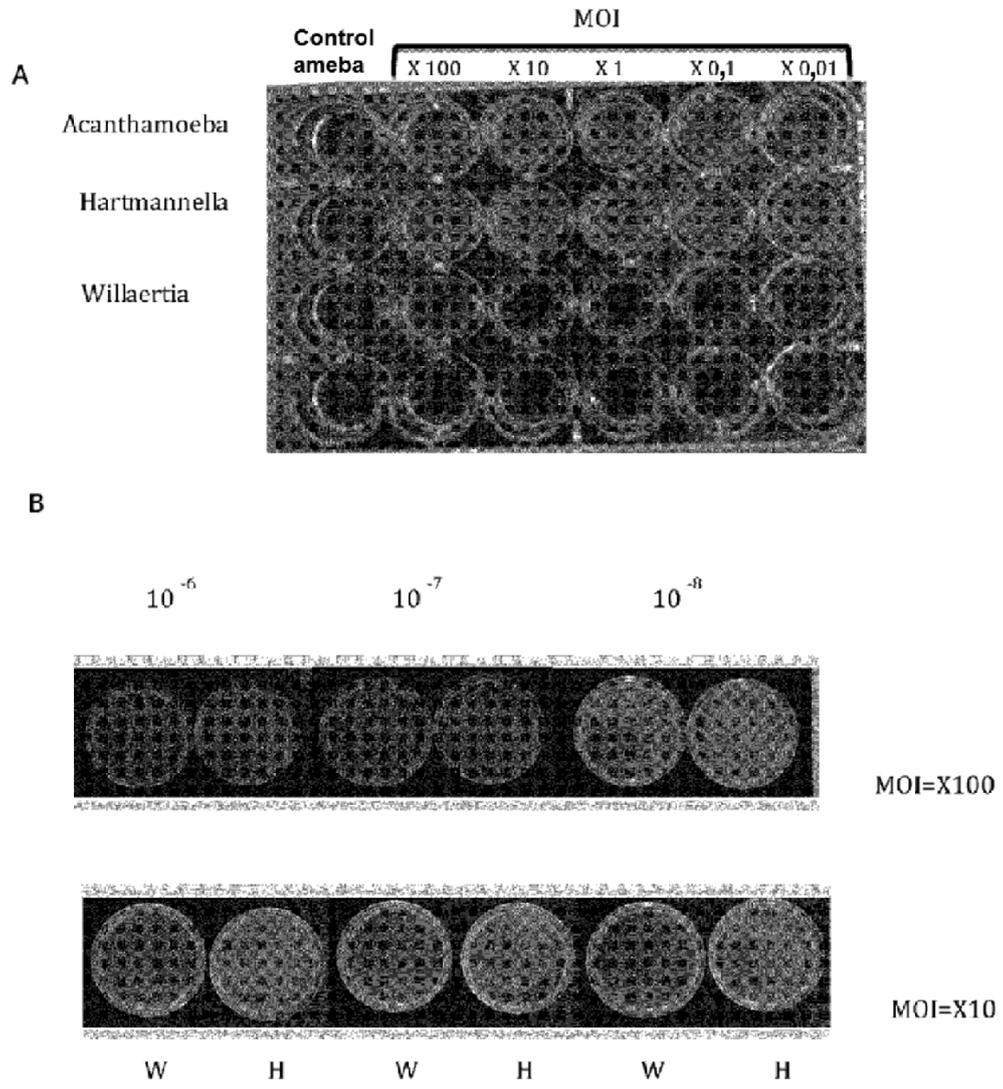


Figura 2.

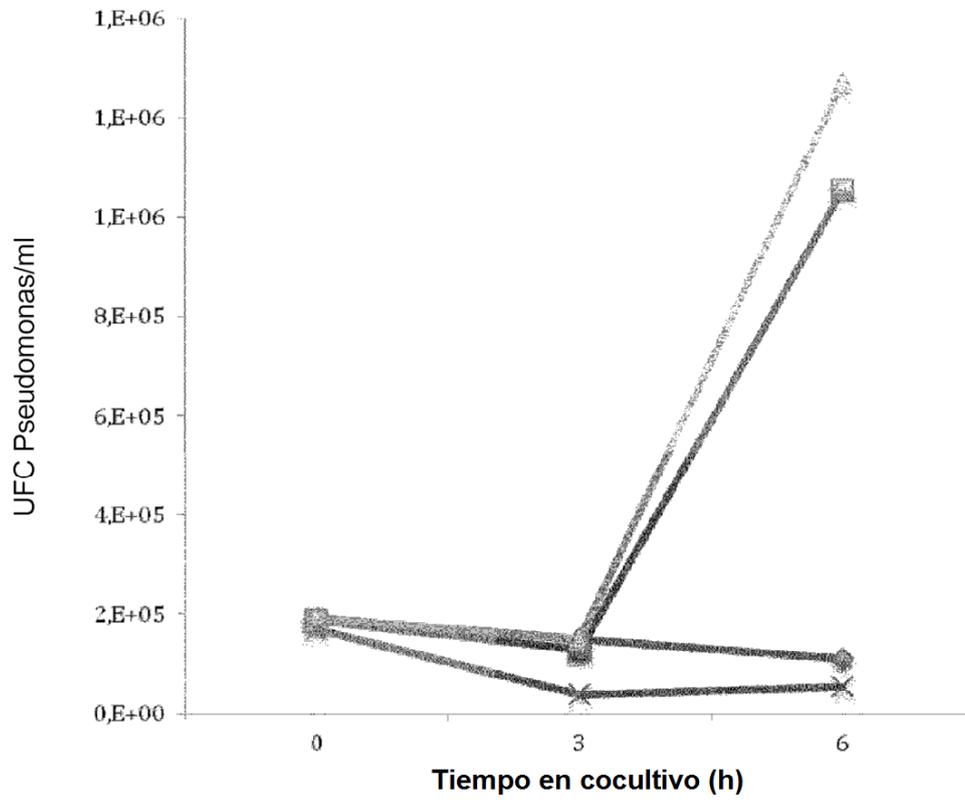


Figura 3.

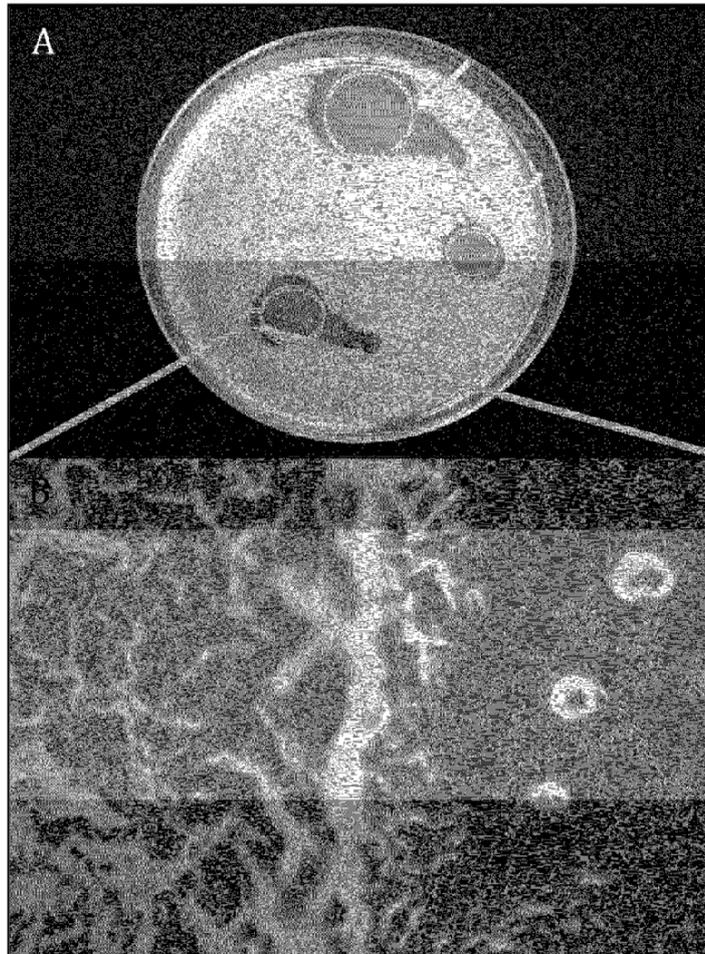


Figura 4.