

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y CAPACIDAD  
PROBIÓTICA BÁSICA DE UNA CEPA NATIVA DE *LACTOCOCCUS LACTIS***

**por**

**Camila MOREIRA GIL**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias**

**ORIENTACIÓN: Higiene, inspección, control y  
tecnología de los alimentos de origen animal**

**MODALIDAD Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2019**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Presidente de Mesa: .....

Dr. Álvaro González

Segundo Miembro (Tutor): .....

Dra. Silvana Carro

Tercer Miembro: .....

Dr. Ariel Aldrovandi

Autor: .....

Br. Camila Moreira

Fecha:

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por el apoyo y palabras de aliento a lo largo de estos años, sin lo cual no hubiese sido posible. A mi abuela, mis hermanos, sobrinos, primas y tíos por el interés y por acompañarme en este proceso.

A Silvana por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por su ayuda en todo momento.

A mis amigas de siempre y a los amigos que me dejó la facultad por estar siempre presentes.

A Álvaro, con quien pude contar siempre en el laboratorio.

A los demás profesores/as, trabajadoras y tesistas del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche.

Al Departamento de Biometría, Estadística y Computación de la Facultad de Agronomía de UdelaR, a Oscar Bentancur y Paulina Siri por su colaboración en los análisis estadísticos.

A CIDEDEC, por la financiación del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Introducción	9
Bacterias ácido lácticas	9
Actividad antimicrobiana	10
Ácidos orgánicos	10
Diacetilo	11
Metabolitos del oxígeno	11
Ácidos grasos	12
Bacteriocinas	12
Clasificación de las bacteriocinas	13
Bacteriocinas y su uso como agentes terapéuticos	14
Biopreservación	15
Probióticos	16
Principales efectos benéficos	17
Resistencia bacteriana a los antibióticos	20
Resistencia antibiótica en <i>Lactococcus lactis</i>	21
Antecedentes	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Cepas bacterianas	24
Evaluación de la sensibilidad/resistencia a diversos grupos de antibióticos de <i>L. lactis</i> GU 967439	24
Determinación de la capacidad de inhibición frente a microorganismos de interés	24
Ensayo de resistencia in vitro de <i>L. lactis</i> simulando el pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)	26
Resistencia a jugos gástricos y pancreáticos	26
Tolerancia a las sales biliares	27
Análisis estadísticos	27
RESULTADOS	28
Sensibilidad antimicrobiana	28
Determinación de la capacidad de inhibición frente a microorganismos de interés	30
Ensayo de resistencia in vitro de <i>L. lactis</i> simulando el pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)	31
DISCUSIÓN	32
Sensibilidad antibiótica	32
Determinación de la capacidad de inhibición frente a	34

microorganismos de interés	
Resistencia in vitro de <i>L. lactis</i> simulando su pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)	35
Tolerancia al tránsito gástrico	35
Tolerancia al tránsito intestinal	36
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	53
Anexo 1. Criterios para clasificar los resultados a diferentes principios antimicrobianos de acuerdo al tamaño de halos (mm) en Resistente (R), Moderadamente sensible (MS) y Sensible (S)	53

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> . Adaptado de Parra (2010).	14
Cuadro 2. Cepas bacterianas utilizadas como indicadores de capacidad antimicrobiana de <i>L.lactis</i> en ensayos de inhibición	25
Cuadro 3. Medias de halos de inhibición (mm) frente a diferentes principios antimicrobianos clasificados en Resistente (R) y Sensible (S) según Anexo 1.	29
Cuadro 4. Valores de mediana de actividad antimicrobiana del SLC de <i>L. lactis</i> : medianas de unidades arbitrarias de actividad por mililitro frente a distintos indicadores (UA/mL)	30
Cuadro 5. Efecto del jugo gástrico a diferentes pH sobre <i>L. lactis</i> evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)	31
Cuadro 6. Efecto de la pancreatina sobre <i>L. lactis</i> evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)	31
Cuadro 7. Efecto de la bilis sobre <i>L. lactis</i> evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)	31
Figura 1. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”	25
Figura 2. Determinación de Unidades Arbitrarias (UA) con halos de inhibición frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC N°6538.	30

## RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, que difieren tanto desde el punto de vista morfológico como filogenético. Se caracterizan por producir ácido láctico como el principal metabolito o único producto de la fermentación. Son los microorganismos más utilizados en el procesamiento de alimentos fermentados. Se han focalizado muchas investigaciones tanto en optimizar la participación de las BAL durante los procesos de elaboración, como en ampliar sus aplicaciones utilizándolas como probióticos. Son definidos como probióticos aquellos microorganismos que al ingerirlos vivos y en cantidad suficiente provocan efectos benéficos en la salud del consumidor más allá de su nutrición inherente. Uno de los primeros criterios de seguridad que se deben controlar en los candidatos a probióticos es la ausencia de resistencias adquiridas a los antibióticos. Además para que las BAL puedan ser consideradas probióticos deben cumplir ciertas características entre las cuales se encuentran la reducción o exclusión de microorganismos patógenos por la producción de sustancias antibacterianas (bacteriocinas, ácidos o peróxido de hidrógeno) y su persistencia y multiplicación en el hospedador. *Lactococcus lactis* GU967439 aislado de leche cruda proveniente de una granja de Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay y *L. lactis* proveniente de American Type Culture Collection (ATCC) N°11454 fueron evaluados *in vitro*, con el objetivo de determinar si son capaces de sobrevivir a condiciones que simulan el pasaje por el tracto gastrointestinal. Para ello, se testeó su resistencia en presencia de ácido, pepsina, pancreatina y bilis. Así también, la producción de bacteriocinas y su acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT *Escherichia coli* ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y su sensibilidad a distintos antibióticos. *L. lactis* GU 967439 fue sensible a todos los antibióticos activos frente a Gram positivos ensayados indicando probablemente no adquirió elementos de resistencia de otras cepas. Además el SLC de *Lactococcus lactis* GU 967439 tuvo actividad antagonista *in vitro* frente a los microorganismos Gram + utilizados como indicadores: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 29213, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 WT y presentó mejor actividad que la cepa *L. lactis* ATCC N°11454. Sin embargo, el SLC de *Lactococcus lactis* GU 967439 no presentó actividad antagonista frente a los microorganismos Gram negativos empleados: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Por último se observó que *Lactococcus lactis* GU 967439 es resistente a la simulación del jugo gástrico a pH 2.5 y 3, pero no a pH 2. *Lactococcus lactis* GU 967439 es capaz de sobrevivir en presencia de pancreatina y bilis.

## SUMMARY

Lactic acid bacterias (LAB) are a heterogeneous group of Gram positive bacterias, which differ from both morphological and phylogenetic points of view. They are characterized by producing lactic acid as the main metabolite or the only product of fermentation. They are the microorganisms most used in the processing of fermented foods. Many investigations have focused both on optimizing the participation of LABs during the manufacturing processes, and on expanding their applications using them as probiotics. Microorganisms that when ingested alive and in sufficient quantity cause beneficial effects on the health of the consumer beyond their inherent nutrition are defined as probiotics. One of the first safety criteria to be controlled in probiotic candidates is the absence of acquired resistance to antibiotics. In addition, for LABs to be considered probiotics, they must meet certain characteristics, among which are the reduction or exclusion of pathogenic microorganisms due to the production of antibacterial substances (bacteriocins, acids or hydrogen peroxide) and their persistence and multiplication in the host. *Lactococcus lactis* GU967439 isolated from raw milk from a farm in Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay and *L. lactis* from the American Type Culture Collection (ATCC) N° 11454 were evaluated in vitro, with the objective of determining whether they are able to survive conditions that simulate the passage through the gastrointestinal tract. For that purpose, it was tested the resistance in presence of acid, pepsin, pancreatin and bile. Likewise, bacteriocins production and its inhibitory action against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT) *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, and sensitivity to various antibiotics was tested. *L. lactis* GU 967439 was sensitive to all active antibiotics against Gram positives tested indicating that it probably did not acquire resistance elements from other strains. In addition, the SLC of *Lactococcus lactis* GU 967439 had antagonistic activity in vitro against the Gram + microorganisms used as indicators: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and 29213, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 WT and presented better activity than strain *L. lactis* ATCC No. 11454. However, the *Lactococcus lactis* GU 967439 SLC did not show antagonistic activity against the Gram negative microorganisms used: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Finally, it was observed that *Lactococcus lactis* GU 967439 is resistant to gastric juice simulation at pH 2.5 and 3, but not at pH 2. *Lactococcus lactis* GU 967439 is able to survive in the presence of pancreatin and bile.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son encontradas en ambientes muy nutritivos como la leche, carne o vegetales. Algunas especies se desarrollan en plantas, mientras que otras forman parte de la microbiota gastrointestinal de animales y humanos (Atanassova y col., 2003). Son los microorganismos más utilizados en el procesamiento de alimentos fermentados (Hladíková y col., 2012).

Muchas investigaciones se han enfocado tanto en optimizar la participación de las BAL durante los procesos de elaboración, como en ampliar sus aplicaciones utilizándolas como probióticos, es decir, microorganismos viables no patógenos que inducen efectos benéficos en el hospedador (O'Sullivan y col., 1992; Aureli y col., 2011). Para poder evaluar las propiedades probióticas de las cepas bacterianas que pueden utilizarse en los alimentos es importante comprobar su actividad *in vitro* (FAO/WHO, 2002).

Las BAL poseen la capacidad de inhibir otros microorganismos debido a la disminución de pH del medio (Daeschel, 1989), la competencia por nutrientes y la producción de sustancias antimicrobianas, siendo ampliamente utilizadas en alimentos fermentados como biopreservantes (Cintas y col., 2001; Yang y col., 2012).

Sin embargo, en los últimos años muchos investigadores han especulado sobre la posibilidad que las bacterias comensales, incluidas las BAL pudiesen actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos, similares a aquellos encontrados en los microorganismos patógenos humanos. El mayor riesgo asociado al uso de estas bacterias, es que pudiesen transferir dichos genes a otros agentes patógenos (Mathur, 2005).

### BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, que difieren tanto desde el punto de vista morfológico como filogenético. Se caracterizan por producir ácido láctico como el principal metabolito o único producto de la fermentación (Axelsson, 2004). Son bacterias no esporuladas, con forma de cocos o bacilos, catalasa negativas, libre de citocromos y tolerantes al ácido y al oxígeno (Atanassova y col., 2003). Pueden crecer en temperaturas entre 5 y 45°C y su pH óptimo de crecimiento es de 5,5 a 6,5. Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales complejos que incluyen aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Vodnar y col., 2010).

Existen dos mecanismos por los cuales las BAL pueden fermentar los azúcares: glucólisis o la vía de glucosa-6-fosfato. Mediante glucólisis se obtiene ácido láctico en un 98% y estas bacterias son denominadas bacterias homolácticas. Algunos ejemplos de éstas son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, y *Lactobacillus plantarum*. Las bacterias que utilizan el camino de la glucosa-6-fosfato, son heterofermentativas y durante la fermentación producen además cantidades

considerables de ácido acético, alcohol etílico, dióxido de carbono y otros subproductos como diacetilo y acetoína. El grupo de bacterias heterofermentativas incluyen algunos lactobacilos como: *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*, así como también *Streptococcus acetoinicus* y todas las especies de *Leuconostoc* (Atanassova y col., 2003; Salminen, 1998).

La mayoría de las BAL asociadas a los alimentos son “generalmente reconocidas como seguras” (“*generally recognized as safe*”: GRAS) por la *Food and Drug Administration* (FDA) (Mathur y Singh, 2005).

Las BAL forman parte de los cultivos iniciadores o *starters* los cuales son preparados de inóculos de bacterias o levaduras que se añaden a la leche o en una de las etapas de la elaboración de los productos lácteos fermentados, denominándose de esa manera debido a que su principal función es que inician la producción de ácido láctico (Hill y Kethireddipalli, 2013). Los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* son los más usados en procesos de fermentación de leche, carne y vegetales (Hladíková y col., 2012). El género *Lactococcus* es uno de los más predominante en los cultivos iniciadores mixtos utilizados en la industria láctea (Jay y col., 2009). *Lactococcus lactis* ssp. *cremonis* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* son cultivos mesófilos, es decir, que el rango óptimo de crecimiento es de 30-35°C (Hill y Kethireddipalli, 2013).

Por más de cientos de años, las BAL han sido de gran interés para los investigadores debido a los efectos benéficos en la salud humana y su habilidad para preservar los alimentos. Mechnikov (1908) fue el primero que relacionó la salud humana con las BAL y descubrió que tenían la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que habitaban el tracto gastrointestinal. Por mucho tiempo, estos hechos fueron subestimados, hasta que en los años 90's luego de varias investigaciones exitosas, algunos científicos se centraron en el rol de las BAL en la salud humana. Estos estudios fueron los que impulsaron a continuar investigando acerca de las propiedades antimicrobianas y probióticas de dichas bacterias (Stoyanova y col., 2012).

La capacidad de las BAL de inhibir otros microorganismos, se debe a la disminución del pH del medio, a la competencia por los nutrientes y a la producción de varias sustancias antimicrobianas (Daeschel, 1989). Varias son las sustancias sintetizadas por BAL que poseen actividad antibacteriana, entre ellas: ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos y péptidos de síntesis ribosomal (denominados bacteriocinas) (Piard y Desmazeaud, 1991; Jay, 1982). La cantidad y tipos de componentes antibacterianos dependen de la posición taxonómica de la bacteria, la composición de los nutrientes del medio y las condiciones de crecimiento (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

### Actividad antimicrobiana

#### Ácidos orgánicos

La característica preservadora de los cultivos iniciadores en los alimentos se atribuye a la acción combinada de diferentes metabolitos antimicrobianos formados durante el proceso de fermentación, como por ejemplo algunos ácidos orgánicos: láctico, acético y propiónico (Caplice y Fitzgerald, 1999). En la fermentación de azúcares se

forma ácido láctico y otros ácidos que provocan la disminución de pH del ambiente, permitiendo así su pasaje a través de las membranas celulares logrando alcanzar el citoplasma de diferentes microorganismos, inhibiendo su crecimiento (Haller y col., 2001).

La cantidad y tipos de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación dependen de las especies de microorganismos, la composición de los cultivos y las condiciones de crecimiento (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Yang, 2000). Los ácidos acético y láctico son los principales metabolitos finales producidos por las BAL durante la fermentación y las concentraciones de los mismos son dependientes de las cepas (Lau y Lion, 2014).

Gerez y col. (2010), evaluaron la actividad antimicótica de BAL y encontraron que la misma estaba relacionada a la producción de ácido láctico, acético y fenil láctico. Por otro lado, Choesri y col. (2013), demostraron que BAL aisladas de un producto a base de pescado fermentado podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas debido a la producción de ácidos orgánicos. En comparación, el ácido acético tiene mayor espectro antibacteriano que el láctico, sin embargo ambos poseen un efecto sinérgico que al combinarlos es posible lograr suprimir por ejemplo, el crecimiento de *Salmonella typhimurium* (Salminen, 1998).

### Diacetilo

El diacetilo es un producto final del metabolismo de las BAL y se forma durante la transformación del citrato mediante la vía del piruvato. Es el componente que le otorga el sabor y aroma característico a la manteca y se encuentra también en otros productos lácteos, bebidas alcohólicas, ensilados y alimentos fermentados (Vandenbergh, 1993; Jay y col., 2009). Dentro de las subespecies de *Lactococcus lactis*, existe la biovariante *diacetylactis*, la cual fermenta el citrato produciendo diacetilo y acetoína (Curioni y Bosset, 2002 citado por Cavanagh y col., 2015). Aunque fue identificado como un componente responsable del sabor de la manteca en el año 1929, su poder antibacterial fue descubierto antes, cuando Lemoigne (1927), comprobó que *Bacillus globigii* y *Bacillus subtilis* eran inhibidos en una concentración determinada de diacetilo, mientras que los mismos microorganismos utilizaban o destruían el compuesto a concentraciones menores. Algunos años después aparecieron varios informes acerca de su acción antibacteriana, y posteriormente, se comprobó la efectividad del diacetilo contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* e incluso algunas BAL (Lévy-Bruhl y Cado, 1936; Hano, 1936; Lemoigne y Monguillon, 1936; Schales, 1951; Myrvik y Volk, 1954; Gupta y col., 1973). Hedgecock y Jones (1950) demostraron que el diacetilo era más efectivo contra bacterias Gram negativas y hongos, que contra bacterias Gram positivas.

### Metabolitos del oxígeno

Las BAL al crecer en medios aerobios producen varios metabolitos del oxígeno, entre ellos, peróxido de hidrógeno, aniones super óxido y radicales libres que poseen efecto bacteriostático y bactericida.

La acumulación de peróxido de hidrógeno en los medios de cultivo se debe a que las BAL, en general, no poseen catalasa, y el mismo funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ADN. En la leche cruda existe el sistema antimicrobiano “lactoperoxidasa”, que si bien posee un poder preservante se reconoce la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos ya que tiene un efecto perjudicial en la calidad sensorial causando rancidez de las grasas, reacciones de decoloración y enverdecimiento (Vásquez y col., 2009).

### Ácidos grasos

Las bacterias ácido lácticas lipolíticas son capaces de producir ácidos grasos antimicrobianos que también contribuyen a la calidad sensorial de los alimentos fermentados (Earnshaw, 1992). Estudios observaron que la actividad antimicrobiana aumentaba con el largo de la cadena de los ácidos grasos (Woolford, 1975). Se descubrió que los ácidos grasos hidroxilados tenían actividad contra un amplio espectro de hongos y levaduras, siendo las últimas más sensibles y además, que presentaban mayor actividad antifúngica aquellos con cadenas de 12 carbonos (Sjögren y col., 2003). La producción de ácidos grasos hidroxilados sigue el crecimiento bacteriano, lo que indica que no son el resultado de la lisis celular. El rol metabólico de estos compuestos y la potencial actividad antifúngica en los ecosistemas naturales no se conoce con claridad (Schnurer y Magnusson, 2005).

### Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos que varían en cuanto a su espectro y mecanismo de acción, peso molecular y sus propiedades fisicoquímicas (Stoyanova y col., 2012). Generalmente están formadas por 30-60 aminoácidos, que poseen actividad bactericida o bacteriostática contra otras especies relacionadas. Son sintetizadas en los ribosomas generalmente de bacterias Gram positivas, y liberadas fuera de la célula (Garneau y col., 2002). Las bacterias productoras de bacteriocinas están protegidas de las mismas por la síntesis de proteínas. Si bien no se conoce con exactitud los mecanismos moleculares mediante los cuales estas proteínas les confieren protección a las bacterias productoras, se han propuesto dos sistemas de protección, los cuales en algunos casos actúan en la misma bacteria (Kleerebezem, 2004). Un sistema sería proporcionado por una proteína específica que secuestra e inactiva a la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura haciéndolo inaccesible a esta última (Venema y col., 1994). El segundo sistema lo constituyen las proteínas de transporte ABC que en algunos casos proporcionan el mecanismo de protección mediante la expulsión de las bacteriocinas que se unen a la membrana (Otto y col., 1998). Se conoce que existe un gen que codifica la producción de bacteriocinas, uno que codifica la proteína que le confiere inmunidad contra la bacteriocina y al menos dos que participan en el sistema de secreción de la misma (Corrieu y Luquet, 2005).

El término bacteriocinogenicidad se define como la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagónicas de otros microorganismos, por lo que se podría deducir que las BAL tienen esta característica bien definida. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa

producida (Moreira, 1993; Feria, 2007). La producción de bacteriocinas se ve condicionada por el pH siendo propuesto por algunos estudios que el pH óptimo para la producción de las mismas es generalmente 5,5 a 6,0 y que sólo algunas pocas bacteriocinas son producidas a pH inferior a 5,0 (Bárcena y col., 1998).

Las bacteriocinas son de gran interés para la industria alimentaria por su potencial aplicación en la preservación de alimentos. Por eso, en ellas se han centrado muchas investigaciones entorno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, espectro de acción y aplicación en la biopreservación de alimentos (Ogunbanwo, 2003; Lade y col., 2006). La nisina, producida por varias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ha sido exitosamente utilizada para aumentar la vida útil y asegurar la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, la demanda por nuevas sustancias antimicrobianas ha continuado creciendo en la industria alimentaria, por lo que es necesaria la determinación y caracterización de sustancias producidas por BAL que poseen dicha propiedad (Stoyanova y col., 2012).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen (Gutierrez y col., 2005).

Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas sustancias proteicas es reducido, generalmente actúan sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles. No obstante, la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas es limitada (Requena y Pelaez, 1995). Por otro lado, se comprobó, que la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente la acción inhibitoria (Hanlin y col., 1993).

### Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son clasificadas basándose en su estructura primaria, pesos moleculares, modificaciones post-traduccionales y características genéticas. Sin embargo, no existe una clasificación adoptada universalmente para su clasificación (Mokoena, 2017). Originalmente se distinguieron cuatro clases que luego fueron modificadas a tres (Liu y col., 2014).

- Clase I: son denominadas lantibióticos y se caracterizan basándose en sus modificaciones post-traduccionales. Las bacteriocinas más representativas de esta clase son la nisina y lactocina. Son extensamente modificadas post-traduccionalmente resultando en la formación de aminoácidos inusuales como lantionina y metillantionina (Parada y col., 2007).
- Clase II: son bacteriocinas pequeñas (<10 kDa), termoestables, péptidos catiónicos no modificados y péptidos hidrofóbicos. Se dividen en dos subclases.
  - Subclase IIa: son péptidos activos especialmente contra listeria y actualmente se ha focalizado su utilización en preservación de alimentos. Como representantes encontramos a la pediocina PA1 y leucocina A (Pérez y col., 2014).

- Subclase IIb: bacteriocinas que requieren de la actividad sinérgica de dos péptidos complementarios para poder ejercer su actividad antimicrobiana. Aunque algunos péptidos de esta subclase, pueden por sí solos desempeñar su actividad antimicrobiana la adición del péptido complementario intensifica su actividad. Los genes que codifican los dos péptidos son genéticamente cercanos y son codificados en el mismo operón. Estas bacteriocinas contienen regiones anfífilicas e hidrofóbicas, y son en su mayoría catiónicas. Ejemplos de ésta son plantaricina A y enterocina X (Hu y col., 2010; Oppegard, 2010; Zacharof y Lovitt, 2012).
- Clase III: antiguamente se designaba a bacteriocinas de alto peso molecular y posteriormente se recomendó que sean consideradas de manera separadas como bacteriolisinas (proteínas líticas) (Klaenhammer, 1993; y Cotter y col., 2005). Sin embargo, dada la existencia de largas bacteriocinas no-líticas parece justificado conservar la Clase III para las grandes bacteriocinas (Acedo y col., 2018). Este grupo contiene bacteriocinas termolábiles (Alvarez-Sieiro y col., 2016) y en comparación a las demás clases no ha sido tan estudiado.
  - Las bacteriolisinas se distinguen por su habilidad para lisar las paredes celulares de la bacteria “blanco” (Alvarez-Sieiro y col., 2016; Acedo y col., 2018 )
  - Las bacteriocinas no líticas son similares a las bacteriolisinas en su tamaño y termoestabilidad pero difieren en su mecanismo de acción (Alvarez-Sieiro y col., 2016; Acedo y col., 2018). La helveticina J es un ejemplo de esta clase (Parada y col., 2007). Se cree que alguna de ellas inhiben la síntesis de ADN y proteínas mediante la prevención de la incorporación de glucosa a macromoléculas celulares (Müller, 1993). Otras apuntan al sistema de transporte de azúcar, previniendo la captura y el metabolismo de glucosa y 2-desoxiglucosa. Aunque no inmediatamente, la falta de carbohidratos eventualmente produce la muerte de la célula “blanco” mediante un mecanismo no – lítico pasivo (Swe y col. 2009)

**Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis*. Adaptado de Parra (2010).**

---

Lactococcina  
Nisina  
Lacticina

---

Bacteriocinas y su uso como agentes terapéuticos

En los últimos años, las bacteriocinas han cobrado gran atención en la medicina puesto que son sustancias activas en concentraciones nanomolares y en general no son tóxicas para las personas, por lo cual se reconocen como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Así mismo, debido a su mecanismo de acción, a su actividad altamente específica y por ser poco proclives a generar resistencia son consideradas especialmente atractivas. Las bacteriocinas han sido utilizadas para combatir infecciones en la piel, orales, respiratorias, gastrointestinales y urogenitales (Van Heel y col., 2011; Hammami y col., 2013).

Sin embargo, la naturaleza de su actividad inhibitoria contra patógenos *in vivo* aún no está del todo clara y son pertinentes mayores investigaciones al respecto. Muchas bacteriocinas producidas por potenciales o ya establecidos probióticos han sido evaluadas por su posible aplicación como agentes terapéuticos en estudios *in vivo* e *in vitro*. Algunos estudios *in vivo* realizados en las últimas décadas señalaron la eficacia de tratamientos contra infecciones en humanos y animales basados en el uso de bacteriocinas (Dabour y col., 2009; Kang y col., 2009). Igualmente, estudios acerca de la farmacocinética y farmacodinamia de los lantibióticos demostraron su gran efecto terapéutico (Van Staden y col., 2012). A pesar de los estudios realizados, siguen siendo necesarias investigaciones acerca de los factores que afectan la supervivencia celular, la producción de bacteriocinas y su actividad para obtener mayor consistencia en los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*. Una de las especulaciones acerca del uso de bacteriocinas como agentes antimicrobianos es la posibilidad de la aparición de resistencia espontánea natural o adquirida, lo que desencadenaría en su ineficacia. Sin embargo, la resistencia a una bacteriocina, no hace que esa cepa lo sea a muchas otras. Sólo aquellas bacteriocinas que comparten un modo de acción podrían perder su efectividad. Según Cintas (2001), el uso de mezclas de bacteriocinas reduce la frecuencia con la que los microorganismos adquieren resistencia.

La pérdida de la actividad *in vivo* de las bacteriocinas por la actividad proteolítica puede convertirse en un impedimento para su uso (Hammami y col., 2013)

Por otro lado, se conoce que la nisina es inestable y presenta baja solubilidad a pH 7, lo que constituye un obstáculo tecnológico en su aplicación como agente terapéutico. Sin embargo, la lacticina 3147 es soluble y activa a pH fisiológico por lo que sería más apropiada para emplear en la clínica. Ambas presentan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana contra la mayoría de bacterias Gram positivas, inclusive contra aquellas beneficiosas del tracto gastrointestinal como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, lo que sería un inconveniente para su aplicación en las enfermedades del tracto gastrointestinal (Rupnik y col., 2009).

La eficacia de la producción *in vivo* de bacteriocinas todavía representa un desafío, a pesar de su actividad altamente específica, debido a bajos niveles de producción e interacciones no específicas con otras moléculas hidrofóbicas (Hammami y col., 2013).

## BIOPRESERVACIÓN

La biopreservación puede ser definida como la extensión de la vida útil de los alimentos, asegurando su inocuidad desde el punto de vista microbiológico utilizando una microbiota natural o controlada y sus productos antimicrobianos (Hugas, 1998). Hoy en día, la industria alimentaria utiliza productos químicos y agentes antimicrobianos para preservar los alimentos que causan alarma en los consumidores debido a posibles efectos tóxicos y posible supresión de la microbiota natural. El uso de las BAL y sus metabolitos que poseen actividad antimicrobiana, son una de las alternativas actualmente más desarrolladas para la conservación de alimentos (Leroy y col., 2006).

Debido a que a las BAL tienen capacidad de producir, entre otras sustancias, bacteriocinas, esto les confiere un gran poder preservador y a su vez son consideradas GRAS, es decir, seguras para la salud humana y animal (Liu y col.,

2011; Silva y col, 2002).

Se han descrito una amplia variedad de sustancias capaces de conservar alimentos, pero sólo un número reducido ha sido aprobado para ser utilizado, debido en gran parte a las estrictas normas de seguridad reguladas por la FDA (*Food and Drug Administration*) y en menor medida a que los compuestos que muestran actividad antimicrobiana *in vitro* no se comportan como tales cuando se añaden a ciertos alimentos (Jay y col., 2009). La nisina fue la primer bacteriocina aislada a partir de la BAL *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos y la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Dosta y col., 2009).

## PROBIÓTICOS

El término probiótico tiene su origen en el griego y significa “a favor de la vida”. Fue utilizado por primera vez por Lilly y Stillwell en el año 1965 para describir sustancias secretadas por microorganismos que estimulaban el crecimiento de otros. Parker (1974), fue quien introdujo el término probiótico en el sentido que se aplica actualmente, definiéndolos como aquellos organismos que contribuyen al balance intestinal. Posteriormente, en 1989, Fuller mejoró el concepto propuesto por Parker, y los definió como microorganismos vivos que empleados como suplemento alimentario en animales afectan benéficamente al hospedador debido a que mejoran el balance de la microbiota intestinal. Luego, en 1992, Havenaar definió a los probióticos como cultivos viables únicos o mixtos que administrándolos a humanos o animales afectan beneficiosamente al huésped ya que mejoran las propiedades de la microbiota nativa. Schaafsma (1996), propuso que los probióticos orales eran microorganismos vivos que tras ser ingeridos en determinada cantidad proveen efectos en la salud, más allá de las inherentes a la nutrición básica.

Los microorganismos considerados probióticos deben cumplir con algunas condiciones para poder efectuar su función protectora, entre ellos, ser habitantes naturales del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, producir compuestos antimicrobianos y ser estables durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que estén disponibles y puedan llegar vivos al intestino (Pardio y col., 1994).

Los probióticos deben ser capaces de mantenerse vivos tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado para poder lograr sus efectos benéficos. Dicha viabilidad está íntimamente relacionada con el método de producción y con el microorganismo adicionado al producto fermentado (Heller, 2001). La viabilidad y funcionalidad de las bacterias probióticas en productos lácteos fermentados pueden variar o ser modificadas por factores tanto microbiológicos como tecnológicos, por lo que deben ser tenidos en cuenta. De hecho, los factores involucrados durante la producción de biomasa de una cepa (pH del medio, disponibilidad, concentración y tipo de fuentes de carbohidratos), los procesos tecnológicos, y la matriz alimentaria en donde los microorganismos son adicionados pueden afectar significativamente su resistencia a las barreras biológicas y su interacción con las células inmunes, condicionando su funcionalidad (Vinderola y col., 2011). Durante su pasaje por el tracto gastrointestinal deben ser capaces de resistir factores estresantes que influyen su supervivencia (Simon y col., 1987; Marteau y col., 1993). Deben poder sobrevivir a las enzimas presentes en la cavidad oral, a la



digestión estomacal (exposición a pH bajo) y a la presencia de bilis en el duodeno (Kimoto-Nira y col., 2010). De esa forma, pueden llegar viables al intestino y en cantidad suficiente donde desempeñan su rol la mayor parte de las bacterias probióticas (Mainville y col., 2004). Por lo tanto, es necesario evaluar la supervivencia *in vitro* de las BAL al pasaje por el tracto gastro intestinal (TGI), previo a ensayos de administración a animales ya que los estudios *in vivo* son muy complejos para realizar como pruebas de *screening* iniciales para la obtención de potenciales probióticos y estudiar su comportamiento en matrices alimentarias (Kimoto-Nira y col., 2010; Mainville y col., 2004). La resistencia al ácido y a la bilis son consideradas propiedades intrínsecas de las BAL. De hecho, en leches fermentadas la estabilidad al ácido es un requerimiento importante durante el proceso de fermentación (Shah, 2001; Ouwehand y col., 2002).

Además, es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de crecer y multiplicarse durante su tránsito por el estómago e intestino delgado, así como adherirse, multiplicarse y colonizar la mucosa del intestino grueso (Salazar y Montoya, 2003). A su vez, son capaces de sintetizar un biosurfactante glicoproteico que favorece la adhesión a las superficies de las células M y/o a las placas de Peyer y de esta manera compiten con otros microorganismos enteropatógenos impidiendo que puedan colonizar el intestino, provocando la estimulación del sistema inmunológico y aumentan así los niveles de algunas inmunoglobulinas en el organismo (Alander, 1999; Reid, 2001). La adhesión de los probióticos al intestino es importante para la modulación inmunológica, la competencia con los microorganismos patógenos, promover la reparación de la mucosa dañada y prolongar la colonización transitoria (Ouwehand y col., 2002).

Por otro lado, cuando estos microorganismos metabolizan carbohidratos sintetizan entre otros, ácido láctico, fórmico, acético, peróxido de hidrógeno, aniones súper óxido y radicales de hidroxilo, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído e isómeros D de aminoácidos. También pueden sintetizar bacteriocinas que tienen acción antimicrobiana que cobran especial relevancia cuando actúan contra microorganismos patógenos (Cintas y col., 2000).

Además, es necesario que los probióticos tengan buenas propiedades tecnológicas para poder utilizarlos a gran escala, tengan una vida útil aceptable y en productos fermentados contribuyan a proporcionar un buen sabor (Ouwehand y col., 2002).

Los probióticos estimulan la función protectora del sistema digestivo, modifican la respuesta inmune local del hospedero y son conocidos también como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos siendo utilizados para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Schiffin y col., 1997; Penna, 1998). También se demostró el efecto benéfico de los probióticos en infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, algunos tipos de cáncer y alergias alimentarias (Mc Farland, 2000; Mombelli y Gismondo, 2000).

### Principales efectos benéficos

La función original de los probióticos ha sido cambiar la composición de la microbiota del intestino, desde una posiblemente dañina a una más beneficiosa para el

hospedador. Más precisamente se trata de reducir las poblaciones de coliformes y clostridios y aumentar la proporción de lactobacilos y bifidobacterias. Esto posiblemente se logre debido a la competencia por nutrientes y los sitios de adhesión, así como por la producción de sustancias antimicrobianas. Si bien este cambio en las proporciones de la microbiota intestinal es favorable para el hospedador, se ha puesto mucho énfasis en esto sin considerar el auténtico beneficio para la salud. Así, para la modulación del sistema inmune, podría no ser necesario obtener grandes modificaciones en la composición de la microbiota intestinal (Ouwehand y col., 2002).

La microbiota intestinal es un componente importante en la barrera de defensa del intestino. Al afectar el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino en edades tempranas, su microbiota dirige la regulación de la respuesta inmune local y sistémica, incluyendo hiporrespuesta a antígenos de microorganismos y alimentos (Ouwehand y col., 2002). En algunas condiciones inflamatorias del intestino se produce un desbalance en la misma que puede inducir una respuesta inmune por las bacterias residentes (Isolauri, 1999). La normalización de esta microbiota mediante cepas específicas benéficas constituye el principal principio en la terapia probiótica. El éxito de la misma se manifiesta por la normalización de la permeabilidad intestinal y la microecología, la mejora de la barrera inmune intestinal y el alivio de la respuesta inflamatoria (Isolauri, 2001).

La prevalencia de enfermedades atópicas ha ido aumentando progresivamente en las sociedades occidentales. Hay una hipótesis que relaciona la atopía a una reducida exposición a microorganismos en edades tempranas (Strachan y col., 1989). Además, se relaciona el establecimiento de la microbiota intestinal con una exposición mayor y más temprana a antígenos. De hecho, se han registrado recientemente diferencias en la microecología intestinal neonatal asociadas al desarrollo de enfermedades atópicas (Kalliomäki y col., 2001).

El rol regulatorio de los probióticos en enfermedades alérgicas fue visto por primera vez cuando se demostró un efecto supresor en la proliferación linfocitaria y en la generación de interleuquina-4 *in vitro* (Sütas y col., 1996). La respuesta inmunoinflamatoria a antígenos dietarios en individuos alérgicos fue aliviada por probióticos lo que puede ser atribuido al aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias como interleuquina-10 (Pessi y col., 2000), factor de crecimiento transformante- $\beta$  (Haller y col., 2000), y particularmente al control de la inflamación alérgica en el intestino (Majamaa y Isolauri, 1997). La disfunción de la mucosa causada por la inflamación, y caracterizada por la alteración en la velocidad, ruta y modo de presentación del antígeno es estabilizada por los probióticos (Isolauri, 2001).

La intolerancia a la lactosa se da por una deficiencia de lactasa o una capacidad reducida de hidrólisis de la lactosa. El dolor abdominal asociado a esta intolerancia no se comprende completamente, pero no parece estar asociado a la producción de gas por la fermentación de la lactosa por la microbiota intestinal (Lasser y col., 1975). Los productos con leches fermentadas son mejor tolerados, esto puede deberse a la presencia de  $\beta$ -galactosidasa en las bacterias responsables de la fermentación. Durante la digestión, las bacterias son lisadas por la bilis en el intestino delgado y la enzima es liberada y degrada la lactosa (Vesa y col., 2000).

La gastroenteritis aguda puede tener una etiología viral o bacteriana. Una de los agentes más comunes que causan diarrea en niños son los rotavirus (Claeson y Merson, 1990). Éstos invaden y se replican en las células diferenciadas encargadas de la absorción del epitelio intestinal lo que lleva a una disrupción de la mucosa con pérdida de microvellosidades, una disminución en la proporción de criptas y el aumento de la permeabilidad intestinal (Salim y col., 1990). Estudios han demostrado que algunos probióticos acortan la duración de la diarrea por este virus (Kaila y col., 1992; Sugita y Togawa, 1994). En el tratamiento de la diarrea por rotavirus se observó el aumento de IgA específica (Kaila y col., 1992), la disminución de la permeabilidad de la mucosa intestinal (Isolauri y col., 1993) y la normalización en la composición de su microbiota (Salminen y col., 1996).

La diarrea asociada al uso de antibióticos suele deberse a un sobrecrecimiento de *Clostridium difficile* y existen algunos estudios que sugieren que la aparición de este cuadro se previene con el uso de ciertos probióticos (Gismondo y col., 1999).

La etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal no se conoce por completo pero se postula que la predisposición genética y la microbiota juegan un rol importante, por lo que la modificación de la esta última podría mejorar esta enfermedad. Se observó que algunos probióticos reducen el número de recidivas y prolongan el período de remisión (Mattila-Sandholm y col., 1999; Hamilton-Miller, 2001).

Si bien la etiología del cáncer colorectal es diversa, se piensa que la dieta está involucrada en ella (Greenwald y col., 2001). Se observó que dietas ricas en proteínas y grasas, y pobres en fibras causan cambios en la microflora intestinal aumentando el número de bacterioides y clostridios, disminuyendo la proporción de bifidobacterias (Benno y col., 1991). El cambio en la composición de la microbiota se asocia a un aumento de la actividad enzimática fecal:  $\beta$ -glucuronidasa, azoreductasa, ureasa y nitroreductasa. Estas enzimas convierten procarcinógenos en carcinógenos lo que contribuye al aumento de riesgo de cáncer colorectal. El consumo de algunos lactobacilos mostró una reducción en la actividad fecal de estas enzimas (Hirayama y Rafter, 2000). Aunque no se ha demostrado, se podría anticipar algún efecto benéfico en bacterias ácido lácticas probióticas en el riesgo de contraer cáncer colorectal (Ouweland y col., 2002).

Varios estudios han demostrado que *Lactococcus lactis* posee un efecto terapéutico frente al cancer colorectal. Li y col. (2005) en sus estudios compararon al *Lactococcus lactis* con una molécula anticarcinogénica encontrando similitud en su efectividad. Además, se ha especulado acerca de que al consumirlo oralmente podría producir un efecto protector frente a la mutagenicidad colónica (Masood y col. 2011). Kim y col. (2003) en su trabajo describieron que *Lactococcus lactis* presenta habilidad para aumentar los niveles de proteína antiproliferativa y disminuir los efectos de la proteína mutagénica.

A su vez, se ha demostrado que los individuos que sufren constipación presentan una modificación de la microbiota fecal con reducción de bifidobacterias, bacterioides y en especial cantidades reducidas de clostridios (Shimoyma y col., 1984). Se ha sugerido que los probióticos alivian la constipación (Goldin, 1998; Lee y col., 1999). Sin embargo, contemplando algunas causas de la misma, como el sedentarismo dietas bajas en fibras, ingesta insuficiente de líquidos y uso de algunas drogas, se podría inferir que la alteración en la composición de la microbiota es una consecuencia más

que su propia causa, por lo que la corrección de la composición de ésta podría no ser ayuda (Ouwehand y col., 2002).

El efecto benéfico de los probióticos en individuos sanos es de crucial importancia ya que suelen ser quienes consumen mayormente estos productos y se relaciona generalmente con la reducción del riesgo de algunas patologías. Otras evidencias muestran que al menos en niños el consumo a largo plazo de probióticos podría reducir el riesgo de infecciones y el uso de antibióticos (Hatakka y col., 2001). Los probióticos suelen ser comercializados como promotores del sistema inmune, sin embargo para personas sanas éste podría no ser el caso ya que su sistema inmune funciona de manera óptima (Spanhaak y col., 1998).

## RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

Aún a principios del siglo XXI, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las causas de muerte más importantes en la humanidad, pese a que su contribución relativa ha ido disminuyendo desde el siglo XIX (Lozano y col., 2012). La llegada de los antibióticos a la práctica clínica en la década cuarenta del siglo XX, es considerada una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población (Alós, 2015).

La resistencia bacteriana se ha definido como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que inhiben o matan a otras de la misma especie. La aparición de este fenómeno desde hace varios años supone una amenaza al deterioro de la eficacia de estos fármacos (Alós, 2015). Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y mayor costo en el tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie (McNulty y col., 2006).

Hay estudios que sugieren a los genes de resistencia de las bacterias ambientales como el principal reservorio de éstos en las bacterias que colonizan e infectan a los humanos (Nesme y col., 2014) y que las secuencias genéticas que movilizan los genes también están presentes en bacterias ambientales, lo que ayuda a la diseminación de los mismos (Forsberg y col., 2012). Además de considerar este origen en la resistencia de bacterias patógenas, se debe contemplar que dichos genes pueden evolucionar una vez que son adquiridos (Alós, 2015). La presión selectiva de los antibióticos por su uso masivo en los últimos 70 años contribuyó a la diversificación genética de los genes de resistencia (Corvec y col., 2013).

Las mutaciones e intercambio horizontal de genes son características de las bacterias que han ocurrido durante millones de años como parte de la evolución (Oliver y col., 2000). Primeramente, alguno de los genes de resistencia de las bacterias, denominados resistomas, deben atravesar elementos genéticos eficaces y mecanismos habituales de transferencia genética principalmente conjugación, pero también transformación y transducción (Alós, 2015). Los antibióticos además de matar a las bacterias sensibles y seleccionar a las resistentes, influyen directamente los mecanismos de variación genética. Promueven intercambios de genes entre bacterias incrementando e induciendo la transferencia de genes de resistencia o desreprimiendo la expresión de genes necesarios para la transferencia

(Baquero, 2009). Las concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden facilitar el proceso de resistencia por ejemplo favoreciendo la transferencia y recombinación genética (Davies y col., 2006).

En los últimos años, se ha focalizado a los alimentos como vehículos de genes de resistencia a los antibióticos (Perreten y col., 1997). El uso frecuente de antibióticos en medicina y como promotores de crecimiento en la cría de animales causó un aumento significativo en la cantidad de cepas resistentes, incluidas las BAL (Zycka-Krzesinska y col., 2015). Lo anterior, junto con el crecimiento bacteriano a alta densidad permite la propagación de la resistencia entre los microorganismos. Las BAL, que forman parte de la microbiota gastrointestinal, son potencialmente vulnerables a adquirir resistencia a los antibióticos. Además, los genes que confieren resistencia pueden ser fácilmente transferidos entre bacterias patógenas, potencialmente patógenas y comensales (Delgado y col., 2005; Mathur y Singh, 2005). Se ha hipotetizado que las bacterias gastrointestinales, incluidas las comensales, podrían ser reservorios de genes de resistencia (Salysers y col., 2004).

### Resistencia antibiótica en *Lactococcus lactis*

Las BAL albergan plásmidos de diferentes tamaños, y algunos determinantes de resistencia a antibióticos han sido reportados en *Lactococcus lactis* y en varias especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Gevers y col., 2003).

*Lactococcus lactis* es usualmente susceptible a los antibióticos activos contra Gram positivos (macrólidos, bacitracina, eritromicina, lincomicina, novobiocina, teicoplanina y vancomicina), a los antibióticos de amplio espectro (rifampicina, spectinomina y cloranfenicol) y a los betalactámicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina, ticarcilina e imipenem). La susceptibilidad a la tetraciclina, cefalotina, nitrofurantoina y a cefotetan es variable. La mayoría de las especies de *Lactococcus* son resistentes al metronidazol, cefoxitina, trimetoprim, a los antibióticos activos contra Gram negativos (ácido fusídico, ácido nalidixílico y a la polimixina B) y a los aminoglucósidos; gentamicina y kanamicina (Flórez y col., 2005; Herrero y col., 1996; Temmerman y col., 2003).

Algunas cepas de *L. lactis* se mostraron resistentes al cloranfenicol, clindamicina, estreptomina, eritromicina y tetraciclina (Flórez y col., 2005; Raha y col., 2002; Temmerman y col., 2003). Se han encontrado determinantes de resistencia a todos estos agentes antimicrobianos en *Lactococcus* (Perreten y col., 1997; y Raha y col., 2002). De hecho, *L. lactis* subsp. *lactis* K214, aislado de queso blando elaborado con leche cruda, contiene al menos tres plásmidos diferentes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos para tetraciclina, cloranfenicol y estreptomina (Perreten y col., 1997).

El aumento en la resistencia a los antibióticos entre los microorganismos ha sido reconocido como uno de los problemas más serios en la salud pública en la Unión Europea (ECDC/EMA, 2009). Por ello, es necesario estimar los niveles de resistencia a los antibióticos de las BAL y evaluar su rol como fuente de genes de resistencia (Zycka-Krzesinska y col., 2015).

## ANTECEDENTES

Actualmente, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria, se desarrollan líneas de investigación en referencia a las bacterias ácido lácticas, por lo que existen en el laboratorio, cepas nativas con potencial bacteriocinogénico, las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de leche y quesos artesanales de la zona de Colonia, Uruguay. Entre estas cepas, se encuentra *Lactococcus lactis* GU967439.

González (2012) comprobó el efecto antilisterial de *Lactococcus lactis* GU967439 *in vitro* y en quesos de tipo Cuartirolo al utilizarlo como cultivo adjunto. Además, observó que su utilización no modificaba sus propiedades sensoriales.

A su vez continuando en este tema, Lorenzo y Raffo (2015), determinaron que las curvas de crecimiento en medio MRS y leche eran similares, evidenciándose la producción de bacteriocinas en ambos, si bien la cinética de producción fue diferente (menor producción en leche). En cuanto a las propiedades tecnológicas concluyeron que *L. lactis* presenta baja actividad acidificante y, baja tolerancia al NaCl y al ácido láctico, así como baja actividad autolítica. A su vez, *L. Lactis* nativo demostró actividad proteolítica, pero no lipolítica. En este mismo trabajo este *L. Lactis*, presentó producción de diacetilo, por lo que se considera a dicha cepa como *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* (Lorenzo y Raffo, 2015).

Posteriormente, Rodríguez (2016) concluyó que el sobrenadante libre de células que contenía la/s bacteriocina/s producida/s por *L. lactis* nativo tendría una identidad diferente a la de la nisina, aunque probablemente se trate de un lactibiótico. Además concluyó que a lo largo del tiempo la bacteriocina contenida en el SLC va perdiendo su actividad independientemente del método de conservación (refrigerada, congelada o liofilizada).

Por último, Hernández (2019) determinó la presencia del gen de la nisina en el genoma de *Lactococcus lactis* GU967439 y el espectro de masas reveló una señal similar al de la nisina Z.

Para continuar con esta línea de investigación, consideramos importante determinar su resistencia a antibióticos, ya que representa un problema relevante en la salud pública a nivel mundial. Así mismo, nos propusimos evaluar la capacidad de esta BAL nativa de inhibir algunos microorganismos de interés, como por ejemplo: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus bovis* y *Listeria innocua*.

## **HIPÓTESIS**

*L. lactis* GU 967439 presenta actividad antimicrobiana frente a patógenos evaluados en este estudio, baja resistencia antibiótica y cualidades básicas probióticas.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar actividad antimicrobiana, resistencia a antibióticos y pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) mediante ensayos *in vitro* de *L. lactis* GU 967439

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar sensibilidad/resistencia de *L. lactis* GU967439 a 34 antibióticos de distintas familias
- Determinar la capacidad de esta BAL nativa de inhibir microorganismos de interés: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT) *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Ensayar la resistencia *in vitro* de *L. lactis* simulando el pasaje por el TGI determinando su viabilidad en medios ácidos, en presencia de enzimas y sales biliares

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS

Para dar cumplimiento al objetivo planteado se utilizaron *Lactococcus lactis* GU967439 y la cepa de referencia, *American Type Culture Collection* (ATCC) N° 11454 de *L. lactis*, los cuales se mantuvieron congelados en caldo MRS (HiMedia®, India) suplementado con glicerol al 15% (v/v) a -20°C en el Laboratorio. Previamente a los ensayos se reactivaron en MRS y se realizaron dos repiques *overnight* sucesivos en MRS a 30 °C, en condiciones de microaerofilia (Rodríguez, 2016).

### EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD/RESISTENCIA A DIVERSOS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS DE *L. LACTIS* GU 967439

La susceptibilidad de *L. lactis* nativo y *L. lactis* ATCC N°11454 fue determinada mediante el método de difusión de Kirby–Bauer con algunas modificaciones (Ture y Boran, 2015). Los discos Oxoid utilizados contenían los siguientes antibióticos (microgramos/disco): penicilina (10 U), ampicilina (10 µg), piperacilina (100 µg), carbenicilina (100 µg), amoxicilina y clavulánico (30 µg), cefalotina (30 µg), cefradina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefoperazona (75 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), teicoplanina (30 µg), ampicacina (30 µg), gentamicina (120 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg), estreptomycin (10 µg), tobramicina (10 µg), telitromicina (15 µg), doxiciclina (30 µg), linezolid (30 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), ac. nalidixílico (30 µg), moxifloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), pefloxacina (5 µg), colistin (10 µg), eritromicina (5 µg), vancomicina (5 µg) y tetraciclina (30 µg).

Se obtuvieron colonias aisladas, de las placas de MRS agar con las dos cepas de *L. lactis*: nativo (GU967439) y de referencia (ATCC N°11454) las que fueron suspendidas en diluyente estéril: NaCl 0,85%, de manera de ajustar la concentración bacteriana a una densidad similar a 0,5 de la escala Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL aproximadamente). Las suspensiones bacterianas ajustadas, fueron inoculadas utilizando hisopos estériles en placas que contenían *Müller-Hinton* agar (HiMedia®, India). Posteriormente, los discos con antibiótico fueron depositados sobre las placas, en forma aséptica con pinzas estériles, para luego incubarlas a 30°C en aerobiosis, durante 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición en milímetros incluyendo el diámetro de los discos de antibióticos y se clasificaron en resistentes, moderadamente sensibles y sensibles según directrices del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007, 2012), Charteris y col. (1998a), Centinkaya y col. (2012), Khemariya y col. (2013), Haghshenas y col. (2014), y Ture y Boran (2015) presentados en Anexo 1.

### DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN FRENTE A MICROORGANISMOS DE INTERÉS

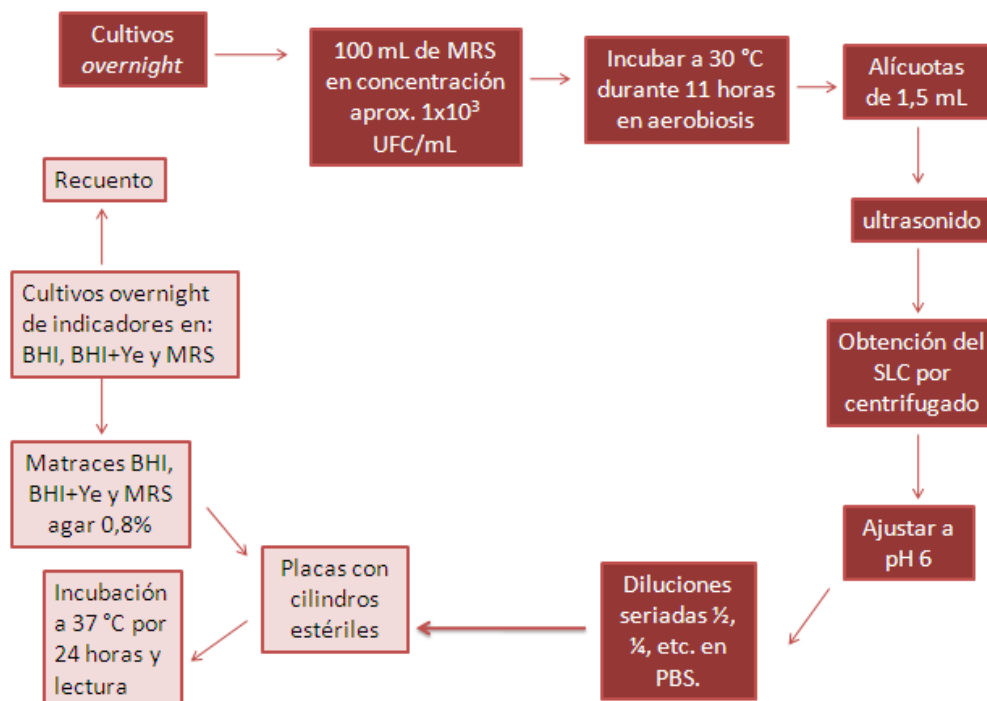
Se estudió la capacidad de inhibición de las cepas en estudio frente a los microorganismos mencionados en el Cuadro 2. La producción de bacteriocinas, y su capacidad para inhibir el crecimiento de los microorganismos se realizó mediante el método de “Agar well diffusion”, Figura 1 (Fraga y col., 2008).



## Cuadro 2. Cepas bacterianas utilizadas como indicadores de capacidad antimicrobiana de *L.lactis* en ensayos de inhibición

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538  
*Staphylococcus aureus* ATCC 29213  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212  
*Listeria innocua* ATCC 33090  
*Streptococcus bovis* 2.5 Wild Type(WT)\*  
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

\*Aislamiento obtenido en IIBCE



**Figura 1. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”**

### Obtención del SLC

En primera instancia, se obtuvieron cultivos *overnight* (30°, microaerofilia, 18 horas) de ambas cepas de *L. lactis* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Luego se obtuvieron diluciones seriadas en cada caso, para así inocular 1 mL en un matraz que contenía 100 mL de caldo MRS (HiMedia®, India) obteniéndose una concentración aproximada de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, posteriormente se incubó a 30°C durante 11 horas en aerobiosis. Para confirmar que la concentración obtenida en el matraz fuera la deseada se sembraron gotas en superficie de diluciones en placas que contenían MRS agar (Miles y Misra, 1938; Sharpe y Kilsby, 1971), incubándose a 30°C, durante 24 horas en microaerofilia, para su posterior recuento.

Posteriormente, se obtuvieron alícuotas de 1,5 mL en tubos tipo *ependorf* estériles los cuales fueron tratados con ondas de ultrasonido (Jeken®, Digital Ultrasonic

Cleaner PS-06<sup>a</sup>, 50W, 40 kHz, 160 segundos) para favorecer así la liberación de bacteriocinas adsorbidas a las células productoras (Rodríguez, 2016).

Por último, el sobrenadante libre de células (SLC) se obtuvo centrifugando los cultivos a 10000 RMP durante 15 minutos a 4°C y se ajustó a pH 6 con NaOH 1M para eliminar el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos.

Se obtuvieron diluciones seriadas de cada SLC: ½, ¼, 1/8, 1/16, 1/32, etc., con solución buffer fosfato estéril (PBS, 10mM pH 7) las cuales fueron depositadas posteriormente en las placas con medio de cultivo inoculado con los microorganismos indicadores presentes en el Cuadro 1. Se expresó la producción de bacteriocinas en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) definidas como e inverso de la dilución mas alta que presentó halo de inhibición de crecimiento (Schillinger y Lücke, 1991).

#### Preparación de las placas con medio de cultivo inoculado

Por otra parte, se obtuvieron cultivos *overnight* de cada uno de los microorganismos indicadores, y se diluyeron para luego inocularlos en matraces que contenían 50mL de medio de cultivo (BHI, BHI+Ye y MRS adicionados con agar 0.8%) fundido y templado a 45°C de manera tal de obtener en cada placa 25mL de cultivo y una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL del microorganismo.

Para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se utilizó como medio BHI para *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se utilizó BHI+Ye y para *Streptococcus bovis* 2.5 WT se utilizó MRS.

Para comprobar la concentración se realizaron recuentos de dichos cultivos *overnight* en los mismos medios mencionados anteriormente con una concentración de agar mayor: 1.5%.

Se colocaron en placas de Petri cilindros metálicos estériles de 10 mm de diámetro, en las que se depositaron los correspondientes medios de cultivo previamente fundidos y atemperados con los cultivos indicadores ya mencionados. Una vez que los diferentes medios solidificaron, se retiraron asépticamente los cilindros metálicos, resultando así “pocillos”, en los que posteriormente se depositaron 100 µl de SLC. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37°C durante 24 horas.

Se efectuaron controles con dos pocillos en donde se colocaron: 100µL de Nisina (Nisaplin®, Danisco) en una concentración de 100 mg/mL como control positivo y un segundo control con el mismo volumen de MRS ajustado a pH 6 con NaOH 1M como control negativo.

#### ENSAYO DE RESISTENCIA *IN VITRO* DE *L. LACTIS* SIMULANDO EL PASAJE POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL (GI)

##### Resistencia a jugos gástricos y pancreáticos.

Para comprobar la tolerancia a los jugos gástricos y pancreáticos se realizó la metodología de acuerdo a Charteris y col., (1998b) con algunas modificaciones (Monteagudo - Mera y col., 2012).

La simulación del jugo gástrico se realizó suspendiendo pepsina porcina (Sigma, USA) en solución fisiológica salina (NaCl, 0,5%, p/v) a una concentración final de 3 g/L, ajustando el pH a 2,0, 2,5, y 3,0 con HCl 5M. El jugo pancreático fue preparado suspendiendo pancreatina (Sigma, USA) en una solución salina estéril (0,5% NaCl, p/v) a una concentración final de 1 g/L y ajustando el pH a 8,0 con NaOH 5M.

Se obtuvieron cultivos *overnight* (18 horas, 30° en microaerofilia) para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, de *L. lactis* en caldo MRS (HiMedia®, India) para obtener una concentración de, se tomaron alícuotas de 1,0 mL en tubos tipo *ependorf* estériles, los que se centrifugaron (10000 RPM, 10 minutos, 4°C) y lavaron 2 veces con PBS (10Mm, pH 7). Los *pellets* de células fueron resuspendidos en 0,3 mL de NaCl (0,5% p/v) y se les adicionó 1 mL de solución de gástrica o pancreática. Las soluciones se incubaron en baño María a 37° durante 120 minutos para el jugo gástrico y 240 minutos para el jugo pancreático. Para confirmar la concentración inicial y conocer la final se realizaron recuentos de células viables en MRS agar.

#### Tolerancia a las sales biliares

Para evaluar la tolerancia a las sales biliares se utilizó el método propuesto por Maragkoudakis y col. (2006) modificado por Fernández y col. (2018). Se obtuvieron cultivos *overnight*, fueron centrifugados y “lavados” de la misma manera que para el ensayo anterior para ser posteriormente resuspendidos en 5 mL de MRS suplementado con 0,3% de bilis bovina (Sigma, USA) con el objetivo de obtener una concentración aproximada de  $2 \times 10^7$  UFC/mL. Las mezclas se incubaron a baño María a 37°C por 240 minutos. Se tomaron alícuotas (0,1 mL) de cada cultivo previo a la incubación y luego de la misma para realizar recuento de células viables en MRS agar.

Para conocer el nivel de resistencia se realizaron recuentos iniciales y finales y se compararon restando los log finales frente a los iniciales. Se considerará resistente cuando la disminución en la viabilidad fuese menor a 3 ordenes de magnitud.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para conocer si existían diferencias significativas entre los halos de inhibición de *L. lactis* GU967439 y ATCC N°11454 para los antibióticos *testeados* se utilizó el test de Welch debido a la falta de homogeneidad de las varianzas.

De la misma manera, para determinar si existían diferencias significativas entre los logaritmos de los recuentos de células viables entre los tiempos iniciales y finales luego de los tratamientos que simulaban el pasaje por los diferentes compartimientos del tracto gastrointestinal, se empleó el test de Welch y el test de Student de 2 colas en casos de heterocedasticidad y homocedasticidad respectivamente.

Para establecer si existen diferencias significativas en las medianas de la actividad antimicrobiana de ambos *L. lactis* y en cuanto al efecto del ultrasonido se realizó el test de Mann whitney.

En todos los casos se utilizó  $\alpha=0.05$ , y los ensayos se realizaron por triplicado en tres momentos diferentes.

## **RESULTADOS**

### **SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

En el Cuadro 3, se muestran las medias de tres repeticiones realizadas de los halos de inhibición (mm), incluyendo el diámetro de los discos de antibióticos. Los resultados obtenidos fueron clasificados en: resistentes (R), moderadamente sensibles (MS) y sensibles (S) según el Anexo 1. Presentan un asterisco los casos en la diferencia entre la media de ambos halos fue significativa.

**Cuadro 3. Medias de halos de inhibición (mm) frente a diferentes principios antimicrobianos clasificados en Resistente (R) y Sensible (S) según Anexo 1.**

	$\bar{x} \pm DE$ ATCC N°11454	$\bar{x} \pm DE$ GU967439
Penicilina (10U)	29,67 ±3,06 <b>S</b>	29,33 ±1,16 <b>S</b>
Ampicilina(10 µg)	30,67 ±2,08 <b>S</b>	28,67 ±0,58 <b>S</b>
Piperacilina (10 µg)	25,67 ±1,53 <b>S</b>	24,67 ±1,16 <b>S</b>
Carbenicilina (100 µg)	30,33 ±1,53 <b>S</b>	28,667 ±1,16 <b>S</b>
Amoxy/clavulan (30 µg)	30,67 ±1,16 <b>S</b>	29,67 ±1,53 <b>S</b>
Cefalotina (30 µg)	27,33 ±0,58* <b>S</b>	21,33 ±1,16* <b>S</b>
Cefradina (30 µg)	21,67 ±0,58* <b>S</b>	18,67 ±1,16* <b>S</b>
Cefuroxime (30 µg)	32,67 ±0,58* <b>S</b>	31,67 ±0,58* <b>S</b>
Cefepime (30 µg)	31,33 ±0,58 <b>S</b>	32,00 ±2,00 <b>S</b>
Cefotaxime (30 µg)	30,33 ±2,08 <b>S</b>	29,00 ±1,00 <b>S</b>
Ceftazidime (30 µg)	24,33 ±1,16 <b>S</b>	20,00 ±2,00 <b>S</b>
Cefoperazona (75 µg)	26,67 ±1,53 <b>S</b>	24,67 ±1,53 <b>S</b>
Imipenem (10 µg)	34,33 ±0,58* <b>S</b>	32,00 ±1,00* <b>S</b>
Aztrionam (30 µg)	0±0 <b>R</b>	0±0 <b>R</b>
Teicoplanim (30 µg)	18,33 ±0,58 <b>S</b>	19,33 ±3,22 <b>S</b>
Amikacina (30 µg)	13,67 ±0,58 <b>S</b>	15,67 ±1,53 <b>S</b>
Gentamicina (120 µg)	20,00 ±1,00 <b>S</b>	20,33 ±0,58 <b>S</b>
Kanamicina (30 µg)	15,67 ±0,58* <b>S</b>	17,67 ±0,58* <b>S</b>
Estreptomycin (10 µg)	9,33 ±0,58* <b>R</b>	10,33 ±0,58* <b>R</b>
Tobramicina (10 µg)	13,00 ±0,00* <b>S</b>	14,67 ±0,58* <b>S</b>
Doxiciclina (30 µg)	30,67 ±1,53* <b>S</b>	26,00 ±1,00* <b>S</b>
Linezolid (30 µg)	27,67 ±1,16* <b>S</b>	23,00 ±1,00* <b>S</b>
Clindamicina (2 µg)	25,67 ±1,16* <b>S</b>	21,67 ±1,16* <b>S</b>
Cloranfenicol (30 µg)	25,67 ±0,58 <b>S</b>	22,00 ±1,73 <b>S</b>
Moxifloxacina (5 µg)	23,67 ±1,53 <b>S</b>	21,00 ±1,00 <b>S</b>
Levofloxacina (5 µg)	22,33 ±1,53 <b>S</b>	20,67 ±2,08 <b>S</b>
Pefloxacina (5 µg)	16,67 ±1,16 <b>S</b>	15,00±1,00 <b>S</b>
Colistin (10 µg)	0±0 <b>R</b>	0±0 <b>R</b>
Eritromicina (15 µg)	26,33 ±3,22 <b>S</b>	22,00 ±2,00 <b>S</b>
Vancomicina (5 µg)	14,33 ±0,58 <b>S</b>	13,00 ±1,00 <b>S</b>
Telitromicina (15 µg)	37,33 ±1,16* <b>S</b>	25,33 ±0,58* <b>S</b>
Neomicina (30 µg)	28,33 ±1,53 <b>S</b>	22,67 ±3,22 <b>S</b>
Tetraciclina (30 µg)	32,67 ±1,16 <b>S</b>	26,00 ±2,65 <b>S</b>
Ac. Nalidixílico (30 µg)	0±0 <b>R</b>	0±0 <b>R</b>

$\bar{x}$ : Media

DE: desvío estándar.

R: Resistente.

S: Sensible.

\*: p<0,05

## DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN FRENTE A MICROORGANISMOS DE INTERÉS

En el Cuadro 4, se muestra la actividad inhibitoria expresada en las medianas de UA/mL del SLC de ambas cepas de *L. lactis*, frente a cada microorganismo indicador.

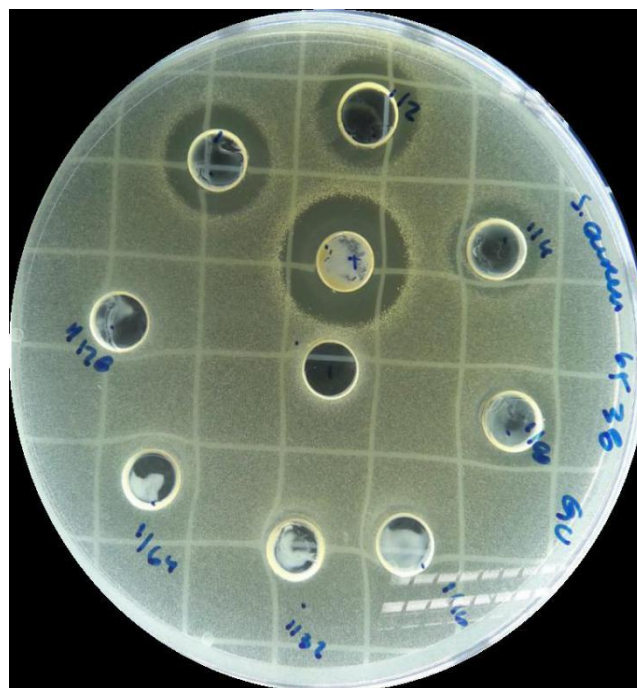
**Cuadro 4. Valores de mediana de actividad antimicrobiana del SLC de *L. lactis*: medianas de unidades arbitrarias de actividad por mililitro frente a distintos indicadores (UA/mL)**

Indicador	$\tilde{x}$ GU967439	$\tilde{x}$ ATCC N°11454
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	320*	20*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	320*	10*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	160*	0*
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	640*	80*
<i>Streptococcus bovis</i> Cód. 2.5* (WT)	640*	10*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	0

$\tilde{x}$ : Mediana

\*:  $p < 0,05$

Se encontraron diferencias significativas entre las medianas de la actividad del SLC de *Lactococcus lactis* GU967439 y la de *L. lactis* ATCC 11454 para todos los indicadores.



**Figura 2. Resultado de actividad antimicrobiana expresada en Unidades Arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) con halos de inhibición del SLC de *Lactococcus lactis* nativo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538.**

## ENSAYO DE RESISTENCIA *IN VITRO* DE *L. LACTIS* SIMULANDO EL PASAJE POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL (GI)

En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos del efecto de la simulación de los jugos gástricos con diferentes valores de pH (3,0, 2,5, 2,0) en la viabilidad de ambas cepas de *L. lactis* durante 120 minutos de incubación. Se expresan en el cuadro la diferencia de los recuentos (log10) inicial y final luego del tratamiento, y se encuentran marcados con asterisco los casos en que se observaron diferencias significativas.

### Cuadro 5. Efecto del jugo gástrico a diferentes pH sobre *L. lactis* evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)

Cepa	Resistencia a pepsina 3g/L a pH 3 por 2 horas <sup>a</sup>	Resistencia a pepsina 3g/L a pH2,5 por 2 horas <sup>a</sup>	Resistencia a pepsina 3g/L a pH 2 por 2 horas <sup>a</sup>
<i>L.lactis</i> ATCC11454	0.6	2.07*	4.0*
<i>L.lactis</i> nativo	0.48	3.14*	4.77*

<sup>a</sup> Disminución de células viables (log 10 inicial UFC – log 10 final UFC )

\*p<0,05

En los Cuadros 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad de ambas cepa de *L. lactis* tras 240 minutos de incubación con los jugos pancreáticos simulados y MRS adicionado con bilis bovina al 0.3%. Al igual que para la evaluación de la tolerancia a los jugos gástricos, se muestra la diferencia de los recuentos (log10) inicial y final luego del tratamiento.

### Cuadro 6. Efecto de la pancreatina sobre *L. lactis* evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)

Cepa	Resistencia a pancreatina 1g/L por 4 horas <sup>a</sup>
<i>L.lactis</i> ATCC11454	0.3
<i>L.Lactis</i> GU	0.25

<sup>a</sup> Disminución de células viables (log 10 inicial UFC – log 10 final UFC ) ;

### Cuadro 7. Efecto de la bilis sobre *L. lactis* evidenciado por el recuento de células viables (log UFC/ mL)

Cepa	Resistencia a 0.3% bilis por 4 horas <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i> ATCC11454	0.56
<i>L. lactis</i> GU	0.25

<sup>a</sup> Disminución de células viables (log 10 inicial UFC – log 10 final UFC ) ;

## DISCUSIÓN

### SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Han sido relativamente pocos los estudios que han investigado las resistencias adquiridas a los antibióticos en las BAL de origen alimentario. La mayoría de la información disponible es acerca de patógenos oportunistas enterococos, mientras que los reportes acerca de lactobacilos y lactococos es limitada (Mathur y Singh, 2005).

En este trabajo, ambos *L. lactis*: ATCC N° 11454 y GU 967439 fueron sensibles a 31 antibióticos, resistentes a 3 y además ambos mostraron el mismo patrón de sensibilidad. Fueron sensibles a la amikacina, penicilina, ampicilina, piperacilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas de primera generación: cefalotina y cefradina, neomicina y a la amoxicilina con ácido clavulánico, lo cual coincide con diversos autores (De Fabrizio y col., 1994; Bakir, 2011; Coplu y col., 2012). También fueron susceptibles a la cefuroxima, cefoperazona, doxiciclina, linezolid, carbenicilina, imipenem, gentamicina, tobramicina, levofloxacina, moxifloxacina, pefloxacina, vancomicina y telitromicina. En cuanto a cefepima, cefotaxima, ceftazidima, kanamicina, clindamicina y teicoplanin, también fueron sensibles, aunque en otros trabajos se ha demostrado resistencia de otras cepas de la especie, lo que indica que *L.lactis* nativo no ha adquirido resistencias a estos antibióticos (Coplu y col., 2012; Khemariya, 2013).

En cuanto a resistencia ambos presentaron frente a: ácido nalidixílico, colistin y estreptomina concordando con otros estudios (Coplu y col., 2012; Khemariya, 2013) y también al aztreonam.

Las quinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Han evolucionado y se han convertido en una de las clases más efectivas de fármacos para combatir las enfermedades infecciosas (Piddock, 1994). Las de primera generación, como es el caso del ácido nalidixílico, tienen actividad sobre bacilos Gram negativos, siendo inactivas frente a Gram positivos y anaerobios, limitando generalmente su uso a infecciones del tracto urinario (Martínez y Calvo, 2008). Su espectro de acción explica la resistencia de *Lactococcus lactis* GU 967439 y ATCC N°11454 al ácido nalidixílico. Por su parte, las de segunda generación: norfloxacina, ciprofloxacina pefloxacina son llamadas fluoradas, ya que incorporan un átomo de flúor y presentan mayor actividad sobre Gram negativos, moderada actividad sobre Gram positivos, son activas sobre gérmenes atípicos y no presentan actividad sobre anaerobios. Las de tercera generación: levofloxacina, presentan actividad sobre Gram negativos, con mejor actividad sobre Gram positivos y presentan muy buena actividad sobre microorganismos atípicos, alcanzando al espectro de las bacterias ensayadas en el presente estudio. Las de cuarta generación: moxifloxacina y trovafloxacina mantienen actividad sobre Gram negativos, aumentan la actividad sobre Gram positivos y agregan actividad sobre microorganismos anaerobios (Seija y Vignoli, 2008). En este trabajo se vió que ambos *L. lactis* fueron sensibles a las quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación utilizadas.



La colistina es un polipéptido cíclico perteneciente al grupo de las polimixinas, que debido a sus propiedades tensoactivas tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de la pared de las bacterias Gram negativas sensibles, que presentan una capa externa conformada por lipopolisacáridos (LPS) (Vidal Group Drug Information Systems, 2014; Landersdorfer y Nation, 2015). El espectro antimicrobiano comprende bacterias Gram negativas aerobias, como las enterobacterias, y bacilos Gram negativos no fermentadores. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que hay patógenos naturalmente resistentes a colistina dentro de estos grupos. Además, anaerobios y cocos Gram positivos, como los evaluados en este estudio, no son sensibles a la colistina (MacLaren y Spelman, 2012).

El aztreonam, monobetalactámico, presenta excelente actividad contra bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, pero carece de actividad frente a Gram positivos y anaerobias (Seija y Vignoli, 2008) justificándose así su inactividad contra *L. lactis*.

Los aminoglucósidos son activos generalmente frente a la mayoría de especies de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. En el presente trabajo fueron sensible a la amikacina, gentamicina, kanamicina, tobramicina y neomicina, y resistente a la estreptomycinina.

Se reconoce que los antibióticos cumplen un papel importante en la reducción de la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones bacterianas y poseen un impacto significativo en el éxito de la medicina. Además del rol terapéutico también utilizado en la medicina veterinaria y en la agricultura, los antibióticos han sido empleados como agentes profilácticos y promotores del crecimiento (Ammor y col., 2007). No obstante, su uso indiscriminado ha afectado significativamente el ambiente de las bacterias y ha conducido a la selección de nuevas cepas resistentes incluyendo a las bacterias ácido lácticas, en las que se han detectado resistencias desde los 1980s (Han y col., 2015).

Las BAL han adquirido el *status* de *GRAS* y son utilizadas como cultivos iniciadores en procesos de fermentación de diferentes alimentos (Zycka-Krzyszowska y col., 2015; Mathur y Singh, 2005).

De acuerdo al hábitat y a su extenso uso en el ámbito alimentario *L. lactis subsp. lactis* y *L. lactis subsp. cremoris* han sido incluidas en la lista QPS (Qualified Presumption of Safety), puesto que los lactococos provenientes y utilizados en la industria láctea son generalmente sensibles a la mayoría de los antibióticos de uso clínico (Leuschner y col., 2010; EFSA, 2013). Por ello, los residuos de los mismos presentes en la leche pueden inducir fallas en los cultivos *starters*. Sin embargo, son bien conocidos por intercambiar material genético de forma intra e intergenérica y por lo tanto existe la probabilidad de propagar resistencia a los antibióticos (Morelli y col., 2004).

De hecho, varios investigadores han especulado sobre la posibilidad de que las BAL aisladas de alimentos podrían actuar como reservorios de genes de resistencia que pudiesen ser transferidos a otros microorganismos patógenos tanto en la cadena alimentaria como en el tracto gastrointestinal de personas y animales (Rojo-Bezares y col., 2006; Flórez, 2007; Walther y col., 2008; Liu y col., 2009; Khemariya y col., 2013). Flórez (2005) y Herreros (2005) propusieron que la transferencia de resistencia a antimicrobianos es un mecanismo común en *L. lactis*. Flórez (2007), demostró que en la cepa *L. Lactis* K214, proveniente de un queso fresco elaborado

con leche cruda, se encontraba un plásmido (pK214) que porta tres genes de resistencia a antibióticos: estreptomina, cloranfenicol y tetraciclina, siendo idénticos a otros caracterizados anteriormente en *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes* (Perreten y col., 1997). Debido a lo propuesto anteriormente, es sustancial que las BAL previo a su utilización en alimentos sean evaluadas para descartar la presencia de resistencias y así confirmar que su uso sea seguro.

En los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que tanto *L. lactis* GU967439 como ATCC 11454 son sensibles a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica. Si bien en varios casos se encontraron diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición entre *L. lactis* nativo y de referencia, para ninguno de los casos representó un cambio efectivo en la categorización de la sensibilidad.

#### DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN FRENTE A MICROORGANISMOS INDICADORES DE INTERÉS

El SLC de *Lactococcus lactis* GU967439, fue capaz de inhibir todos microorganismos Gram positivos utilizados como indicadores y mostró mejor actividad que *L. lactis* ATCC N° 11454. Además, se observaron títulos más altos de actividad del *L. lactis* nativo frente a *Listeria innocua* ATCC N°33090 y *Streptococcus bovis* Cod. 2.5 (WT).

Lorenzo y Raffo (2015) evidenciaron la producción de diacetilo por *L. lactis* nativo permitiendo su identificación a nivel de subespecie como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Rodríguez (2016) buscó caracterizar el SLC de *Lactococcus lactis* GU967439 mediante el tratamiento con enzimas y calor. En su estudio observó cierta resistencia a las proteasas, característica que suele estar presente en lactobióticos ya que al sufrir grandes modificaciones post traduccionales son altamente resistentes a la acción de estas enzimas proteolíticas (Willey y col. 2007 citado por Rodríguez). Por lo que especuló que la actividad antimicrobiana presente en el SLC se debe mayoritariamente a la acción de un lactibiótico (Rodríguez, 2016). En cuanto a la estabilidad térmica, observó que la bacteriocina presente en el SLC pierde actividad tras ser expuesta a 100°C durante 5 minutos, mientras que estudios postulan que la nisina se mantiene activa durante 10 minutos a la misma temperatura (Hurst, 1981; Martín, 2002; Rodríguez, 2016). Rodríguez (2016), además observó que la bacteriocina presente en el SLC presenta mejor actividad a pH neutro, comportándose de manera diferente a la nisina que presenta mejor actividad a pH bajo.

Posteriormente, Hernández (2019) detectó mediante PCR la presencia del gen de la nisina en el genoma de *L. lactis* nativo y a su vez, el espectro de masas reveló una señal similar a la de la nisina Z, por lo que se concluye que es productor de nisina Z.

Por todo lo anterior, podemos concluir que *L. lactis* GU967439 presenta mejor actividad antimicrobiana que *L. lactis* ATCC N°11454 frente a los patógenos ensayados en el presente estudio debido a que el primero produce más de un compuesto con actividad antimicrobiana.

Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de las bacteriocinas es reducido, siendo activas generalmente frente a microorganismos relacionados taxonómicamente (Requena y Pelaez 1995). Generalmente, las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas no son activas frente a bacterias Gram

negativas, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Esto se debe a la diferencia en la composición de la membrana celular de bacterias Gram positivas y negativas. La nisina, producida por varias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* presenta actividad inhibitoria frente a microorganismos como *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Salmonella* pero el efecto no se observa, a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de estos microorganismos, con tratamientos como un choque osmótico o tratamiento con EDTA (Stenvens y col., 1991). Sin embargo, según Klaenhammer (1993) el espectro de actividad de algunas bacteriocinas, tal como la nisina, no estaría restringido a especies taxonómicamente relacionadas ni a bacterias pertenecientes al mismo ambiente ecológico. Desde el punto de vista práctico, el espectro de actividad de las bacteriocinas puede ser mayor o menor dependiendo de las condiciones ambientales y de la concentración de la sustancia activa presente (Souid y col., 2015). La producción de bacteriocinas con un espectro de inhibición relativamente amplio, es propia de bacterias de origen alimentario (Vásquez y col., 2009).

Pese a que son indispensables mayores investigaciones previo a la utilización de bacteriocinas en la práctica clínica, las mismas representan una gran promesa para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas constituyendo eventualmente una alternativa a los antibióticos ya existentes (Hammami y col., 2013). Las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica, entre otras las de origen pancreático, tripsina y alfa-quimiotripsina, y pepsina de origen gástrico (Moreira Dos Santos, 1993). Sin embargo, no se conoce con exactitud si son capaces de escapar a la digestión enzimática *in vivo* en matrices alimentarias complejas. Las bacteriocinas podrían alcanzar el tracto intestinal mediante la ingestión de probióticos productores de bacteriocinas o encapsuladas para combatir patógenos intestinales resistentes a los antibióticos (Le Blay y col., 2007).

## RESISTENCIA *IN VITRO* DE *L. lactis* SIMULANDO SU PASAJE POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL

### Tolerancia a la simulación al tránsito gástrico

Hutkins y Nannen (1993), han reportado que el rango óptimo de pH para el crecimiento de especies de *Lactococcus lactis* se sitúa entre pH 6,3 - 6,9. No obstante, la mayoría de las BAL crecen lentamente a valores menores de pH.

El bajo pH estomacal y la actividad antimicrobiana de la pepsina conforman una barrera efectiva contra la entrada de bacterias al tracto intestinal (Holzapfel y col., 1998). El pH del estómago puede variar de 1,5 o por encima de 6 luego de la ingesta de alimento (Lankaputhra y Shah, 1995), pero generalmente se sitúa entre 2,5 y 3,5 (Holzapfel y col., 1998), por lo que *L. lactis* nativo sería capaz de soportarlo. El tiempo en el que el alimento permanece en el estómago depende de la naturaleza del mismo, variando entre 2 y 4 horas (Smith, 1995).

En el Cuadro 4, se observa el efecto de jugos gástricos simulados a diferentes pH sobre la viabilidad de *L. lactis* ATCC N°11454 y GU967439. De acuerdo al análisis estadístico, ambas cepas de *L. lactis* presentaron una reducción significativa de células viables en valores de pH 2,0 y 2,5. Cuando la solución gástrica se encontraba a pH 2,5 se evidenció una reducción en el recuento de células viables de 4,14 y 2,07 log, mientras que a pH 2,0 se vio una reducción de 4,77 y 4,00 log para GU967439 y ATCC N°11454 respectivamente. Sin embargo, a pesar de la reducción en la viabilidad, ambas cepas de *L. lactis* mostraron células viables a pH 2. Finalmente, no

se encontraron diferencias significativas en los recuentos de células viables para ambas cepas de *L. lactis* cuando el jugo gástrico simulado se encontraba en un valor de pH 3.

Aunque la susceptibilidad a pH bajo puede ser utilizada directamente como medida para seleccionar cepas probióticas, las mismas son ingeridas en alimentos. Se ha comprobado que la presencia de alimentos y sus ingredientes protegen a las bacterias probióticas del ácido y aumentan la viabilidad de los microorganismos durante su pasaje por el tracto gastrointestinal (Charteris y col., 1998b; Wang y col., 1999; Zarate y col., 2000). Se ha demostrado que la leche aumenta la viabilidad de *Lactobacillus* y bifidobacterias sensibles al ácido durante la simulación del tránsito por el tracto gastrointestinal (Charteris y col., 1998b). Se ha sugerido que el mecanismo benéfico de los alimentos y sus ingredientes sería el aumento del pH del contenido gástrico (Charteris y col., 1998b; Wang y col., 1999; Zarate y col., 2000). Con el desarrollo de nuevos sistemas “vehiculizadores” y el uso de alimentos específicos se ha evidenciado claramente que las bacterias sensibles al ácido pueden recibir un efecto de “amortiguación” en el estómago (Havenaar y col., 1992). Esto concuerda con estudios realizados por Drouault (1999) donde observó mediante ensayos *in vivo* realizados en ratas que la tasa de supervivencia en el estómago de *L. lactis* administrado puro y en una alimentación forzada era del 6% mientras que al mezclarlo con una ración ascendía a 91 %.

#### Tolerancia a la simulación al tránsito intestinal

Para que los probióticos puedan ejercer su efecto benéfico en la salud del hospedador, deben colonizar y sobrevivir en el intestino delgado.

En el presente estudio, ambas cepas de *L. lactis* fueron evaluadas para determinar supervivencia en presencia de pancreatina. En ambos casos, si bien hubo una reducción de 0,25 y 0,3 log para *L. lactis* GU967439 y ATCC N°11454 respectivamente, no se encontró una diferencia significativa de los recuentos de células viables tras 240 minutos de incubación con respecto al tiempo inicial. Las cepas evaluadas posiblemente presentan una habilidad natural para tolerar este compuesto, por ello, la presencia de pancreatina en el intestino delgado no representaría una barrera insuperable para estos microorganismos.

Por otro lado, se consideran adecuadas concentraciones de 0,15-0,3% de sales biliares para seleccionar bacterias probióticas para uso humano (Goldin y Gorbach, 1992).

En este caso, si bien se encontró una reducción de 0,25 y 0,56 log para GU967439 y ATCC N°11454 respectivamente, tampoco se encontró una diferencia significativa en el recuento de células viables para ninguna de las dos cepas en evaluación. Por lo que las sales biliares tampoco representarían una barrera para estas bacterias.

## CONCLUSIONES

- *L. lactis* GU 967439 fue sensible a todos los antibióticos activos frente a Gram positivos ensayados indicando probablemente no adquirió elementos de resistencia de otras cepas
- El SLC de *Lactococcus lactis* GU 967439 tuvo actividad antagonista *in vitro* frente a los microorganismos Gram + utilizados como indicadores: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 29213, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 WT y presentó mejor actividad que la cepa *L. lactis* ATCC N°11454
- El SLC de *Lactococcus lactis* GU 967439 no presentó actividad antagonista frente a los microorganismos Gram negativos empleados: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Lactococcus lactis* GU 967439 es resistente a la simulación del jugo gástrico a pH 2.5 y 3, pero no a pH 2.
- *Lactococcus lactis* GU 967439 es capaz de sobrevivir en presencia de pancreatina y bilis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acedo, Z., Chiorean, S., Vederas, J.C., Van Belkum, M.J. (2018) The expanding structural variety among bacteriocins from gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*; 42:805–828.
2. Alós, J.I. (2015) Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 33 (10):692–699.
3. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 100:2939–2951.
4. Ammor, M. S., Flórez, A. B., Mayo, B. (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*; 24: 559-570.
5. Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T. (2003) *Int. J. Food Microb.*; 87:63–73.
6. Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L. (2011) Probiotics and health: an evidencebased review *Pharmacol Res*; 63(5): 366-376.
7. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.). *Lactic Acid bacteria*, Nueva York: Marcel Dekker. P 1-66.
8. Bakir, M., Sabrina, R., Toufik, M. (2011) Antibacterial susceptibility profiles of sub-clinical mastitis pathogens isolated from cows in Batna and Setif Governorates (East of Algeria). *Vet World*; 4: 537–541.
9. Baquero, F. (2009) Environmental stress and evolvability in microbial systems. *Clin Microbiol Infect*;15 (1):5–10.
10. Bárcena, J.M.; Siñeriz, F.; González de Llano, D.; Rodríguez, A.; Suárez, J.E. (1998) Chemostat Production of Plantaricin C By *Lactobacillus plantarum* LL441. *Appl Environ Microbiol*; 64:3512–3514.
11. Benno, Y., Mitsuoka, T., Kanazawa, K. (1991) Human faecal flora in health and colon cancer. *Acta Chir Scand*; 521: 15–23.
12. Caplice, G., Fitzgerald, E. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International J Food Microbiol*; 50: 131-149.
13. Cavanagh, D., Fitzgerald, G., McAuliffe, O. (2015) From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment: a review. *Food Microbiology* 47:45-61.
14. Cetinkaya, F., Coplu, C., Simsek, H., Mus, T.T., Cibik, R. (2012) Antibiotic

susceptibility of *Lactococcus* isolated from Turkish raw milk cheeses. *Medycyna Wet*;68 (1):49-53.

15. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998a) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot*; 61:1636-1643.
16. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (1998b). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*; 84: 759 – 768.
17. Choesri, D., Rusmana, I., Suwanto, A., Mubarik, N. R. (2013). Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Emir J Food Agric*; 25: 489.
18. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. (2001).: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Technol Int*; 7(4): 281-305.
19. Cintas, L.M., Casaus, P., Hernandez, P.E.(2000). Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). *Aliment Equipos Tecnol*; 19 (07): 83-89.
20. Claeson, M., Merson, M.H. (1990) Global progress in the control of diarrheal disease. *Pediatr Infect Dis J*; 9: 345–355.
21. Corrieu G., Luquet F.M., (2005) *Bactéries Lactiques et Probiotiques*. Paris, Tec & Doc Lavoisier, 306p.
22. Corvec, S., Beyrouthy, R., Cremet, L., Aubin, G.G., Robin, F., Bonnet, R. (2013) TEM-187, a new extended-spectrum beta-lactamase with weak activity in a *Proteus mirabilis* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*; 57:2410–2.
23. Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol*; 3:777–788.
24. Dabour N., Zihler A., Kheadr E., Lacroix C., Fliss I. (2009) In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*; 133:225–233
25. Daeschel M.A., (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol*; 43:164–167.
26. Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G. (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol*; 9:445–53.
27. De Fabrizio, S.V., Parada, J.L., Ledford, R.A. (1994). Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis*—an approach of genetic determinants location through a model system. *Microbiol Aliment Nutr*; 12: 307– 315.
28. Delgado, S., Flórez, A.B., Mayo, B., (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal

- tract. *Curr Microbiol*; 50:1–6.
29. Dosta M.C.M., Barrera T.C., Perrino F.J.F., Reyes L.M. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73: 63–72.
  30. Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1999) Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol*; 65: 4881 - 4886.
  31. Earnshaw, R. G. (1992). The antimicrobial action of lactic acid bacteria: Natural food preservation systems. En: Wood, B. J. B. (Ed.) *The lactic acid bacteria in health and disease* New York, Elsevier. pp. 211–232.
  32. ECDC/EMEA (2009). The Bacterial Challenge: Time to React. ECDC/EMEA Joint Technical Report. Disponible en: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publication\\_s/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publication_s/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) Fecha de consulta: 28-11-19.
  33. EFSA (2013) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA J*; 11 (11):3449.
  34. FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Disponible en: [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) Fecha de consulta: [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) Fecha de consulta: 28-11-19.
  35. Feria, P.F. (2007) Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 84p.
  36. Flórez, A.B., Delgado, S., Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can J Microbiol*; 51:51–58.
  37. Flórez, A.B. (2007) Perfiles de susceptibilidad / resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis. Universidad de Oviedo, 216p.
  38. Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O., Dantas, G. (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*; 337:1107–11.
  39. Fraga, M. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek*; 93:71-78.
  40. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*; 66:365–78.



41. Garneau S., Martin N.I., Vederas J.C. (2002) Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*; 84: 577–592.
42. Gerez, C. L., Carbajo, M. S., Rollan, G., Torres Leal, G., Font de Valdez, G. (2010). Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria. *J Food Sci*; 75:354-359.
43. Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2003). In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*; 225: 125–130.
44. Gismondo, M.R., Drago, L., Lombardi, A. (1999) Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrobial Agents*; 12: 287–292.
45. Goldin, B.R. (1998) Health benefits of probiotics. *Br J Nutr*; 80:203–207.
46. Goldin, B.R., Gorbach, S.L. (1992) Probiotics for human. En: Fuller, R. *Probiotics, the scientific*. London, Chapman & Hall, pp 355-376.
47. González, A. (2012) *Lactococcus Lactis* Autóctono: Efecto Antilisterial y evaluación de propiedades sensoriales en quesos tipo cuartirolo. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 62 p.
48. Greenwald, P., Clifford, C.K., Milner, J.A. (2001) Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer*; 37: 948–965.
49. Gupta, K. G., Chandiok, L. Bhatnagar, L. (1973). Antibacterial activity of diacetyl and its influence on the keeping quality of milk. *Zentralbl. Bakteriologie Orig. B*; 158:202-205.
50. Gutiérrez, L., Montoya, O., Ruiz, S. (2005) Evaluación del potencial Bactericida de los extractos de Bacterias Acido Lácticas Sobre el crecimiento In Vitro de *E.coli*, *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes*. *Rev CENIC Ciencias Biol*; 368 (esp): 1-6.
51. Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Roseli, R., Khosroushahi, A.Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*; 30: 51-59.
52. Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M.A., Schiffrin, E.J., Blum, S. (2000) Non-pathogenic bacteria elicit differential cytokine response by intestinal epithelial cell/Leukocyte co-cultures. *Gut* 47: 79–87.
53. Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, W. P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst Appl Microbiol*; 24:218-226.
54. Hamilton-Miller, J.M.T. (2001) A review of clinical trials of probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *Infect Dis Rev*; 3: 83–87.

55. Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., Fliss, I. (2013) Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci*;70: 2947-2967
56. Han, J.H., Chen, D.H., Li, S.S., Li, X.F., Zhou, W.W., Zhang, B.L., Jia, Y.M. (2015). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Ital J Food Sci*; 27:282–289.
57. Hanlin, M.B., Kalchayanand, P., Ray, P., Ray, B. (1993) Bacteriocins of acid lactic bacteria in combination have greater antibacterial activity, *J. Food Prot.*; 56:252-255.
58. Hano, J. (1936). Über das pharmakologische Verhalten des Diazetyls. *Bull. Int. Acad. Pol. Sci. Lett. Cl. Med.* 7-8:555-562.
59. Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J.H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M., Korpela, R. (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind randomised trial. *Br Med J*; 322:1327–1329.
60. Havenaar, R., Brink, N.G., Huis In't Ved, J.H.J. (1992). Selection of strains for probiotics use. En: Fuller, R. (Ed.). *Probiotics, the Scientific Basis*. London, Chapman & Hall, pp. 210 – 224.
61. Hedgecock, L. W., Jones, L.R. (1950). Antibacterial activity of diacetyl. En: *American Society of Microbiology, Bacterial Proceedings*, Washington, DC, pp. 127-128.
62. Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr*; 73: 374–379.
63. Hernández, M.P., González – Revello, A., Cal, K., Calliari, A., Carro, S. (2019) Identificación y caracterización de la sustancia inhibitoria tipo bacteriocina (BLIS) producida por una cepa nativa de *Lactococcus lactis* aislada de quesos artesanales. Póster presentado en XI Jornadas Técnicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
64. Herrero, M., Mayo, B., González, B., Suárez, J.E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J Appl Bacteriol*; 81:565–570.
65. Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2005) Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol*; 22: 455–459.
66. Hill, A.,R., Kethireddipalli, P. (2013) Dairy Products: Cheese and Yogurt En: N.A. Michael Eskin, Fereidoon Shahidi, *Biochemistry of Foods*. 3a. Ed., New York Academic Press, 319-362p.
67. Hirayama, K., Rafter, J. (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect*; 2: 681–686.

68. Hladíková, Z., Smetanková, J., Greif, G., Greifová, M. (2012). Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chim Slovaca*; 5:80-85.
69. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J. (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*; 41:85– 101.
70. Hu, C.B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2010) Enterocin, X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*; 76:4542–4545.
71. Hugas, M. (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci*; 49 (1):139-150.
72. Hutkins, R.W., Nannen, N. L. (1993) pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*; 76: 2354–2365.
73. Isolauri E, Kaila M, Arvola T, Majamaa H, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H (1993) Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Ped Res*; 33: 548–553.
74. Isolauri, E. (1999) Probiotics and gut inflammation. *Curr. Opin. Gastroenterol*; 15: 534–537.
75. Isolauri, E. (2001) Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr*; 73: S1142–S1146.
76. Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol*; 44:525–532.
77. Jay, M., Loessner, M., and Golden, D. (2009) *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ª ed, Zaragoza, Acribia, 767p.
78. Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Ped Res*; 32: 141–144.
79. Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., Isolauri, E. (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol*; 107: 129–134.
80. Kang B., Seo J.G., Lee G.S., Kim J.H., Kim S., Han Y., Kang H., Kim H., Rhee J., Chung M.J., Park Y. (2009) Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J Microbiol*; 47:101–109.
81. Khemariya, P., Singh, S., Nath, G. and Gulati, A. K. (2013). Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of nisc *Lactococcus lactis* from dairy and non-dairy sources. *Czech J. Food Sci*; 31:323–331.

82. Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., Mizumachi, K. (2010) Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International J Food Microbiol*;143: 226–229.
83. Klaenhammer T.R., (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*; 70: 337–349.
84. Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*;12: 39-86.
85. Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*; 25(9):1405-1414.
86. Lade, H.S., Chitanand, M.P., Gyananath, G., Kadam, T.A. (2006) Studies On Some Properties Of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus* Species Isolated From Agro-Based Waste. *J Microbiol*; 2 (1) Disponible en: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/13427> Fecha de consulta: 28-11-19.
87. Landersdorfer, C.B., Nation, R.L. (2015) Colistin: how should it be dosed for the critically ill? *Semin Respir Crit Care Med*; 36(1):126-35.
88. Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult Dairy Prod J*; 30: 2 – 7.
89. Lasser, R.B., Bond, J.H., Levitt, M.D. (1975) The role of intestinal gas in functional abdominal pain. *New Engl. J. Med*; 293: 524–526.
90. Lau, A. S. Y., Liong, M. T. (2014). Lactic acid bacteria and bifidobacteria-inhibited *Staphylococcus epidermidis*. *Wounds*; 26: 121-131.
91. Le Blay, G., Lacroix, C., Zihler, A., Fliss, I. (2007). In vitro inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol*; 45: 252-257.
92. Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L. (1999) *Handbook of Probiotics*. New York, John Wiley, 221p.
93. Lemoigne, M. (1927) Sur le mdtabolisme du diacetyle. *C. R. Soc. Biol.*; 97:1479-1481.
94. Lemoigne, M., P. Monguillon. (1936). Les amdliorants des beurres a base de diacetyle sont-ils des produits naturels?. *Lait*; 16:26-29.
95. Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. (2006) Funtional meat starter cultures for improved sausage fermentation *Int. J. Food Microbiol.*; 106: 270–285.
96. Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J.E., Thrane, U., Vlak, J.M., von Wright, A. (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for

- biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends Food Sci Technol*; 21:425–435.
97. Lévy-Bruhl, M., Cado, Y. (1936). Pouvoir antiseptique et bactericide du diacdtyle vis-a-vis de quelques microbes pathogenes. *Comtes Rendus. Soc. Biol.*; 122:373-374.
  98. Lilly, D.M., Stillwell, R.H. (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*; 147:747–8.
  99. Lindgren S.W., Dobrogosz W.J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*; 87: 149–164.
  100. Liu, C., Zhang, Y. Z., Dong, K., Yuan, J. P., Guo, X K. (2009) Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed Environ Sci*; 22: 401-412.
  101. Liu, S., Han, Y., Zhou, Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Res Int*; 44:643-651
  102. Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y.(2014) Biodiversity of lactic acid bacteria. En: Zang, H., Cai, Y. *Lactic Acid Bacteria-Fundamentals and Practice*. New York, Springer, pp. 103–203.
  103. Lorenzo, G., Raffo, M. (2015) “Lactococcus lactis nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua*”. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, 66 p.
  104. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.*; 380:2095–128.
  105. MacLaren, G., Spelman, D. (2012) Polymyxins: an overview. En: *Up to Date*. Ed. Post TW, UpToDate, Waltham, MA. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/polymyxins-an-overview> . Fecha de consulta: 5/2/2020
  106. Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E.R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International J Food Microbiol*; 99:287-296.
  107. Majamaa, H., Isolauri, E. (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol*; 99: 179–186.
  108. Masood, M.I., Qadir, M.I., Shirazi, J.H., Khan, I.U. (2011) Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit Rev Microbiol*. 37: 91-98.
  109. Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J*;16: 189–199.

110. Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Rambaud, J. C. (1993) Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet*; 74:1.
111. Martinez L., Calvo J.(2009) Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27:44-52.
112. Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol*; 105:281–295.
113. Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., de Vos, W., Dunne, C., Fondén, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reniero, R., Saarela, M., Salminen, S., Saxelin, M., Schiffrin, E., Shanahan, F., Vaughan, E., von Wright, A. (1999) Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci Technol*; 10: 393–399.
114. Mc Farland L.V. (2000); Beneficial microbes. Health or hazard? *Eur Gastroenterol Hepatol* 12(10):1069-71.
115. McNulty, C.A., Richards, J., Livermore, D.M., Little, P., Charlett, A., Freeman, E. (2006) Clinical relevance of laboratory-reported antibiotic resistance in acute uncomplicated urinary tract infection in primary care. *J Antimicrob Chemother* ;58:1000–8.
116. Metchnikoff, E. (1908). *The prolongation of life*. Nueva York, Putnam, 19 p.
117. Miles, A. A., Misra, S. S., Irwin, J. O. (1938) The estimation of the bactericidal power of blood. *J Hyg*; 38:732 - 749.
118. Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*; 22:1255.
119. Mombelli, B., Gismondo, M.R. (2000) The use of probiotics in medical practice. *Int. Antimicrob Agents*;16(4):531-6.
120. Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez- Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Foods*; 4:531–541.
121. Moreira, W. L. (1993) Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 266 p.
122. Morelli, L., Vogensen, F., von Wright, A. (2004). Genetics of lactic acid bacteria. En: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional aspects*. New York, Marcel Dekker, pp. 249-293.
123. Müller, E., Radler, F. (1993) Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiol. (Praha)*; 38: 441–446.

124. Myrvik, Q. N., Volk, W.A. (1954). Comparative study of the antibacterial properties of ascorbic acid and reducing compounds. *J. Bacteriol*; 68:622-626.
125. Nesme, J., Cecillon, S., Delmont, T.O., Monier, J.M., Vogel, T.M., Simonet, P. (2014) Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* ; 24:1096–100.
126. O’Sullivan, M. G., Thornton, G. C. O’Sullivan, J. K. Collins. (1992) Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci. Technol*; 31:129–314.
127. Ogunbanwo, T., Sanni, A.L., Onilude, A.A. (2003) Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, *J Biotech*; (8): 219-227.
128. Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis*; 2:115–129.
129. Oppegard, C., Rogne, P., Kristiansen, P.E., Nissen-Meyer, J. (2010) Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues. *Microbiology*; 156:1883–1889.
130. Otto M., Peschel A., Gotz F. (1998) Producer self-protection against the antibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu3298. *FEMS Microbiol Lett*; 166(2):203-211.
131. Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 82: 279–289.
132. Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P. (2007) Socol, C.R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.*;50:521–542.
133. Pardo, V.T., Krzysatof, N., Waliszewski, K.N., Robledo, G. (1994) Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam Nutr*;4681:6-10.
134. Parker, R.B.(1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*;29:4–8.
135. Parra, Ricardo (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*; 8:93-105.
136. Penna F.J. (1998) Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Rev Enfer Infec Ped* 11(6):182.
137. Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb. Cell Fact.*; 13:S3.

138. Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. (1997) Antibiotic resistance spread in food. *Nature*; 389: 801-802.
139. Pessi, T., Sütas, Y., Hurme, M., Isolauri, E. (2000) Interleukin- 10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin. Exp. Allergy*; 30: 1804–1808.
140. Piard J.C., Desmazeaud M. (1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism endproducts. *Lait*; 71:525–541.
141. Piddock, L. J. V. (1994) New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*; 38:163–169.
142. Raha, A.R., Ross, E., Yusoff, K., Manap, M.Y., Ideris, A. (2002). Characterisation and molecular cloning of an erythromycin resistance plasmid of *Lactococcus lactis* isolated from chicken cecum. *J Biochem Mol Biol Biophys*; 6:7–11.
143. Reid, G. (2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Amer J Clin Nutr. Suppl*; 73: 437-443.
144. Requena, T., Pelaez, C. (1995) Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev Española Cienc Tecnol Al* ; 35 (1):19-44.
145. Rodríguez, I. (2016). Implementación de una técnica de purificación de la/s bacteriocina/s producidas por *Lactococcus lactis* nativo. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, 57 p.
146. Rodríguez-Riera, Z., Robaina-Mesa, M., Jáuregui-Haza, U., Rodríguez-Chanfrau, J., Blanco-Gonzalez, A. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*; 45: 139–147.
147. Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis*. 2011;53:49–56.
148. Rojo-Bezares, B., Saenz, V., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006) Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int J Food Microbiol*; 111:234-240.
149. Rupnik M., Wilcox M.H., Gerding D.N. (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*; 7:526–536
150. Salazar, B. C., Montoya, O.I. (2003) Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*; 10( 2): 20-26.
151. Salim, A.F., Phillips, A.D., Farthing, M.J. (1990) Pathogenesis of gut virus infection. *Baillières Clin. Gastroenterol*; 4: 593–607.



152. Salminen, S. (1998) *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2da ed., New York: Marcel Dekker, 617p.
153. Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 70: 347–358.
154. Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y., (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol*; 12:412–416.
155. Schaafsma G. (1996). State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr News Lett*;5:23–4.
156. Schales, O. (1951). Effect of albumin on the antibacterial activity of diketones. *Arch. Biochem. Biophys*; 34:56-63.
157. Schiffin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. (1997) Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *J Dairy Sci*;66(2):515S-20S.
158. Schillinger, U., Lucke, F. (1991) El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtsch*; 1:35-40.
159. Schnürer J., Magnusson J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* ; 16: 70–78.
160. Seija, V., Vignoli, R., (2008). Principales grupos de Antibióticos. En: Universidad de la Republica, Facultad de Medicina. Universidad de la Republica, Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2a ed. 631–647pp.
161. Shah, N. P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol*; 55:46–53.
162. Sharpe, A.N., Kilsby, D.C. (1971) A rapid, inexpensive bacterial Count technique using a gardroplets. *J Appl Bacteriol*; 34:435-440.
163. Shimoyama. T., Hori, S., Tamura, K., Yamamura, M., Tanaka, M., Yamazaki, K. (1984) Microflora of patients with stool abnormality. *Bifidobacteria and Microflora*; 3: 35–42.
164. Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol*; 34: 77-81.
165. Simon, G. L., Gorbach, S. L. (1987) *Intestinal flora and gastrointestinal function*. New York, Raven, V 2.
166. Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl Environ Microbiol*; 69:7554–7557.
167. Smith, T. (1995) The digestive system. En: Smith, T. *The Human Body*. Collingwood, Ken Fin Books, pp. 150 – 173.

- 168.Soud, W., Boudjenah-Haroun, S., Kheir Siboukeur, O., Mati, A (2015) Potential use of the nisin produced by lactic acid bacteria for longer conservation of Camel cheese. *Emir J Food Agric*; 27(10): 787-792.
- 169.Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G. (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr*; 52: 899–907.
- 170.Stenvens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991) Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Appl Environ Microbiol*; 57: 3613-3615.
- 171.Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., Netrusov, A.I., (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Appl Biochem Microbiol*; 48:229-243
- 172.Strachan, D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J*; 29.9: 1259–1260.
- 173.Sugita, T., Togawa, M. (1994) Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. *Jpn J Pediatr*; 47: 2755–2762.
- 174.Sütas, Y., Hurme, M., Isolauri, E. (1996) Downregulation of antiCD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. *Scand. J. Immunol*; 43:687–689.
- 175.Swe, P.M., Cook, G.M., Tagg, J.R., Jack, R.W. (2009) Mode of action of dysgalactin: a large heat-labile bacteriocin, *J. Antimicrob. Chemother*; 63 :679–686.
- 176.Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol*; 81:1–10.
- 177.Ture, M., Boran, H. (2015) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Bull Vet Inst Pulawy*; 59:37-42.
- 178.Vallejo, M., Ledesma, P., Anselmino, L., Marguet, E.R. (2014) Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. *Rev Colomb Biotecnol*; 16: 174-179.
- 179.Van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Kuipers OP (2011) Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Exp Opin Drug Metabol Toxicol*; 7:675–680.
- 180.Van Staden A.D., Brand A.M., Dicks L.M.T. (2012) Nisin F-loaded brushite bone cement prevented the growth of *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Appl Microbiol*;112:831–840.

181. Vandenberg, P.(1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev*; 12:221–238.
182. Vásquez, M.S.M., Suárez, M.H., Zapata, B.S. (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr*; 36 (1):64-71.
183. Venema, K., Venema, G., Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol*; 3(8): 299-304.
184. Vesa, T., Marteau, P., Korpela, R. (2000) Lactose intolerance. *J. Am.Coll. Nutr*; 19: 165–175.
185. Vidal Group Drug Information Systems (2014). Colistiméthate sodique: mise à jour 24 Avril 2014. Issy-les-Moulineaux. Disponible en: [https://www.vidal.fr/substances/3936/colistimethate\\_sodique/](https://www.vidal.fr/substances/3936/colistimethate_sodique/) Fecha de consulta: 28-11-19.
186. Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., Reinheimer, J. (2011) Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Front. Microbiol*; 2: 70.
187. Vodnar, D. C., Paucean, A., Dulf, F. V., Socaciu, C. (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*; 38:109-113.
188. Walther, C., Rossano, A., Thomann, A., Perreten, V. (2008) Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Vet Microbiol*; 131: 348-357.
189. Wang, X., Brown, I.L., Evans, A.J., Conway, P.L. (1999). The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *J Appl Microbiol*; 87: 631 – 639.
190. Woolford, M. K. (1975). Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1–C12) as potential silage additives. *Journal of the Sci Food Agric*; 26:219–228.
191. Yang, E., Fan, L.H., Jiang, Y.M., Doucette, C. Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*; 2(1): 48.
192. Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Helsinki, University of Helsinki. 61p.
193. Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review article. *APCBEE Procedia*; 2: 50–56.

194. Zarate, G., Perez-Chaia, A., Gonzalez, S., Oliver, G. (2000) Viability and B-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J Food Prot*; 63: 1214 – 1221.
195. Zycka-Krzesinska, J., Boguslawska, J., Aleksandrak-Pierkarczyk, T., Jopek, J., Bardowski, J. (2015) Identification and chracterization of tetracycline resistance in *Lactococcus lactis* isolated from Polish raw milk and fermented artisanal products. *International J Food Microbiol*; 211:134-141.

## ANEXOS

### Anexo 1. Criterios para clasificar los resultados a diferentes principios antimicrobianos de acuerdo al tamaño de halos (mm) en Resistente (R), Moderadamente sensible (MS) y Sensible (S)

Grupo	Antimicrobianos Nombre y concentración	Halos (mm) interpretativos			
		R	MS	S	
<b>Grupo 1- inhibidores de la síntesis de la pared celular</b>					
Penicilinas	Penicilina(10 U) <sup>c</sup>	≤19	20-27	≥28	
	Ampicilina(10 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35	
	Piperacilina(100 µg) <sup>c</sup>	≤18	19-20	≥21	
	Carbenicilina(100 µg) <sup>e</sup>				
	Amoxicilina+clavulánico (30 µg) <sup>c</sup>	≤18	19-20	≥21	
	Cefalosporinas	Cefalotina(30 µg) <sup>c</sup>	≤14	15-17	≥18
		Cefradina(30 µg) <sup>c</sup>	≤14	15-17	≥18
		Cefuroxima(30 µg) <sup>c</sup>	≤15	16-17	≥18
		Cefepima(30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35
		Cefotaxima(30 µg) <sup>c</sup>	≤14	15-22	≥23
Ceftazidima(30 µg) <sup>c</sup>		≤15	16-18	≥19	
Carbapenemas	Cefoperazona(75 µg) <sup>c</sup>	≤15	16-18	≥19	
	Imipenem(10 µg) <sup>e</sup>				
Monobactámicos	Aztreonam(30 µg) <sup>c</sup>	≤15	16-21	≥22	
	Glicopéptidos	Vancomicina(5 µg) <sup>e</sup>			
		Teicoplanim(30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35
<b>Grupo 2 – inhibidores de síntesis de proteína</b>					
Aminoglucósidos	Amikacina(30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35	
	Gentamicina(120 µg) <sup>e</sup>				
	Kanamicina(30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35	
	Estreptomina(10 µg) <sup>c</sup>	≤11	12-14	≥15	
	Tobramicina(10 µg) <sup>e</sup>				
	Tetraciclinas	Neomicina(30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35
		Doxiciclina(30 µg) <sup>d</sup>	≤12	13-15	≥16
		Tetraciclina(30 µg) <sup>b</sup>	≤12.4	12.5-17.4	≥17.5
	Macrólidos	Eritromicina(15 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35
		Telitromicina (15 µg) <sup>e</sup>			
Lincosamidas	Clindamicina(2 µg) <sup>b</sup>	≤12.4	12.5-17.4	≥17.5	
Oxazolidinonas	Linezolid(30 µg) <sup>d</sup>	≤20	21-22	≥23	
Antibióticos individuales	Cloranfenicol(30 µg) <sup>b</sup>	≤12.4	12.5-17.4	≥17.5	

<sup>a</sup> Khemariya y col. 2013

<sup>b</sup> CLSI, 2007 citado por Haghshenas y col. 2014

<sup>c</sup> Charteris y col. 1998a citado por Coplu y col. 2012.

<sup>d</sup> CLSI 2013 citado por Ture y Boran, 2015.

<sup>e</sup> No se encontraron referencias

Cont. Grupo	Antimicrobianos Nombre y concentración	Halos (mm) interpretativo			
		R	MS	S	
Grupo 3 – inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas	Ac. Nalidixílico (30 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35
		Moxifloxacina(5 µg) <sup>e</sup>			
		Levofloxacina(5 µg) <sup>d</sup>	13	14-16	≥17
		Pefloxacina(5 µg) <sup>e</sup>			
Grupo 4 – inhibidores de la función de la membrana citoplasmática	Colistin(10 µg) <sup>a</sup>	S/H	≤10	10-35	

<sup>a</sup> Khemariya y col. 2013

<sup>b</sup> CLSI, 2007 citado por Haghshenas y col. 2014

<sup>c</sup> Charteris y col. 1998a citado por Coplu y col. 2012.

<sup>d</sup> CLSI 2013 citado por Ture y Boran, 2015.

<sup>e</sup> No se encontraron referencias