

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**EL PAPEL DE LOS BACTERIÓFAGOS EN LA
DISPERSIÓN DE LA RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN EL QUESO**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

Laura Suárez Escobedo

JULIO, 2021





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dra. Dña. **Ana Belén Flórez García**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

PROFESOR COTUTOR

Dr. D. **Baltasar Mayo Pérez**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

CERTIFICA:

Que Dña. **Laura Suárez Escobedo** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 15ª promoción curso 2020-2021.

Villaviciosa, 05 de julio de 2021

Fdo. Ana Belén Flórez García

Fdo. Baltasar Mayo Pérez

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores la Dra. Ana Belén Flórez y el Dr. Baltasar Mayo por su constante ayuda y trabajo durante todos estos meses. Su sabiduría, paciencia y continuas propuestas han permitido hacer posible el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster. Me siento muy agradecida por la oportunidad que me brindaron para formar parte del grupo de investigación de cultivos lácteos funcionales. En el que he podido aprender y formarme en un tema a la vez que apasionante, crucial para la salud y seguridad alimentaria, como es la resistencia a antibióticos.

Formando parte del grupo también han estado mis compañeros Lucía, Javi y Daniel a los que también tengo que agradecer todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio. Me llevo muy buenos momentos compartidos.

Me gustaría dar las gracias a mis padres, mis dos pilares, Margarita y Jose Antonio, por su apoyo incondicional, confianza y ánimos que me han transmitido desde pequeña en cada nueva etapa que he ido comenzando. No quisiera dejar sin nombrar al resto de mi familia, personas fundamentales tanto en mi desarrollo personal como en el profesional.

Finalmente, agradecer a mis amigos de siempre y en especial a Jesús, por formar parte de este camino y ser un apoyo fundamental en mi vida.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

Resumen	I
Abstract	II
Listado de figuras	III
Listado de tablas	IV
1. Introducción	1
2. Consideraciones teóricas y experimentales	4
2.1. Fundamento teórico	5
2.1.1. Microbiota del queso	5
Bacterias del ácido láctico	5
Microbiota acompañante	8
2.1.2. Resistencia a antibióticos	9
El descubrimiento de los antibióticos y su modo de acción	9
Origen de la resistencia a los antibióticos	10
Mecanismos de resistencia a los antibióticos	12
Movilización de genes de resistencia	12
2.1.3. Bacteriófagos	13
Ciclos de replicación en bacteriófagos	13
Bacteriófagos en los productos lácteos	15
Mecanismos de transmisión horizontal de genes a través de fagos: transducción	16
Contribución de los bacteriófagos a la dispersión de la resistencia a antibióticos	18
2.1.4. Antecedentes en el estudio de transmisión y movilización de genes de resistencia desde fagos a bacterias en varios ecosistemas	18
2.2. Consideraciones experimentales	20
2.2.1. Métodos clásicos para la detección de bacteriófagos	20
2.2.2. Métodos moleculares para la detección de bacteriófagos	21

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction)	21
PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	22
2.2.3. Detección de fagos mediante microscopía electrónica de transmisión	23
3. Materiales y métodos	25
3.1. Muestras	26
3.2. Purificación de la fracción fágica	26
3.3. Ensayo de infectividad	27
3.4. Detección mediante microscopía electrónica de transmisión de la fracción fágica	27
3.5. Extracción del ADN fágico	27
3.6. Comprobación mediante PCR de la eficiencia en la extracción del ADN fágico	28
3.7. Análisis microbiológico de cuajada y queso de Cabrales	29
3.8. Extracción de ADN bacteriano de cuajada y queso de Cabrales	30
3.9. Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR	31
4. Resultados y discusión	35
4.1. Extracción y detección de bacteriófagos en muestras lácteas	36
4.2. Comprobación de la eficiencia del protocolo de aislamiento fágico	38
4.3. Detección de bacteriófagos en muestras lácteas mediante PCR convencional	39
4.4. Análisis de la microbiota resistente a antibióticos en cuajada y queso	40
4.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos en la fracción fágica y distintos grupos microbianos mediante la técnica de PCR	43
5. Conclusiones	47
6. Abreviaturas y símbolos	49
7. Bibliografía	51
8. Anexos	58

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural que precede al descubrimiento y utilización de los antibióticos. Sin embargo, el uso abusivo e indiscriminado de estos en clínica humana y veterinaria, agricultura y acuicultura ha provocado un aumento descontrolado de bacterias patógenas que son capaces de resistir su acción. La transferencia horizontal de los genes de resistencia a antibióticos es el principal mecanismo para la dispersión de las resistencias. Los bacteriófagos son abundantes en los biomas de distintos ambientes naturales (lagos, ríos, suelo, etc.), así como en los alimentos. Las características estructurales de los bacteriófagos junto con el hecho de que en la transducción no es necesario que exista una coincidencia en el espacio y en el tiempo entre la bacteria donadora y receptora, hace que estos sean vectores especialmente adecuados para la transferencia de genes. En la actualidad, hay un gran desconocimiento sobre el papel de los bacteriófagos en la dispersión de la resistencia a antibióticos durante la elaboración de los productos fermentados, y más en concreto en el queso. Por este motivo, en este trabajo se evaluó el contenido de genes de resistencia a antibióticos de la fracción fágica de varios productos lácteos y, ocasionalmente, se comparó con el de la fracción bacteriana, con el objetivo de proporcionar conocimiento para el diseño de estrategias destinadas a la contención de la diseminación de la resistencia a través de la cadena alimentaria.

Dada la escasez de trabajos previos en este campo, primeramente se desarrolló, aplicó y optimizó un método para el aislamiento de la fracción fágica de tres matrices lácteas (leche, cuajada y queso) y se purificó su ADN. En las muestras con un mayor contenido y diversidad de fagos (cuajada y queso), se llevó a cabo la detección de una amplia variedad de genes de resistencia tanto en el ADN de la fracción fágica como de la bacteriana. En la fracción fágica se detectaron los genes *bla*_{CTX-M-9} y *sulI* en cuajada, y los genes *bla*_{TEM} y *ermB* en queso. Estos genes confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos (*bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{TEM}), sulfanamidas (*sulI*) y macrólidos (*ermB*). En la fracción bacteriana, aunque predominaron genes de resistencia a tetraciclina (*tetM*, *tetW*, *tetS* y *tetA*), se detectaron también genes de resistencia idénticos a los identificados en la fracción fágica (*bla*_{TEM} y *ermB*). Este hecho sugiere que los bacteriófagos podrían jugar un papel en la diseminación de algunos genes de resistencia en el ambiente lácteo.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, bacteriófagos, queso, transducción.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a natural phenomenon that precedes the discovery and use of antibiotics. However, the misuse and overuse of these antimicrobial compounds in human and veterinary clinics, agriculture and aquaculture has promoted the increase of antibiotic-resistant pathogenic bacteria. Horizontal transfer of resistance genes has been proposed as the main mechanism in the spread of antibiotic resistance. Bacteriophages are abundant in the biomes of different environmental ecosystems (lakes, rivers, soil, etc.), as well as in food. The structural characteristics of bacteriophages and the fact that in transduction it is not necessary the co-occurrence of donor and recipient bacteria in space and time, make these microorganisms as suitable vectors for gene transfer. Currently, there is a lack of scientific knowledge about the role of bacteriophages in the dissemination of antibiotic resistance during the manufacture of fermented products, particularly in cheese. Because of that, the main objective of the present work was to analyse the content of the antibiotic resistance genes in the phage fraction of dairy products with the final goal, if required, of providing knowledge for the design of strategies involved in antibiotic resistance contention.

Due to the scarce knowledge on this topic, in this work, we first developed and optimized a method for the isolation of the phage fraction from dairy products (milk, curd and cheese) and its DNA was extracted and purified. DNA from curd and cheese samples, in which a higher content and diversity of phages was shown, the presence and diversity of a wide range of antibiotic resistance genes in the phage and bacterial fraction was analysed and compared. In the phage DNA fraction, the genes *bla*_{CTX-M-9} and *sulI* were detected in curd samples, and the genes *bla*_{TEM} and *ermB* in cheese samples. These genes confer resistance to beta-lactam, sulphonamide and macrolide antibiotics. Genes encoding tetracycline resistance (*tetM*, *tetW*, *tetS*, and *tetA*) were dominant among the bacterial fraction. However, antibiotic resistance genes identical to those identified in the phage fraction (*bla*_{TEM} and *ermB*) were also detected in the cellular fraction. This fact suggests that bacteriophages could play a role in the dissemination of some antibiotic resistance genes in the dairy environment.

Keywords: antibiotic resistance, bacteriophages, cheese, transduction.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	<i>Mecanismos de acción de los antibióticos.</i>	10
Figura 2	<i>Dispersión de los antibióticos por el medio ambiente. Los puntos rojos representan los residuos de antibióticos.</i>	11
Figura 3	<i>Mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia.</i>	13
Figura 4	<i>Fases del ciclo lítico.</i>	15
Figura 5	<i>Representación gráfica de las tres familias de bacteriófagos principales, Myoviridae (de colas largas y contráctiles), Siphoviridae (de colas larga y no contráctiles) y Podoviridae (de colas cortas).</i>	16
Figura 6	<i>Mecanismos de transducción (generalizada, izq. y especializada, der.).</i>	17
Figura 7	<i>Test de infectividad fágica.</i>	20
Figura 8	<i>Componentes y etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</i>	22
Figura 9	<i>Etapas que tiene lugar en un ciclo de qPCR empleando el fluorocromo SYBR Green.</i>	23
Figura 10	<i>Microscopio electrónico.</i>	24
Figura 11	<i>Etapas en las que fue tomada una alícuota para realizar el seguimiento de la población fágica a lo largo del proceso de extracción del ADN.</i>	29
Figura 12	<i>Ensayo de infectividad de las cepas Q1-2, CAS-2, 1363, Lc83A, 171A(B), 2BA40 de <u>Lactococcus lactis</u>. Nota. La M indica que se ha inoculado muestra de sobrenadante que contiene fagos, el signo + indica control positivo que se trata de un sobrenadante de un cóctel de fagos con capacidad para infectar específicamente a cada cepa de estudio.</i>	37
Figura 13	<i>Micrografía electrónica de una suspensión fágica.</i>	37
Figura 14	<i>Comprobación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fágico. La fecha roja señala la presencia de ADN fágico en las calles 5 y 6. Calle 1: homogenizado del Stomacher. Calle 2: filtrado por 0,45 µm. Calle 3: filtrado por 0,22 µm. Calle 4: concentrado de fagos en tubo Falcon. Calle 5: concentrado de fagos en tubo Eppendorf. Calle 6: ADN fágico extraído. Como control negativo fue empleada agua de grado molecular. M: marcador de peso molecular Nzytech Ladder III.</i>	38
Figura 15	<i>PCR de las muestras de leche, cuajada y queso de Cabrales para la detección de ADN de tres grupos de fagos (936, c2 y P335) que infectan a <u>Lactococcus lactis</u>: A. Leche. Calles 1, 7, 13: leche 1; Calles 2, 8, 14: leche 2; Calles 3, 9, 15: leche 3; Calles 4, 10, 16: leche 4. B. Cuajada. Calles 1, 6, 11: cuajada 1; Calles 2, 7, 12: cuajada 2; Calles 3, 8, 13: cuajada 3. C. Queso. Calles 1, 5, 9: queso 1, Calles 2, 6, 10: queso 2; Calles 3, 7, 11: queso 3. Como control positivo se ha empleado una muestra de ADN de un cóctel de fagos capaces de infectar a <u>L. lactis</u>. M1: marcador de peso molecular Nzytech Ladder III. M2: marcador de peso molecular GRS Ladder.</i>	40
Figura 16	<i>Evolución en los niveles de resistencia en cuajada y queso mediante recuento microbiológico. Nota. Ver Anexo para obtener más información.</i>	42

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	<i>Condiciones de PCR y oligos empleados para la cuantificación de genes de resistencia en la fracción fágica y bacteriana presentes en cuajada y queso.</i>	32
Tabla 2	<i>Evolución en los niveles de resistencia desde la cuajada al queso mediante recuento microbiológico.</i>	43
Tabla 3	<i>Matriz de correlación entre los genes de resistencia a antibióticos, las fracciones fágica y bacteriana y la cuajada en la que se encuentran.</i>	44
Tabla 4	<i>Matriz de correlación entre los genes de resistencia a antibióticos, las fracciones fágica y bacteriana y el queso en el que se encuentran.</i>	44
Tabla S1 Anexo	<i>Clasificación de los antibióticos.</i>	59
Tabla S2 Anexo	<i>Recuentos microbiológicos de las cuajadas de Cabrales. Nota. En color amarillo se identifica la cuajada 1, en verde la cuajada 2 y en azul la cuajada 3.</i>	64
Tabla S3 Anexo	<i>Recuentos microbiológicos de los quesos maduros de Cabrales. Nota. En color amarillo se identifica el queso 1, en verde el queso 2 y en azul el queso 3.</i>	65



1. INTRODUCCIÓN



Con el descubrimiento del salvarsán en 1913 por Paul Ehrlich y de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming se dio paso al comienzo en la utilización de los antibióticos como terapia frente a enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas tanto en seres humanos como en animales y plantas. El término antibiótico hace referencia a toda sustancia sintetizada biológica o químicamente con capacidad para inhibir o eliminar una o más especies microbianas de forma específica.

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública y de seguridad alimentaria a escala mundial, ya que dificulta el tratamiento de las infecciones bacterianas. Pese a que existe una alta ubicuidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos en todo tipo de ambientes, incluidos aquellos sin contacto con el hombre, el uso excesivo de los antibióticos y la presión selectiva que se genera sobre las poblaciones microbianas, ha promovido aún más la aparición y favorecido la dispersión de genes de resistencia entre bacterias que comparten un mismo nicho ecológico, llegando a transferirse finalmente a bacterias patógenas, a través de diversos mecanismos de transferencia horizontal. De esta manera, el fenómeno de la resistencia no hace más que seguir incrementando la tasa de mortalidad y morbilidad asociada a infecciones bacterianas, así como el coste de su tratamiento.

La resistencia a los antibióticos puede ser inherente a una determinada especie y, por tanto, de herencia vertical e independiente de la presión selectiva o bien adquirirse a través de mutaciones en el cromosoma bacteriano^[1] o por adquisición de ADN exógeno a través de mecanismos de transmisión horizontal (transformación, conjugación o transducción).^[2] Esta transferencia génica llevada a cabo por medio de vectores como plásmidos, islas de patogenicidad, bacteriófagos, etc., supone en el genoma bacteriano un impacto que favorece su evolución y adaptación.^[3] De los tres mecanismos de transferencia, el mediado a través de bacteriófagos se encuentra aún poco explorado, pese al importante papel que desempeñan en el ecosistema como vehículo para transferir todo tipo de genes entre bacterias, estén o no en el mismo espacio y tiempo.

Los bacteriófagos, son virus que infectan de manera específica a las bacterias y que se encuentran de manera ubicua desde tiempos inmemoriales en todos los ecosistemas de la Tierra (lagos, ríos, suelo, matrices alimentarias, el cuerpo humano,...).^[4,5] Han sido descritos cerca de 5.500 bacteriófagos pertenecientes al orden de los *Caudovirales*. Su forma acelular, constituida por un ácido nucleico rodeado de una envoltura proteica

(cápside) de simetría icosaédrica que a su vez se encuentra unida a través de un cuello a una cola de longitud y grado de contractibilidad variable, les permite sobrevivir a condiciones ambientales muy diversas de presión, temperatura, sal, humedad, etc. Estas características unidas a su capacidad para vehiculizar material genético entre bacterias los hacen ser un elemento especialmente adecuado de transferencia génica dentro de un mismo bioma (conjunto de ecosistemas) o entre biomas diferentes.

Hasta hace pocos años la contribución de los fagos a la movilización de genes de resistencia a antibióticos no estaba prácticamente investigada; sin embargo, son cada vez más las investigaciones llevadas a cabo en muestras medioambientales que apoyan la idea de que este tipo de virus presentan un papel importante en los procesos de adquisición, mantenimiento y movilización de estos genes al haber sido detectados genes bacterianos en la fracción fágica y viceversa. [1,6,7,8]

En la actualidad hay un gran desconocimiento sobre el papel de los bacteriófagos en la dispersión de la resistencia a antibióticos durante la elaboración de los alimentos y tras su consumo en el tracto gastrointestinal. La caracterización del resistoma (conjunto de genes de resistencia) de la fracción fágica de alimentos, como por ejemplo de los productos lácteos, y la evaluación de su capacidad infectiva podría ayudar en el diseño de estrategias destinadas a la contención de la diseminación de la resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria.

Por ello, y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el principal objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido el de caracterizar el resistoma de la fracción fágica de tres matrices lácteas que forman parte del proceso de elaboración del queso Cabrales D.O.P.: leche, cuajada y queso. Para alcanzar este objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un protocolo para el aislamiento y purificación de la fracción fágica en leche, cuajada y queso.
- Caracterizar la diversidad fágica mediante ensayos de infectividad, microscopía electrónica y PCR.
- Analizar la microbiota resistente a antibióticos mediante técnicas microbiológicas dependientes de cultivo.
- Detectar genes de resistencia a antibióticos en la fracción fágica y distintos grupos microbianos mediante PCR.



2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES



2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1.1. Microbiota del queso

El queso es un producto fermentado, utilizado desde la antigüedad, que permite alargar la vida útil de la leche y mejorar sus propiedades nutritivas. Desde el punto de vista microbiológico, el queso es un ambiente más o menos complejo, según las distintas variedades, en el que coexisten y evolucionan numerosas poblaciones de microorganismos procariotas y eucariotas (mohos y levaduras), y virus (principalmente bacteriófagos). Los procesos tecnológicos de elaboración empleados, así como las condiciones ambientales, influirán sobre las poblaciones microbianas presentes haciendo que estas evolucionen y modifiquen su composición o sus proporciones a lo largo del proceso de elaboración y maduración.

La microbiota del queso está constituida por bacterias del ácido láctico (BAL), un grupo bacteriano compuesto por especies con un importante papel tecnológico, pero también por bacterias oportunistas, e incluso, ocasionalmente, por bacterias patógenas. La microbiota es especialmente compleja en los quesos artesanales elaborados con leche cruda y sin la adición de fermentos comerciales, y más concretamente en los quesos azules. Esta mayor complejidad microbiana influye también en que estos productos tengan características organolépticas únicas de textura, sabor y aroma en comparación con los quesos de elaboración industrial.

Bacterias del ácido láctico

Las BAL son un grupo de bacterias muy heterogéneo cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Este grupo incluye bacterias Gram-positivas, de morfologías muy diversas (cocoide, bacilar o cocobacilar), anaerobias facultativas o microaerófilas. Generalmente suelen ser inmóviles, no formadoras de esporas, ni de pigmentos. Carecen de la enzima catalasa, pero poseen las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa para detoxificar los radicales peróxidos. Tienen una limitada capacidad biosintética, por lo que, para su crecimiento y multiplicación, requieren además de una fuente de carbono que sea fermentable (en la leche la lactosa), varios factores de crecimiento como vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y sus precursores.^[9,10]

La producción de ácido láctico puede proceder del catabolismo homofermentativo o heterofermentativo de los azúcares, siendo en el primer caso el ácido láctico el producto

principal, y en el segundo además de este se produce CO₂, etanol y ácido acético.^[11,12] Esta propiedad acidificadora, además de aportar características organolépticas agradables a los productos fermentados como el queso, permite mejorar la conservación de los alimentos y aumentar su vida útil por inhibición del desarrollo de microorganismos indeseables y/o patógenos.

El grupo bacteriano de las BAL ha formado parte de los alimentos consumidos por el hombre desde la antigüedad a través de los alimentos fermentados, sin la aparición de ningún efecto adverso para su salud. Por este motivo, son consideradas como organismos QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la EFSA europea.^[13,14]

Dentro del grupo de las BAL, se encuentran los géneros *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Alloiococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*. Todos ellos, pertenecen al filo Firmicutes y presentan un bajo contenido de G+C (entre el 30 y el 50%) en sus genomas.^[15] A continuación, se enumeran las características más relevantes de los grupos de BAL con mayor relevancia en la industria láctea.

– Lactococos

Los lactococos son bacterias mesófilas homofermentadoras de morfología cocoide que se disponen aisladas o en cadenas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C, aunque pueden crecer entre 10 y 45°C, no son capaces de crecer en presencia de altos contenidos de NaCl (6,5%) ni a pH muy básicos. El genoma de las cepas de *Lactococcus* varía en tamaño desde 2,37 a 2,53 Mpb, con un contenido de G+C medio del 35%.

En la industria quesera se emplea la especie *L. lactis* dada su alta capacidad acidificadora. Esta especie a su vez se subdivide en las subespecies *lactis*, *cremoris* y *hordniae*. Los fermentos para queso están constituidos mayoritariamente por cepas de las dos primeras subespecies. Un tipo particular de *L. lactis* subsp. *lactis* lo constituye la biovariedad *diacetylactis*, por su capacidad para transformar el citrato presente en la leche en diacetilo, compuesto que aporta aroma y sabor a la mantequilla y a varios tipos de quesos como el Edam o el Cheddar.

– Lactobacilos

Los lactobacilos son bacterias mesófilas o termófilas de morfología bacilar, que se dividen a su vez en tres grupos en función de sus características fermentativas: homofermentativos, heterofermentativos estrictos o heterofermentativos facultativos. El género *Lactobacillus* es un grupo muy diverso compuesto por más de 260 especies entre las que se incluyen varias presentes en productos fermentados y en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. La gran diversidad interespecífica hace que el tamaño de su genoma oscile entre los 1,8 y 3,3 Mpb y el contenido de G+C varíe entre el 33 y el 51%.^[16] De forma reciente, en función a diversos criterios genéticos, fisiológicos y ecológicos, el género se ha dividido en 23 géneros distintos^[86]. Las especies de lactobacilos que más comúnmente se desarrollan en los quesos o se utilizan como fermentos son: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Levilactobacillus brevis* y *Limosilactobacillus fermentum*.

– Leuconostoc

Los leuconostocs son bacterias heterofermentadoras que tienen la capacidad de producir además de ácido láctico, CO₂, etanol y ácido acético.^[11]

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* y *Leuconostoc lactis* se encuentran formando parte de varios cultivos mesófilos comerciales y, por tanto, son los leuconostoc que mayor utilidad tienen en la industria.^[17] Además de metabolizar la lactosa, estas especies son capaces de metabolizar el citrato, haciendo posible la producción de compuestos aromatizantes como el diacetilo.

– Estreptococos

Los estreptococos son bacterias homofermentadoras de morfología cocácea que se asocian en cadenas o parejas. *Streptococcus thermophilus* es una de las especies más utilizadas en la industria láctea. Se emplea, en concreto, en la elaboración de yogur junto con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y también en la manufactura de quesos suizos e italianos junto a varias especies de lactobacilos termófilos. En los últimos años se ha extendido también su utilización conjunta con *L. lactis* para la fabricación de quesos como el Cheddar o el Manchego.^[18]

– Pediococos

Los pediococos son bacterias homofermentadoras, anaerobias facultativas y de morfología cocácea que se agrupan en tétradas. De las 8 especies que componen el género, dos son las que se emplean como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos: *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*.

Microbiota acompañante

Como ha sido comentado anteriormente, el queso posee una microbiota compleja donde las BAL, presentes de forma natural o tras la adición deliberada de fermentos, suelen estar acompañadas por una microbiota secundaria o acompañante. En ella se pueden encontrar tanto a especies de BAL que no participan de manera directa en la acidificación del medio, mayoritariamente lactobacilos y leuconostoc, junto con propionibacterias, corinebacterias, estafilococos, mohos, levaduras, etc.^[19,20] La presencia de estas poblaciones microbianas resulta, en ocasiones, indispensable para generar las características de tipicidad propias de cada producto.

Además de las poblaciones con un papel tecnológico, en la microbiota del queso pueden estar presentes bacterias oportunistas (enterococos, estafilococos, enterobacterias, etc.), e incluso, puntualmente, bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes*). El desarrollo descontrolado de alguno de estos grupos puede hacer que se produzcan defectos en las características organolépticas del queso, como la textura, el aroma o el sabor, o llegar incluso a comprometer el estado sanitario del producto.^[21] En algunos quesos, se ha observado este tipo de anomalías asociadas a una elevada presencia de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y otras especies de *Streptococcus*.^[22,23,24,25]

2.1.2. Resistencia a antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos y su modo de acción

El descubrimiento y utilización de los antibióticos supuso un gran avance en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La era de mayor apogeo en la investigación de nuevas drogas antimicrobianas comenzó con la aparición entre los años 40 y 70 de los betalactámicos, los glucopéptidos, los aminoglucósidos, el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos. Tras este periodo, el descubrimiento de nuevos compuestos sufrió un importante descenso, a excepción del hallazgo de las oxazolidinonas, los lipopéptidos y las mutilinas en el periodo comprendido entre el 2000 y el 2010.^[26,27] En la actualidad, es prácticamente inexistente la aparición de nuevos compuestos antimicrobianos.

Los grupos de antibióticos entre los que se encuentran aquellos de mayor relevancia por su utilización en clínica, veterinaria y agricultura se enumeran a continuación. Cada uno de ellos actúa ejerciendo una acción específica sobre alguna característica fisiológica o metabólica de los procariotas (Figura 1).

- Los aminoglucósidos, afenicoles, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas y tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica a través de su unión a alguna de las dos subunidades del ribosoma bacteriano.
- Los betalactámicos y glucopéptidos interfieren sobre la síntesis de la pared bacteriana.
- Los nitroimidazoles y las quinolonas inhiben la síntesis de ADN mediante la generación de daño oxidativo en las cadenas de ADN o inhibiendo la ADN girasa, respectivamente.
- Las rifamicinas inhiben la transcripción de ARN a través de su unión a la subunidad B de la ARN polimerasa.
- Las sulfanamidas, de estructura muy semejante al precursor del ácido fólico, actúan inhibiendo la síntesis de este metabolito primario, esencial para la supervivencia de muchas bacterias.

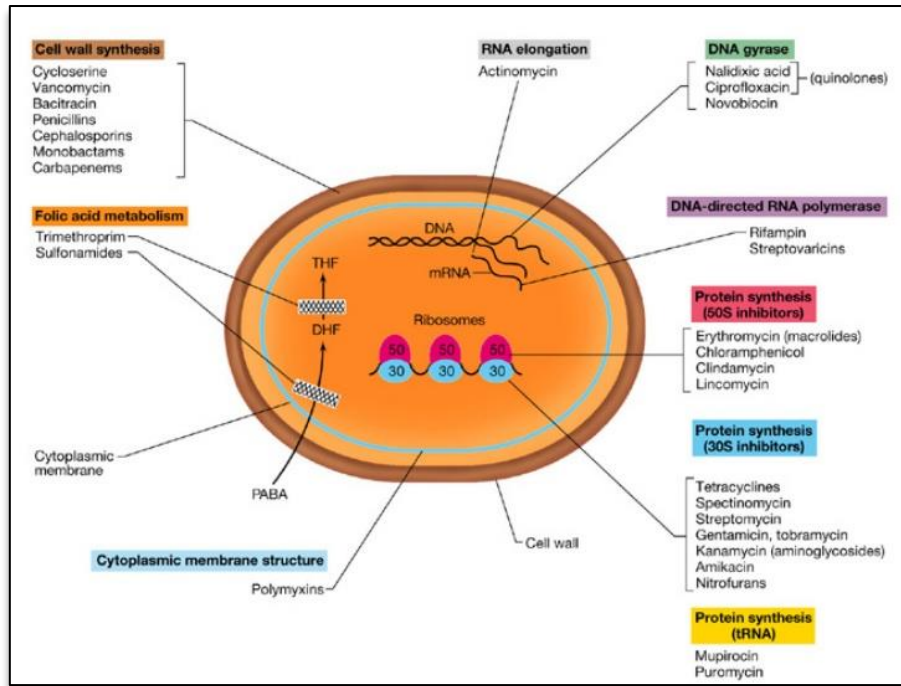


Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos.^[28]

A través de la Tabla S1 del Anexo se amplía esta información sobre los distintos grupos de antibióticos, su modo de acción, el espectro antimicrobiano, los métodos a través de los cuales las bacterias son capaces de vencer su acción y los tipos de antibióticos que se encuentran en cada grupo. Destacando para cada uno de ellos, por su amplio empleo en la industria alimentaria, las bacterias de BAL y de la microbiota acompañante que presentan resistencia.^[29,30,31,32,33,34]

Origen de la resistencia a los antibióticos

Los microorganismos (bacterias, hongos, virus, etc.) fueron los primeros organismos en poblar la Tierra. Por tanto, no es sorprendente que existan desde entonces diversidad de compuestos con actividad defensiva (antídotos), así como mecanismos de resistencia frente a su actividad. En ambientes no expuestos directamente a la actividad del hombre, existe una alta ubicuidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos que forman parte de la resistencia intrínseca y que se codifican en el cromosoma bacteriano.^[1] Sin embargo, nadie pone en duda de que el uso excesivo de los antibióticos desde su descubrimiento, ha propiciado la aparición y dispersión entre bacterias de genes de resistencia a antibióticos.

La resistencia a antibióticos en bacteria inocuas es preocupante porque pueden actuar como reservorios de estos genes y pueden transferirlos a bacterias patógenas,

comprometiendo así el tratamiento de las infecciones que causan. De hecho, este problema ha llegado a ser declarado como epidemia en la sombra por la Organización Mundial de la Salud, quien ya en 2015 aprobó un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.^[36] El objetivo del mismo versa sobre mejorar el conocimiento en torno a la resistencia antimicrobiana y la concienciación de la sociedad acerca de este problema, el reforzamiento de la base científica a través de la vigilancia e investigación, la reducción de la incidencia de las infecciones y la utilización de forma óptima de los antimicrobianos en la salud humana y animal.^[7,35]

Las primeras bacterias resistentes fueron detectadas pronto tras el comienzo de la utilización masiva de la penicilina a mediados de los años 40. Las primeras bacterias resistentes identificadas fueron de cepas de *S. aureus* portadoras de la enzima penicilasa. Estas no solo se mantenían en el ambiente hospitalario, sino que eran aisladas de todo tipo de ambientes, aspecto que no hizo más que incrementarse en cuestión de cincuenta años. Este hecho, pone de manifiesto que el problema de la resistencia a antibióticos debe ser abordado desde un punto de vista global puesto que existen diversas rutas de diseminación que comunican los distintos ambientes (clínica, aguas residuales, medio ambiente, alimentos, etc.) por las que se extienden los antibióticos y las resistencias hasta llegar a los microorganismos patógenos (Figura 2).

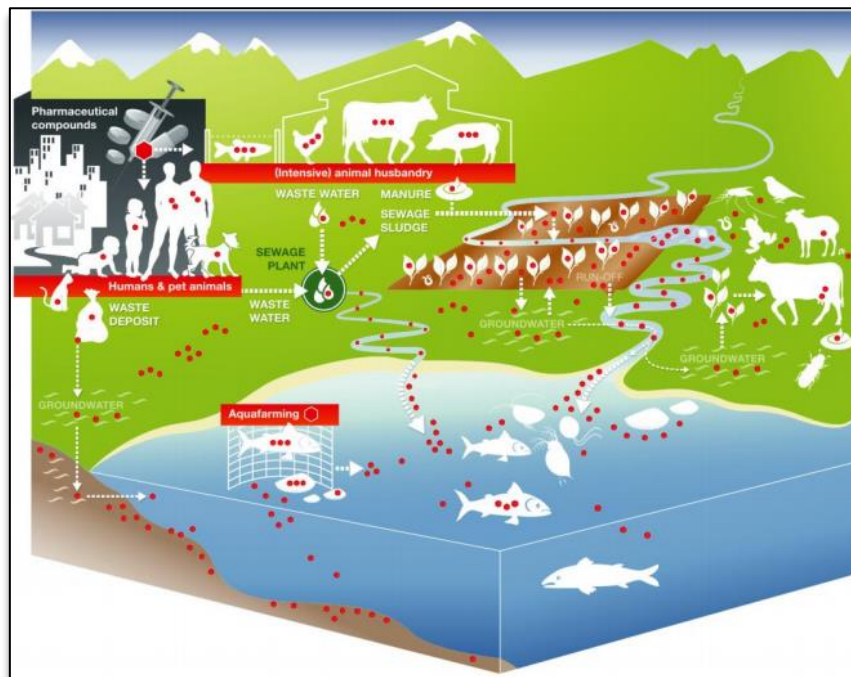


Figura 2. Dispersión de los antibióticos por el medio ambiente. Los puntos rojos representan los residuos de antibióticos.^[37]

Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a antibióticos puede presentarse de forma natural en una determinada especie o como en la mayoría de los aislados clínicos, adquirirse mediante mutaciones en el cromosoma bacteriano o por adquisición de ADN exógeno a través de mecanismos de transmisión horizontal.^[2] A continuación, se exponen los mecanismos por los cuales, las bacterias son capaces de resistir el efecto de los antibióticos ^[38]:

- Cambios en la permeabilidad de la pared celular, dificultándose el acceso de los antibióticos a la diana molecular de acción.
- Transporte activo del antibiótico al exterior.
- Modificación enzimática del antibiótico.
- Degradación del antibiótico.
- Activación de rutas metabólicas alternativas de aquellas que son inhibidas por el antibiótico.
- Modificación de la diana molecular de acción.
- Sobreproducción de la diana del antibiótico.

Movilización de genes de resistencia

La diseminación de la resistencia tiene lugar a través de la movilidad horizontal de genes de resistencia a antibióticos (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*). Esta movilidad se encuentra mediada a través de los elementos genéticos móviles (EGMs): plásmidos, transposones, integrones o bacteriófagos. Hay numerosos estudios que revelan que aproximadamente el 75% de los genes de los genomas bacterianos, entre los que se encuentran los genes de resistencia a antibióticos, han sido adquiridos mediante transferencia génica horizontal a lo largo de toda la evolución.^[3] Los principales mecanismos de transferencia horizontal son la transformación, la conjugación y la transducción (Figura 3). A continuación, se describirá brevemente en qué consiste cada uno de estos procesos.

- Transformación: consiste en la adquisición por parte de la bacteria de ADN libre exógeno. Esto puede suceder por dos vías: la bacteria se encuentra en estado de adquirirlo (competente), o las condiciones ambientales favorecen la incorporación.^[39]
- Conjugación: se trata de una transferencia directa de ADN a través de un pili conjugativo entre una bacteria donadora y otra receptora. Este mecanismo se

considera el principal para la transmisión de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos a través de bacterias.^[40]

- Transducción: el ADN en este caso es transferido de una bacteria donadora a otra receptora a través de un bacteriófago. Para que tenga lugar la transducción entre el donador y el receptor no tienen por qué coincidir en espacio y tiempo.

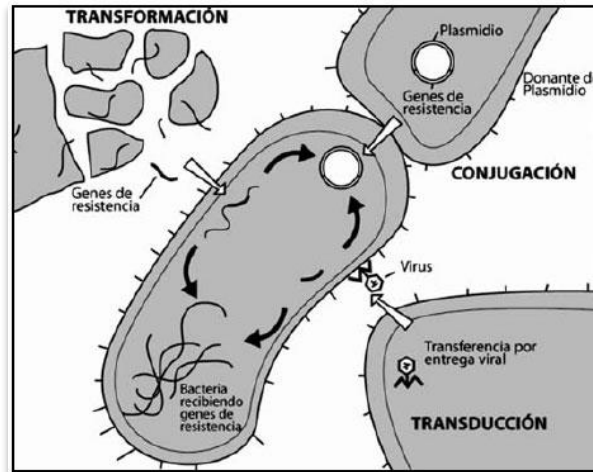


Figura 3. Mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia.^[41]

2.1.3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan bacterias. Fueron descubiertos de forma independiente por los microbiólogos Frederick W. Twort en 1915 y Félix d'Hérelle en 1917, siendo la última clase principal de virus en ser descubierta.^[42]

Los fagos están considerados como la forma de vida más exitosa sobre la Tierra, donde se calcula que existen aproximadamente 10^{31} partículas fágicas.^[4] Pese a ser el sistema biológico más simple, han sido capaces de adaptarse a cualquier hábitat y de infectar a todos los procariotas, modulando la evolución de estos.^[6,7]

Ciclos de replicación en bacteriófagos

Los bacteriófagos pueden seguir dos tipos de ciclos de vida en función del virus y de las condiciones ambientales: lítico o lisogénico.^[6]

- *Fagos líticos o virulentos.* Caracterizados por provocar la lisis de las células hospedadoras, liberando una nueva progenie fágica. El ciclo lítico se divide en las siguientes etapas (Figura 4)^[43]:

1. **Fase de adsorción del fago a la bacteria.** Tiene lugar cuando por azar coincide un fago con una célula bacteriana. Si el fago reconoce un receptor específico en la

superficie celular, se produce la adsorción. Normalmente, los receptores celulares suelen ser de naturaleza polisacáridica, como en el caso de las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* y *Lactobacillus*, lipoproteica o de ambas clases. Puesto que la síntesis de los receptores viene determinada por el genoma bacteriano, una mutación puntual, puede provocar que una bacteria sensible se convierta en una bacteria resistente a la infección viral.

2. **Inyección del ADN fágico** desde la cabeza del fago hasta el interior del citoplasma bacteriano, quedando la partícula fágica vacía en el exterior o fijada en la superficie bacteriana. Tras la inyección del material genético se interrumpe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedador. De esta manera, la maquinaria metabólica de la bacteria se pone a disposición del fago para la síntesis de su genoma y de sus proteínas estructurales.
3. **Transcripción del ADN viral** por parte de la ARN polimerasa bacteriana y **traducción del ARNm** a enzimas fágicas. Una parte de estas enzimas se encargan de inhibir el metabolismo bacteriano, y la otra fracción, de dirigir la replicación del ADN fágico. Así, se irán acumulando tanto las proteínas estructurales como el genoma viral en el citoplasma.
4. **Acoplamiento de los componentes virales** dando lugar al virión maduro.
5. **Lisis celular y liberación de los viriones.** Normalmente, la lisis requiere la actuación de dos enzimas fágicas. La holina actúa desorganizando la membrana celular, generando poros en la pared y favoreciendo la actividad de la endolisina, enzima encargada de hidrolizar los enlaces que unen los azúcares que forman el peptidoglicano. Así, la estructura de la pared se debilita y la lisis tiene lugar por aumento de la presión osmótica interna, liberándose de esta manera los fagos al medio externo, junto con el contenido celular.

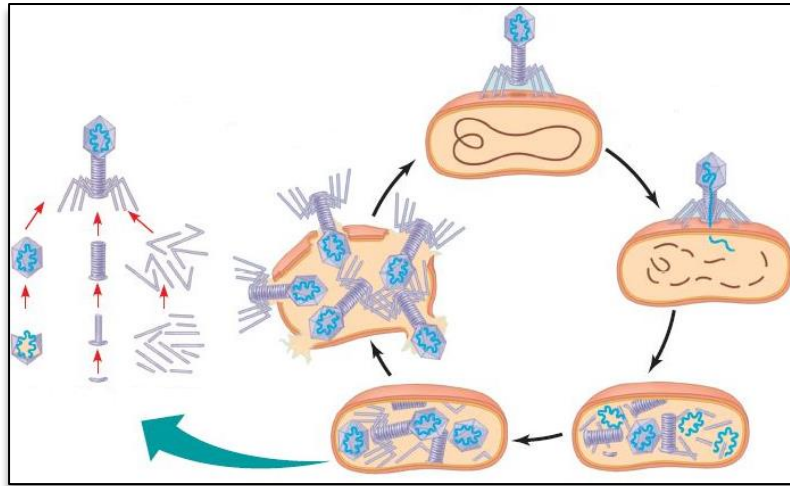


Figura 4. Fases del ciclo lítico.

- *Fagos atemperados o lisogénicos.* En este caso, tras producirse los eventos de adhesión e inyección del ADN fágico en la bacteria, este se puede integrar en el cromosoma bacteriano y replicarse, transmitiéndose a la progenie bacteriana, sin que tenga lugar la lisis celular. Si bien, bajo ciertas condiciones esta podría inducirse. La lisogenia se encuentra fundamentalmente regulada por los genes *int*, *cI* y *cro*. Mientras el primero de ellos regula la integración del ADN fágico, los otros dos tienen funciones contrapuestas. El gen *cI* inhibe la expresión de los genes vinculados con la activación del ciclo lítico y el gen *cro* se encarga de inhibir los relacionados con la lisogenia.^[44]

La inducción del ciclo lítico desde un periodo de lisogenia puede provocarse espontáneamente o bien verse estimulado por un estrés externo que causa daño en el ADN bacteriano: exposición a luz UV, presencia de antibióticos, sal, etc. Bajo estas condiciones, se activa el sistema SOS, que, entre otras consecuencias, provoca la inducción de los profagos, ocasionándose así la posibilidad de diseminar resistencias a antibióticos, factores de virulencia, toxinas, etc., de unas bacterias a otras.^[45,46]

Bacteriófagos en los productos lácteos

Hasta la fecha, han sido descritos cerca de 5.500 bacteriófagos pertenecientes al orden de los *Caudovirales* (fagos con cola) capaces de infectar a una gran diversidad de huéspedes bacterianos,^[5] entre los que se encuentran las BAL y bacterias de la microbiota acompañante (enterobacterias, estafilococos, etc.). Morfológicamente están compuestos por una cápside proteica de simetría icosaédrica unida a través de un cuello a una cola de

longitud y contractibilidad variable. Mediante estas características, se diferencian tres familias principales: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Figura 5).^[45,47]

Los fagos que infectan de manera específica a las BAL (denominados también lactofagos), pertenecen a la familia *Siphoviridae* y poseen como material genético ADN lineal de doble cadena, con un tamaño variable entre 18 y 55 Kb.^[48,49] Los fagos que infectan a *L. lactis* se clasifican en 10 grupos, aunque la mayoría pertenecen a los grupos c2, 936 y P335. En los dos primeros se encuentran fagos líticos y en el último grupo tanto líticos como atemperados.^[49,50] Cuando las BAL son atacadas por bacteriófagos se produce una reducción o fallo en la acidificación/fermentación y por tanto en el descenso del pH, causando graves pérdidas económicas por la obtención de productos de baja calidad y en los que se pueden desarrollar microorganismos contaminantes y patógenos.

Asimismo, puesto que las BAL se encuentran acompañadas por otro tipo de poblaciones bacterianas como es el caso de las enterobacterias o los estafilococos, sus fagos también estarán presentes. Algunos de los fagos más representativos son DT1, P22, EC6 o EC9 que infectan a algunas de las enterobacterias y los fagos Φ c1, Φ P1, Φ H5 o Φ A72 que infectan a varias cepas de estafilococos.^[51,52,53]

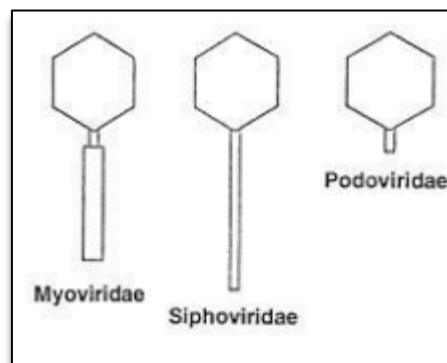


Figura 5. Representación gráfica de las tres familias de bacteriófagos principales, *Myoviridae* (de colas largas y contráctiles), *Siphoviridae* (de colas largas y no contráctiles) y *Podoviridae* (de colas cortas).^[54]

Mecanismos de transmisión horizontal de genes a través de fagos: transducción

La transducción tal como se comentó anteriormente, es la transferencia horizontal de genes mediada por fagos. Este proceso impulsa la evolución de las bacterias y puede darse principalmente por dos mecanismos: la transducción generalizada y la transducción especializada (Figura 6). Cuando una partícula de transducción generalizada o un fago atemperado se introduce en el interior de una bacteria receptora y le transmite el nuevo material genético, se produce el fenómeno conocido como conversión, siendo en muchos

casos usual, el cambio fenotípico que puede afectar a diversos rasgos bacterianos como la virulencia, la motilidad o la competencia.^[55]

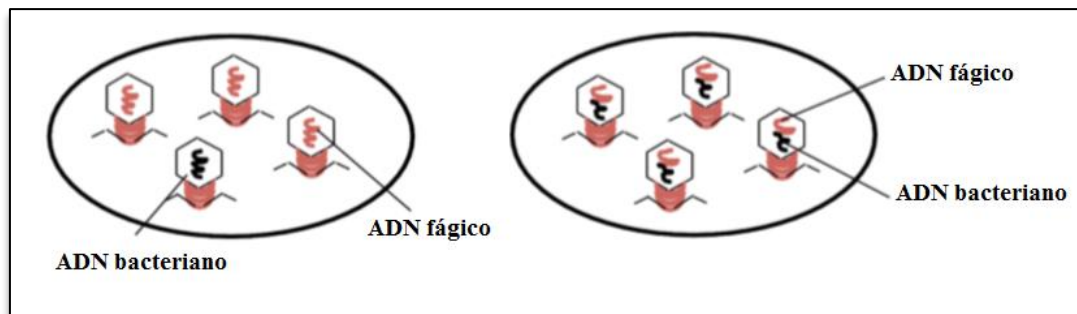


Figura 6. Mecanismos de transducción (generalizada, izq. y especializada, der.).^[56]

La transducción generalizada, es el resultado de errores en el empaquetamiento del ADN fágico durante el ciclo lítico, pudiendo además empaquetar aleatoriamente fragmentos de ADN cromosómico o plasmídico del hospedador. Las partículas virales que se generan pueden infectar a nueva bacteria que sea sensible al fago en cuestión. De esta manera, el ADN podría incorporarse por recombinación en su genoma, pudiéndose transferir, factores de virulencia, resistencias, etc. (Imagen de la izquierda de la Figura 6)^[56,57,58]

En la transducción especializada, la escisión incorrecta tiene lugar en el profago, lo que conduce al empaquetamiento del material genético de este junto con una pequeña fracción de ADN cromosómico contigua a esta región. Este proceso se lleva a cabo exclusivamente por fagos lisogénicos a diferencia del anterior proceso. La presencia de estos profagos atemperados en las bacterias les confiere en mayor o menor medida resistencia a la superinfección (Imagen de la derecha de la Figura 6)^[58]

Contribución de los bacteriófagos a la dispersión de la resistencia a antibióticos

Pese al desconocimiento inicial por el papel de la transducción en la movilización de genes de resistencia a antibióticos, son cada vez más los estudios metagenómicos que aportan evidencias de que la dispersión de la resistencia a antibióticos por medio de bacteriófagos ocurre más frecuentemente de lo que cabría pensar.

Cuando se produce una infección, el fago le transmitirá a otra bacteria algún fragmento de material genético bacteriano procedente de una infección anterior, con la posibilidad de que este contenga genes, por ejemplo, de resistencia a antibióticos,

propiciando de esta manera, la expansión de resistencia en los ecosistemas. Además, cuando el fago en cuestión se encuentra como profago integrado en el genoma bacteriano, una situación de estrés, como concentraciones subletales de antibióticos en el medio, puede inducir la activación del ciclo lítico de los lisógenos e incrementar el número de partículas virales infectantes que pueden llevar en su genoma viral genes de resistencia con capacidad de ser transferidos posteriormente.^[1,6,8]

2.1.4. Antecedentes en el estudio de transmisión y movilización de genes de resistencia desde fagos a bacterias en varios ecosistemas

Los bacteriófagos se tratan de entidades acelulares presentes en todo tipo de ambientes en enormes cantidades (10^{31}). Sin embargo, el estudio acerca de su capacidad para captar y transferir genes de resistencia a antibióticos entre bacterias era hasta hace pocos años marginal con respecto a otros mecanismos. A continuación, se resumen brevemente los antecedentes bibliográficos más destacados, relacionados con la presencia de genes de resistencia a antibióticos en el ADN fágico en diversos ambientes y la posibilidad de que estos sean transferidos a través del proceso de transducción a bacterias que pueden ser en muchos casos patógenas o alterantes.

Muniesa y colaboradores estudiaron en muestras de vegetales frescos y en el suelo agrario la presencia de genes de resistencia en el ADN de la fracción fágica. Estos estudios, demostraron que existe una elevada prevalencia en genes codificantes de betalactamasas.^[59] Estos mismos autores persiguiendo un objetivo semejante, realizaron una búsqueda esta vez en muestras de heces de animales, empleando la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Nuevamente, se detectaron niveles considerables de genes que codifican para betalactamasas, pero también, genes que confieren resistencia a quinolonas y a meticilina. A la vista de los resultados, los autores concluyeron que es posible la dispersión de resistencia a través de fagos y que a diferencia de las bacterias o del ADN desnudo estos presentan mayor resistencia a una gran diversidad de condiciones ambientales, haciendo que sean muy difíciles de erradicar.^[60]

Balcázar y colaboradores desarrollaron un estudio metagenómico para la detección de genes de resistencia en los bacteriófagos presentes en aguas residuales. En este trabajo demostraron que la abundancia relativa de estos en la fracción fágica (0,26%) era comparativamente mayor que en la fracción bacteriana (0,18%), especialmente en los genes que codifican para proteínas del sistema ABC, proteínas RND (resistencia-

nodulación-división), fosfotransferasas, betalactamasas y proteínas de resistencia a quinolonas. Estos hallazgos corroboran nuevamente el papel que tienen los fagos como reservorios y agentes de dispersión de genes de resistencia, lo cual hace necesario estudiar profundamente su impacto en el medio ambiente.^[61]

En la mayoría de los estudios, los ambientes explorados en busca de bacteriófagos se encuentran relacionados con aguas residuales, suelo, heces de animales o algunas matrices alimentarias como la carne o los vegetales; sin embargo, son pocas las investigaciones sobre los productos lácteos, ambiente en que la presencia de fagos resulta en muchos casos devastadora en la fermentación. Por esta razón, el objetivo de este trabajo se ha centrado en aislar y extraer el ADN de los fagos presentes en tres matrices lácteas, analizar su contenido en genes de resistencia a antibióticos y demostrar si hay o no una cierta vinculación con los genes presentes en el ADN de las bacterias, con el fin de determinar si existe o no la posibilidad de una transferencia horizontal génica entre ambas poblaciones.

2.2. CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES

El impacto que suponen las infecciones fágicas sobre el curso de la fermentación, reduciendo la actividad del cultivo iniciador y llegando incluso a provocar la detección total del proceso, ha llevado a la implantación de métodos y técnicas que permitan la detección de distintos fagos en el medio.

2.2.1. Métodos clásicos para la detección de bacteriófagos

Comenzando con los métodos clásicos, que, pese a que requieren un largo tiempo de ensayo y necesitan una extensa biblioteca de huéspedes bacterianos para reducir la posibilidad de obtener falsos positivos, cuentan con una elevada sensibilidad, son útiles para el estudio de distintas matrices lácteas, permiten desarrollar análisis cuantitativos y determinar exclusivamente el número de partículas infectantes.^[62]

Entre estos métodos caben destacar, los test de actividad, los ensayos en placa, el test de turbidimetría, el test de infectividad o *spot test* o el monitoreo de los niveles de acidificación del medio.^[63] En concreto, en este trabajo, se empleó la técnica *spot test* para determinar la presencia de fagos líticos en la muestra. Se trata de un método sencillo en el que una muestra de bacteriófagos se inocula sobre una capa de agar semisólido-sólido en la que se encuentra creciendo un huésped bacteriano concreto. Si aparecen calvas de inhibición donde los fagos fueron inoculados, se revela que estos son capaces de infectar de manera específica a ese huésped que emplearán para multiplicarse siguiendo el ciclo vital lítico (Figura 7).

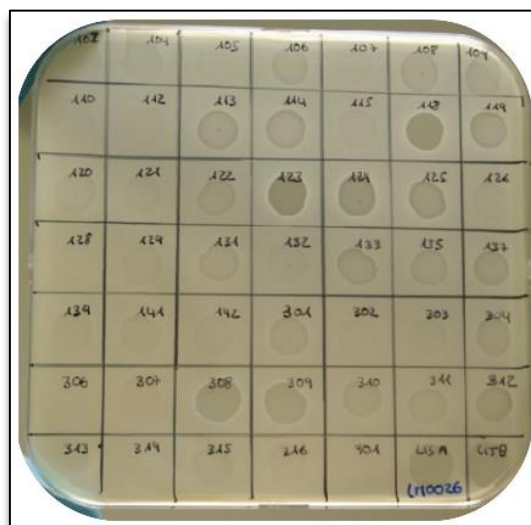


Figura 7. Test de infectividad fágica.

2.2.2. Métodos moleculares para la detección de bacteriófagos

La bajada en los precios tanto de los reactivos como de las técnicas de biología molecular, junto con la compilación de más información sobre los genomas virales de los bacteriófagos, ha permitido dar paso al desarrollo e implementación universal de métodos moleculares para su detección. Principalmente se usan los ensayos basados en la PCR (PCR simple, PCR múltiple, qPCR) que permiten detectar, amplificar y cuantificar ADN de una gran diversidad de fagos como aquellos que infectan a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, etc. con una elevada sensibilidad (LOD = 10^3 – 10^7 ufp/mL).^[63]

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para detectar e identificar ADN fágico y bacteriano procedente de distintas matrices lácteas, así como de la presencia en sus materiales genéticos de varios genes de resistencia a antibióticos. La PCR consiste en la amplificación de un fragmento de ADN específico durante varios ciclos repetidos en los que se generan multitud de copias del ADN diana por medio de la actividad de la enzima ADN polimerasa. Los equipos que se emplean reciben el nombre de termocicladores y en ellos se programan una serie de condiciones de tiempo y temperatura para que tengan lugar las etapas de desnaturalización, unión de los oligonucleótidos y extensión del ADN molde.

Para que la reacción de amplificación tenga lugar es necesario disponer del ADN molde, los oligos diseñados específicamente para unirse a una fracción concreta del ADN, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), una enzima ADN polimerasa termorresistente y un tampón que contenga iones Mg^{2+} . El proceso de amplificación (Figura 8) se describe a continuación.

En primer lugar, tiene lugar la desnaturalización del ADN molde a una temperatura de 94-95°C, el tiempo de esta etapa depende del porcentaje de G+C, pero habitualmente suele ser un proceso de 5 min. A continuación, tienen lugar varios ciclos (35-40) de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión de los oligos a la secuencia complementaria del ADN a una temperatura específica que oscila entre 40 y 68°C durante 20-40 segundos y una etapa de extensión a 72°C en la que la ADN polimerasa incorpora los dNTPs complementarios, con el fin de generar cadenas completas de ADN. Habitualmente, tras repetirse estas tres etapas durante varios ciclos

tiene lugar una etapa de extensión final a 72°C para asegurar que todo el ADN tiene doble cadena. [62,63,64,65]

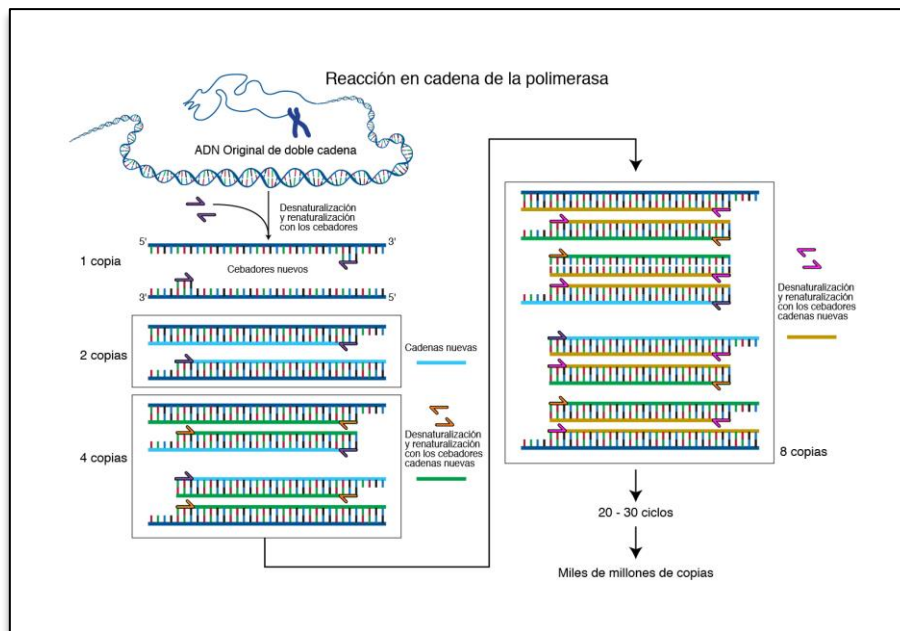


Figura 8. Componentes y etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [66]

PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) va un paso más allá de la PCR convencional, pues permite el monitoreo y la cuantificación del ADN diana a tiempo real permitiendo una detección y cuantificación rápida, cualidad indispensable en la industria. De igual modo que la PCR convencional el ADN se amplifica mediante los 3 pasos de desnaturalización, anillamiento y elongación, con la diferencia que la detección del producto de PCR se lleva a cabo por medición de intensidad de fluorescencia (Figura 9). Por tanto, o bien se añade un fluorocromo con afinidad por el ADN de doble cadena o una sonda fluorescente. En nuestro caso particular, fue empleado el fluorocromo SYBR Green que al unirse al ADN emite luz de color verde y cuanto mayor sea la intensidad detectada mayor será la concentración de ADN. Es posible, además, el empleo de diferentes fluorocromos para poder detectar simultáneamente varias secuencias dianas, que podrían corresponderse con distintos fagos, en una misma reacción (qPCR múltiple). [62,63,64,65]

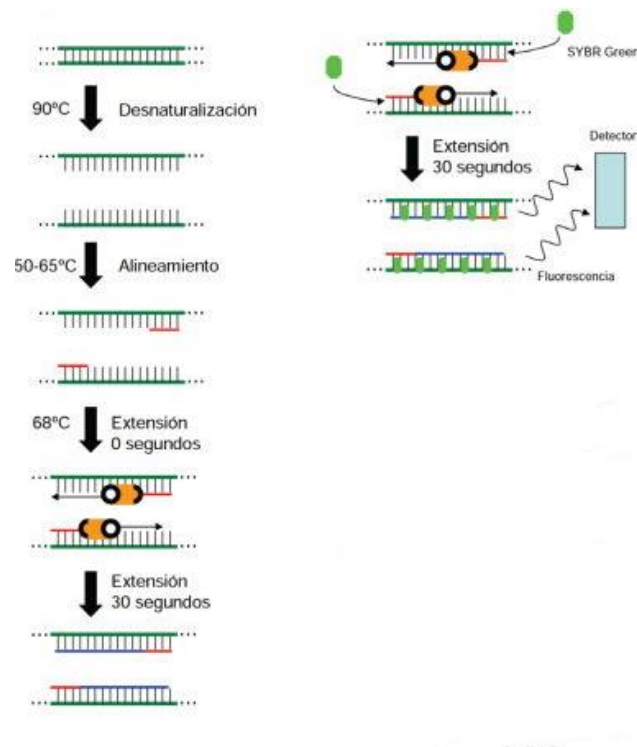


Figura 9. Etapas que tiene lugar en un ciclo de qPCR empleando el fluorocromo SYBR Green.^[67]

Puesto que estas técnicas moleculares están basadas en ADN, no tienen la capacidad de distinguir, como los métodos clásicos, entre unidades infectivas o no. Pese a esto, su capacidad para una detección rápida permite ser aplicadas en la industria a la hora de decidir el destino de una materia prima para una u otra actividad, en función de su contenido en ADN fágico.

2.2.3. Detección de fagos mediante microscopía electrónica de transmisión

Otros métodos como la citometría de flujo, la inmunodetección o la microscopía electrónica, pueden también aportar información entre otras cosas, del grado de infectividad celular, del número de partículas fágicas o sobre propiedades características de estas.^[63] De hecho, en este trabajo fue empleada la microscopía electrónica de transmisión para la visualización y posterior caracterización de los fagos aislados.

La microscopía electrónica de transmisión se trata de un sistema de producción de imágenes con una resolución que permite la ampliación de las muestras de hasta 400 mil veces, haciendo posible analizar partículas o moléculas aisladas tan pequeñas como los virus.

La configuración del microscopio electrónico es muy similar a la del óptico con la diferencia de que son electrones en vez de fotones los que interactúan con los

componentes de la muestra (Figura 10). Tras atravesar la muestra y llegar a una lente denominada objetivo, se forma una señal que es aumentada a su vez por diversas lentes antes de llegar al detector. En él la señal eléctrica es captada y transformada en una imagen formada por zonas electrodensas y electrotransparentes debido al equilibrio generado entre la cantidad de electrones que llegan al detector y los que no.^[68]

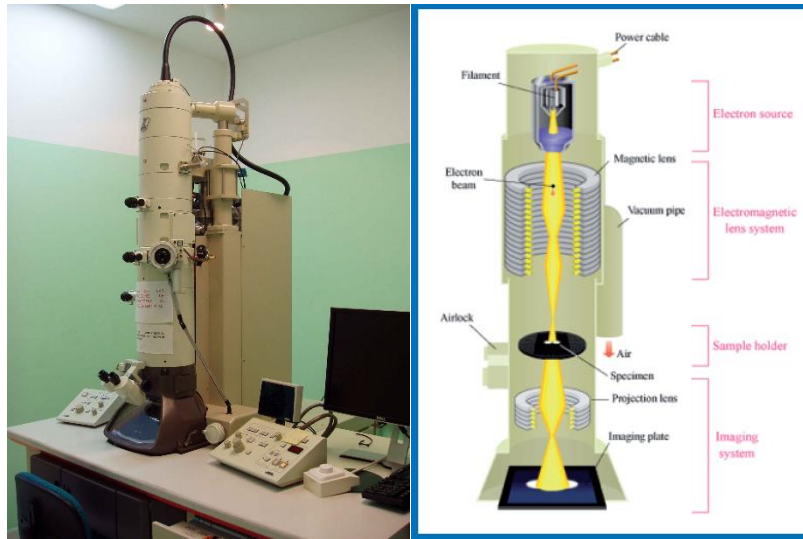


Figura 10. Microscopio electrónico.



3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Muestras

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon muestras de tres matrices lácteas diferentes que forman parte del proceso de elaboración del queso Cabrales D.O.P.: leche, cuajada y queso. En total, se analizaron cuatro leches, tres cuajadas y sus respectivos quesos maduros de Cabrales, procedentes de diferentes elaboradores, y en los que en su elaboración no fueron añadidos cultivos iniciadores.

3.2. Purificación de la fracción fágica

La leche (80 mL) se diluyó 1:5 (v/v) en citrato sódico 2% (p/v) y la mezcla resultante fue centrifugada a una velocidad de 10.000 x g durante 30 min a 4°C. La capa de grasa presente en la superficie fue eliminada y se volvió a centrifugar durante 15 min a 10.000 x g y 4°C hasta conseguir un sobrenadante transparente.

En las muestras de cuajada y queso, se tomaron 10 g y se homogenizaron con 90 mL de citrato sódico 2% (p/v) en una bolsa estéril con filtro, utilizando un Stomacher Colworth 400 (Seward Ltd., Reino Unido), durante 3 min aproximadamente. Seguidamente, el volumen recuperado se centrifugó a una velocidad de 10.000 x g durante 30 min a 4°C. El proceso de centrifugación se repitió varias veces hasta eliminar la grasa de la superficie y obtener un sobrenadante transparente.

El sobrenadante extraído en ambos procesos se filtró secuencialmente a través de filtros de baja unión de proteínas (PES, polietersulfona) con un tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm. El filtrado obtenido se diluyó 1:5 (v/v) en el tampón SM (200 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ y 50 mM Tris pH 7,5) suplementado con un 10% de polietilenglicol (PEG) 8000 (Sigma-Aldrich, EEUU). Las partículas virales se mantuvieron precipitando a 4°C entre 24 y 72 h.

Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 13.000 x g durante 1 h a 4°C y el sobrenadante fue desechado manteniendo un cierto volumen (50 µL) que una vez resuspendido en el primer tubo, se trasvasó y se resuspendió en los sucesivos tubos, hasta quedarse con uno solo que contuviese todos los volúmenes anteriores. Con el fin de concentrar, 200 µL del volumen de muestra anterior fue transferido a un tubo limpio conteniendo 800 µL del tampón SM suplementado con el 10% de PEG 8000. Esta mezcla se mantuvo precipitando a 4°C durante 24 h. Las partículas virales se precipitaron mediante una centrifugación a 30.000 x g durante 1 h a 4°C.

Para eliminar las vesículas que pudieran portar ADN en su interior, las muestras fueron tratadas con cloroformo (1:10 v/v) y la mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 5 min, se centrifugó a 15.000 x g durante 5 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa conteniendo las partículas fágicas.

3.3. Ensayo de infectividad

El ensayo de infectividad utilizando la fracción fágica extraída y varias cepas susceptibles de infección de lactococos (1363, Q1-2, CAS-2, 171A(B), 2BA40 y Lc83A) y de *Escherichia coli* CECT 9198 se utilizó para determinar cualitativamente la presencia de bacteriófagos en las muestras de leche, cuajada y queso. Para ello, tras el crecimiento de las cepas durante 24 h en cultivo líquido en los medios M17 suplementado con glucosa (1% p/v) (GM17) a 32°C para el caso de los lactococos y 2xTy a 37°C, en el caso de *E. coli*, fueron extraídos 150 µL de estos cultivos crecidos y añadidos sobre 15 mL de medio de cultivo semisólido (0,7% de agar) de GM17 y 2xTy, según correspondiese. Sobre medios de cultivo sólido de GM17 y 2xTy, fue añadida la anterior solución y tras dejar secar la monocapa, en puntos concretos de las placas fueron añadidos 10 µL de los sobrenadantes fágicos tratados con cloroformo y los correspondientes controles positivos para cada cepa. Tras una incubación a 32-37°C durante 24-48 h, en el caso de que en las muestras ensayadas se encuentren fagos capaces de infectar específicamente a las cepas ensayadas, se debería de observar halos de lisis en el crecimiento bacteriano en césped.

3.4. Detección mediante microscopía electrónica de transmisión de la fracción fágica

Para la visualización mediante microscopía electrónica de transmisión de los bacteriófagos presentes en las tres matrices, fue necesario llevar a cabo un proceso de concentración, empleando filtros centrífugos Amicon Ultra de 100 kDa (Millipore, EEUU) para un volumen final de 0,5 mL, para lo cual fue seguido el protocolo que indica el fabricante. Las muestras fueron analizadas en el servicio de microscopía electrónica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid.

3.5. Extracción del ADN fágico

La extracción del ADN fágico se realizó a partir de la solución acuosa (500 µL) que contenía las partículas fágicas presentes en las muestras lácteas. Esta fue tratada con 50 µL de DNAasa I (1U/ µL) obtenida de la casa comercial Sigma-Aldrich, y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, fue inactivada con la adición de 5 µL de EDTA (5 mM, pH 8) e incubando durante 10 min a 75°C.

Para confirmar la ausencia de ADN no encapsulado se llevó a cabo una comprobación mediante qPCR, empleando como secuencia diana un fragmento del gen 16 S rDNA. Las amplificaciones se realizaron por duplicado en un volumen final de 20 μL , conteniendo 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix (incluyendo ROX como colorante de referencia pasiva) (Applied Biosystems, EEUU), 0,9 μL de cada oligo universal para bacterias (HDA-1 y HDA-2), 6,2 μL de agua de grado molecular (Sigma-Aldrich) y 2 μL del ADN muestra, ADN control o agua de grado molecular, para los controles positivo y negativo, respectivamente. Para la amplificación se establecieron las siguientes condiciones en el termociclador 7500 Fast Realtime PCR System (Applied Biosystems, EEUU): un ciclo inicial a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 1 min a 60 °C.

Tras comprobar la ausencia de ADN libre, se llevó a cabo una etapa de digestión de la cápside fágica mediante la adición de 15 μL de SDS 10% y 5 μL de proteinasa K (20 mg/mL) (ThermoFisher, EEUU) y manteniendo la mezcla incubando durante 1 h a 55 °C.

Para la purificación del ADN fágico se utilizó una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1 *v/v*) y para la precipitación se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 5,2) y se mantuvo a -20°C durante una noche.

Con el fin de cuantificar tanto la concentración como la pureza del ADN fágico extraído, se realizó un ensayo espectrofotométrico empleando el espectrofotómetro VIS-UV para microplacas Epoch™ (Biotek, EEUU).

3.6. Comprobación mediante PCR de la eficiencia en la extracción del ADN fágico

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del protocolo de extracción en las tres matrices lácteas, fueron tomadas una serie de alícuotas en distintas etapas del proceso (Figura 11): (1) del homogenizado de la muestra con Stomacher, (2) tras el filtrado por 0,45 μm , (3) tras el filtrado por 0,22 μm , (4) tras la etapa de concentración y finalmente del ADN fágico extraído.



Figura 11. Etapas en las que fue tomada una alícuota para realizar el seguimiento de la población fágica a lo largo del proceso de extracción del ADN.

Para llevar a cabo la detección fueron empleados tres parejas de oligonucleótidos (936A, 936B; c2A, c2B y 335A y 335B) que amplifican varias regiones del ADN de tres grupos de fagos (936, c2, y P335) que infectan a *L. Lactis* y que se encuentran ampliamente extendidos en los productos lácteos.^[69]

La reacción de amplificación se desarrolló en un volumen final de 25 µL que contenía 12,5 µL de Taq DNA Polymerase Master Mix Kit (Ampliqon, Dinamarca), 1 µL de cada oligo, 3 µL de muestra y 7,5 µL de agua de grado molecular. Como control positivo del ensayo se utilizó ADN de un cóctel de fagos de colección que infectan a *L. lactis* y como control negativo se sustituyó el ADN fágico por agua de grado molecular.

Todas las reacciones fueron desarrolladas en el termociclador Bio-Rad MyCycler gradient siguiendo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C y una etapa final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% (*p/v*) en tampón TAE 1x (Tris-acetato 0,04 M y EDTA 1 mM, pH 8,0) teñido con el colorante RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) y visualizados mediante el transilumador G: BOX Chemi XRQ (Syngene International, India).

3.7. Análisis microbiológico de cuajada y queso de Cabrales

Para el análisis microbiológico de aquellas muestras en las que fueron detectados fagos (cuajada y queso), se tomaron 10 g que fueron diluidos 1:10 (*v/v*) en una solución estéril de citrato sódico 2% (*p/v*) y homogeneizado mediante un Stomacher a máxima velocidad durante 3 min. A partir de esta mezcla se realizaron diluciones seriadas en una solución de Ringer estéril (VWR International, EEUU). Para el recuento de bacterias

mesófilas aerobias se utilizó el medio general Brain Heart Infusion (BHI) (Merck KGaA, Alemania) suplementado con un 2% (*p/v*) de agar bacteriológico. Para el recuento del grupo microbiano que engloba a estafilococos, micrococos, etc. se empleó el medio moderadamente selectivo y de diferenciación Baird-Parker (BP) (Merck KGaA, Alemania) suplementado con telurito potásico (0,1 mL por 9 mL de medio) y con un 2% (*p/v*) de agar bacteriológico. Finalmente, para el recuento de enterobacterias totales fue empleado el medio selectivo Violeta Rojo y Bilis Dextrosa (VRBD) (Merck KGaA, Alemania) suplementado con un 2% (*p/v*) de agar bacteriológico. Para evitar que en los medios se desarrollasen hongos y levaduras que pudiesen interferir en el crecimiento bacteriano, sobre todo en las muestras de queso, todos los medios fueron suplementados con el antifúngico cicloheximida (100 µg/mL).

Con el objetivo de evaluar las poblaciones bacterianas presentes en la cuajada y el queso que fueran resistentes a antibióticos, a los medios de cultivo se les añadió un amplio rango de antibióticos pertenecientes a las familias más representativas de antimicrobianos: tetraciclina (25 µg/mL; tetraciclina), eritromicina (25 µg/mL; macrólido), cloranfenicol (50 µg/mL; afenicol), kanamicina (50 µg/mL; aminoglucósido), ampicilina (100 µg/mL; betalactámico), vancomicina (25 µg/mL; glucopéptido), ciprofloxacino (25 µg/mL; fluoroquinolona) y cefotaxima (15 µg/mL; cefalosporina de 3^a generación) adquiridos en Sigma-Aldrich.

Tras una siembra en superficie de 100 µL de las diluciones adecuadas sobre los medios de cultivo sin suplementar o suplementados con antibióticos, las placas de BP y VRBGA se incubaron a 37°C y las de BHI a 30°C. Tras 48-72 h de incubación en condiciones de aerobiosis, se procedió al recuento de colonias.

3.8. Extracción de ADN bacteriano de cuajada y queso de Cabrales

En aquellas placas utilizadas para los recuentos microbiológicos en los que fue observado crecimiento bacteriano en confluencia, se recogió toda la masa celular y se conservó a -80°C en medio BHI suplementado con glicerol (20% *v/v*). A partir de este stock se realizó la extracción del ADN total de bacterias cultivables. Tras una descongelación rápida a 37°C, se tomó una alícuota de 180 µL y se realizó una centrifugación a máxima velocidad, tratando el pellet celular resultante con 180 µL de tampón de lisis conteniendo 20 mg/mL de lisozima (Merck, Alemania), 200 U de mutanolisina (Sigma-Aldrich, EEUU) y 50 µg/mL de lisostafina (Sigma-Aldrich, EEUU),

20 mM de Tris-HCl pH 8,0; 2 mM de EDTA y 1,2% de Triton-X-100 (Merck, Alemania). El proceso de lisis se realizó a 37°C durante 45 min y a 55°C durante 15 min. Tras la lisis, se continuó con la extracción del ADN con el Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Alemania) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

3.9. Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR

A partir del ADN fágico y bacteriano extraído de las muestras de cuajada y queso se llevó a cabo un estudio para evaluar su contenido en genes de resistencia a antibióticos mediante PCR convencional.

La amplificación se llevó a cabo mediante el termociclador Bio-Rad MyCycler gradient con las condiciones y los oligonucleótidos que se describen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de PCR y oligos empleados para la cuantificación de genes de resistencia en la fracción fágica y bacteriana presentes en cuajada y queso.

Primer	Secuencia	Condiciones de PCR	Amplicón (pb)	Resistencia	Referencia
<i>bla</i> _{TEM} -R	5'CTCACCCAGAAACGCTGGTG 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-30 s, 55°C- 45 s, 72°C-45 s], 72°C-7 min, 4°C-15 min	569	Betalactámico	[70]
<i>bla</i> _{TEM} -F	5'ATCCGCCTCCATCCAGTCTA 3'				
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -R	5'ACGTTAAACACCGCCATTCC 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-30 s, 55°C- 45s, 72 °C-45 s], 72°C-7 min, 4°C-15 min	356	Betalactámico	[70]
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -F	5'TCGGTGACGATTTTAGCCGC 3'				
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -R	5'ACGCTGAATACCGCCATT 3'	95°C-5 min, 40 ciclos de: [95°C-1 min, 53°C- 45 s, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	352	Betalactámico	[60]
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -F	5'CGATGATTCTCGCCGCTG 3'				
<i>bla</i> _{OXA-48} -R	5'CGTTATGCGTGTATTAGCCTTAT 3'	94°C-5 min, 40 ciclos de: [94°C-30 s, 43°C- 45 s, 72°C-45 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	790	Betalactámico	[71]
<i>bla</i> _{OXA-48} -F	5'TTTTCTGTTGAGCACTTCTTT 3'				
<i>sulI</i> -R	5'TTCATGGGCAAAAGCTTGATG 3'	95°C-5 min, 40 ciclos de: [95°C-1 min, 53°C- 45 s, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	965	Sulfanamida	[72]
<i>sulI</i> -F	5'GGCCGGAAGGTGAATGCTA 3'				
<i>mecA</i> -R	5'GATAGCAGTTATATTTCTA 3'	94°C-5 min, 40 ciclos de: [94°C-30 s, 43°C- 45 s, 72°C-45 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	434	Meticilina	[70]
<i>mecA</i> -F	5'ATACTTAGTTCTTTAGCGAT 3'				
<i>qnrA</i> -R	5'ACGCCAGGATTTGAGTGAC 3'	95°C-5 min, 40 ciclos de: [95°C-1 min, 53°C- 45 s, 72 °C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	565	Quinolona	[73]
<i>qnrA</i> -F	5'CCAGGCACAGATCTTGAC 3'				
<i>qnrS</i> -R	5'AAGTGATCTCACCTTCACCGCTTG 3'	95°C-5 min, 40 ciclos de: [95°C-1 min, 53°C- 45 s, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	425	Quinolona	[73]
<i>qnrS</i> -F	5'TTAAGTCTGACTCTTTAGTGATG 3'				
<i>armA</i> -R	5'CAAATGGATAAGAATGATGTT 3'	94°C-5 min, 40 ciclos de: [94°C-30 s, 43°C- 45 s, 72°C-45 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	774	Aminoglucósido	[74]
<i>armA</i> -F	5'TTATTTCTGAAATCCACT 3'				

<i>DII</i>	5'GCCCA(A/G)(T/A)IGG(A/G)TTIGGIGGIAC(T/C)TC 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-1 min, 45°C- 1 min, 72°C-1 min 30 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	1083	Tetraciclina	[75]
<i>DI</i>	5'GA(T/C)ACICCI GGICA(T/C)(A/G)TIGA(T/C)TT 3'				
<i>tetM-R</i>	5'CACCGAGCAGGGATTCTCCAC 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-1 min, 55°C- 1 min, 72°C-1 min 30 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	1513	Tetraciclina	[75]
<i>DI</i>	5'GA(T/C)ACICCI GGICA(T/C)(A/G)TIGA(T/C)TT 3'				
<i>tetW-2</i>	5'GGCTGATTGGTTCTCCTGCG 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-1 min, 55°C- 1 min, 72°C-1 min 30 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	1300-1400	Tetraciclina	[76]
<i>tetW-1</i>	5'GATCGACCAGGCTGGCGTTG 3'				
<i>tetS-RVT2</i>	5'TTCTCTATGTGGTAATC 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-1 min, 50°C- 1 min, 72°C-1 min 30 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	573	Tetraciclina	[77]
<i>tetS-FWT1</i>	5'ATCAAGATATTAAGGAC 3'				
<i>tetO-RV1</i>	5'CTCATGCGTTGTAGTATTCCA 3'	94°C-5 min, 45 ciclos de: [94°C-1 min, 50°C- 1 min, 72°C-1 min 30 s], 72°C-10 min, 4°C-15 min	781	Tetraciclina	[77]
<i>tetO-FW1</i>	5'AATGAAGATTCCGACAATTT 3'				
<i>tetA-R-2</i>	5'CCGCTCGAGTCAGCGATCGGCTCGTTG 3'	95°C-5 min, 45 ciclos de: [95°C-1 min, 50°C- 1 min, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	888	Tetraciclina	[78]
<i>tetA-F-2</i>	5'CATGCCATGGGTGAAACCCAACAGACCCCTG 3'				
<i>ermB-RV</i>	5'GGAACATCTGTGGTATGGCG 3'	95°C-5 min, 45 ciclos de: [95°C-1 min, 50°C- 1 min, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	639	Eritromicina	[77]
<i>ermB-FW</i>	5'CATTAAACGACGAAACTGGC 3'				
<i>ermF-R</i>	5'GGACCTACCTCATAGACAAG 3'	95°C-5 min, 45 ciclos de: [95°C-1 min, 50°C- 1 min, 72°C-1 min], 72°C-10 min, 4°C-15 min	466	Eritromicina	[79]
<i>ermF-F</i>	5'CGGTCAGCACTTTACTATTG 3'				

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL conteniendo 12,5 μL de Taq DNA Polymerase Master Mix Kit, 1 μL de cada oligo, 2 μL de muestra de ADN fágico (2 μL del control negativo) y 8,5 μL de agua de grado molecular.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% (*p/v*) en tampón TAE 1x teñido con el colorante Green Safe Premium (Nzytech, Portugal) y visualizado mediante el transilumador G: BOX Chemi XRQ.

En el caso de amplificaciones positivas, el producto de PCR se purificó del gel de agarosa o bien directamente de la reacción de PCR. Para ello, se emplearon los Kits GFX PCR DNA y Gel Band Purification de Illustra (Ge Healthcare, EEUU) siguiendo el protocolo que indica el fabricante. Tras la purificación, los productos de PCR se secuenciaron en la empresa externa Macrogen y se analizó su secuencia mediante visualización con el software ChromasPro versión 2.6.6 y comparación con la base de datos del NCBI.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. Extracción y detección de bacteriófagos en muestras lácteas

En este trabajo se ha desarrollado un método de extracción de la fracción fágica para su aplicación en muestras lácteas, concretamente para leche, cuajada y queso. El método es sencillo y fácilmente aplicable a otros productos lácteos. La técnica se ha basado en el protocolo desarrollado por Dugat-Bony y colaboradores para el estudio del metagenoma viral de la superficie de los quesos^[50] y la metodología utilizada por Muniesa y colaboradores para el estudio de la resistencia a antibióticos en la fracción fágica de diversas muestras ambientales.^[8,59,60,73,70] Tras un primer paso en el que se elimina la grasa y la materia no soluble, se procede al filtrado para obtener de forma aislada la fracción fágica. En la mayoría de los protocolos de extracción fágica se realiza un proceso de concentración de la muestra, bien mediante gradientes de densidad con el compuesto iodixanol o por medio de una aglutinación con PEG.^[50] En este trabajo hemos utilizado el compuesto PEG 8000 para la precipitación y concentración de la fracción fágica (50x).

Tras obtener la fracción fágica de la leche, la cuajada y el queso se realizó un ensayo de infectividad para determinar la presencia de fagos líticos en las muestras y, en caso de estar presentes, las cepas bacterianas que, por poseer receptores celulares específicos, podrían utilizarse en procesos de propagación para incrementar la cantidad de determinados fagos. En los análisis de infectividad, tal como se puede observar en la Figura 12, no se aprecian halos de inhibición por la fracción fágica de ninguna de las muestras analizadas, incluyendo el ensayo en el que se utilizó la cepa *E. coli* CECT 9198 como indicadora. Esta cepa ha sido descrita como especialmente sensible a los fagos que infectan enterobacterias, por lo que se ha utilizado frecuentemente para la propagación y/o amplificación de fagos de muestras ambientales.^[8]

A pesar del gran número de fagos que han sido descritos capaces de infectar BAL aisladas de los productos lácteos y desarrollar un proceso lítico,^[69,80,81,82] en este ensayo no fue observado ningún halo de inhibición. Este resultado podría indicar o bien, que no se han aislado fagos capaces de infectar específicamente a las cepas ensayadas, o que su concentración en la muestra no es lo suficiente alta como para provocar un halo de lisis visible. Por tanto, puesto que los resultados de este ensayo no proporcionaron información concluyente sobre la presencia o no de bacteriófagos en las muestras, se decidió realizar un análisis microscópico para evaluar su presencia y, en su caso, diversidad.



Figura 12. Ensayo de infectividad de las cepas Q1-2, CAS-2, 1363, Lc83A, 171A(B), 2BA40 de *Lactococcus lactis*. Nota. La M indica que se ha inoculado muestra de sobrenadante que contiene fagos, el signo + indica control positivo, que se trata de un sobrenadante de un cóctel de fagos con capacidad para infectar específicamente a cada cepa de estudio.

Las muestras de fracción fágica se enviaron al servicio de microscopía del CNB-CSIC para la preparación y posterior observación mediante microscopía electrónica de transmisión. En ninguna de las muestras analizadas se observaron estructuras que pudieran coincidir con la morfología característica de fagos completos con cabeza y cola, tan solo se veían estructuras que pudieran ser estructuras fágicas incompletas: cabezas de fagos y colas largas aisladas (Figura 13, flecha negra). También se observaron vesículas rodeadas de una doble membrana (Figura 13, flecha roja), lo que indica que estas no fueron completamente eliminadas durante el proceso de aislamiento de los fagos.

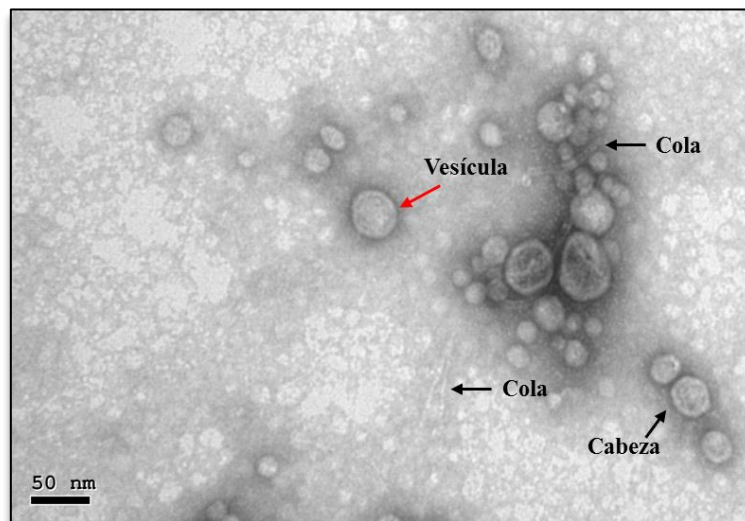


Figura 13. Micrografía electrónica de una suspensión fágica.

Los resultados del análisis de infectividad y de observación al microscopio electrónico sugieren que el proceso de aislamiento de fagos, o bien no se ha realizado de forma eficiente, o el nivel de fagos en las muestras es muy bajo, y por tanto insuficiente para ser detectados mediante técnicas no moleculares. Por ello, se decidió utilizar la técnica de PCR convencional para evaluar la presencia/ausencia de fagos a lo largo del proceso de aislamiento y, por tanto, evaluar la eficiencia de la metodología utilizada.

4.2. Comprobación de la eficiencia del protocolo de aislamiento fágico

La Figura 14 representa el resultado del estudio de evaluación mediante PCR del contenido en fagos presentes a lo largo del proceso de aislamiento; en este caso, a modo de ejemplo, en una muestra de queso.

En este análisis, se tomó como secuencia diana una región conservada de la especie de fagos c2. Según se puede observar, en las etapas iniciales de aislamiento, en las que se incluirían la homogenización y el filtrado a través de membranas con distintos diámetros de poro, no se observa amplificación positiva (Figura 14, calles 1-3). Incluso son necesarios dos pasos de concentración de la muestra (25X) para detectar fagos de este tipo, en las muestras. Como era de esperar, la mayor señal de amplificación se obtuvo tras la concentración de las muestras y posterior extracción del ADN fágico (Figura 14, calles 5 y 6).

En conclusión, a medida que se avanza por las distintas etapas del aislamiento y posterior extracción de ADN (de la etapa 1 a la 6), la concentración en fagos y especialmente de su material genético, se ve incrementada. A la vista de los resultados, queda verificada la validez del protocolo diseñado para la obtención y detección de fagos, mediante la amplificación de genes o regiones de su genoma por PCR.

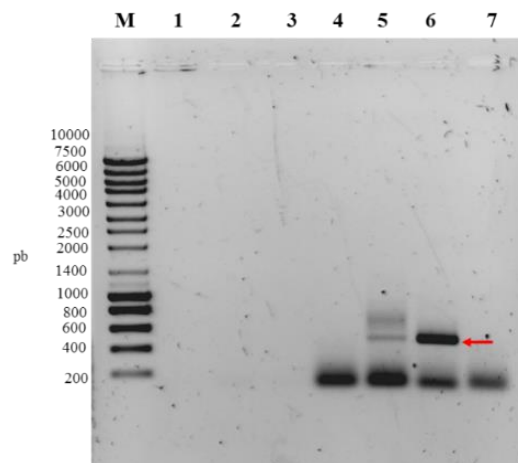


Figura 14. Comprobación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fágico. La flecha roja señala la presencia de ADN fágico en las calles 5 y 6. Calle 1: homogenizado del Stomacher. Calle 2: filtrado por 0,45 μm . Calle 3: filtrado por 0,22 μm . Calle 4: concentrado de fagos en tubo Falcon. Calle 5: concentrado de fagos en tubo Eppendorf. Calle 6: ADN fágico purificado. Como control negativo se empleó agua de grado de biología molecular. M: marcador de peso molecular Nzytech Ladder III.

4.3. Detección de bacteriófagos en muestras lácteas mediante PCR convencional

Con el fin de evaluar el contenido y diversidad fágica en distintas matrices lácteas se llevó a cabo un análisis de PCR para la detección de los grupos de fagos que son mayoritarios en el ambiente lácteo: 936, c2 y P335.^[69] En la Figura 15 se muestra el resultado del análisis de detección de ADN fágico en leche, cuajada y queso. La detección de los fagos se realizó empleando los oligos 936 A/B, c2 A/B y 335 A/B y las condiciones de amplificación descritas en la sección 3.6 de *Materiales y Métodos*.

En la fracción fágica procedente de las muestras de leche, solo se detectó la presencia de fagos de la especie c2 en dos de las cuatro muestras analizadas (Figura 15-A, calles 9 y 10). La señal de amplificación indicaba, aunque cualitativamente, una menor concentración de fagos de este grupo en la leche, si se compara con la que presentan las muestras de cuajada y queso. Asimismo, no fueron detectados en ninguna muestra de leche fagos pertenecientes a los grupos 936 y P335.

En la fracción fágica de las cuajadas se detectó la presencia de fagos representativos de los grupos 936, c2 y P335 (Figura 15-B). Destacar, los resultados de la muestra de cuajada 1, donde se detectaron fagos de todas las especies analizadas (Figura 15-B, calles 1, 6 y 11).

Finalmente, en el queso se hallaron fagos de los tipos 936 y c2 (Figura 15-C). Los fagos de tipo c2 se encontraron en las tres muestras de queso analizadas, mientras que los de tipo 936 se detectaron solo en el queso 1 (Figura 15-C, calle 1). Finalmente, fagos del grupo P335 no se detectaron ni en las muestras de leche ni en las de queso.

A la vista de los resultados, la amplificación mediante PCR, a diferencia del ensayo de infectividad y de observación microscópica, posibilitó la detección de ADN fágico en las muestras, y permitió, aunque cualitativamente, determinar el contenido y la diversidad de fagos en las tres matrices lácteas analizadas. Puesto que se observó una mayor presencia y diversidad para las muestras de cuajada y queso, estas fueron las muestras seleccionadas para continuar con el resto de ensayos: análisis microbiológico y detección de genes de resistencia a antibióticos.

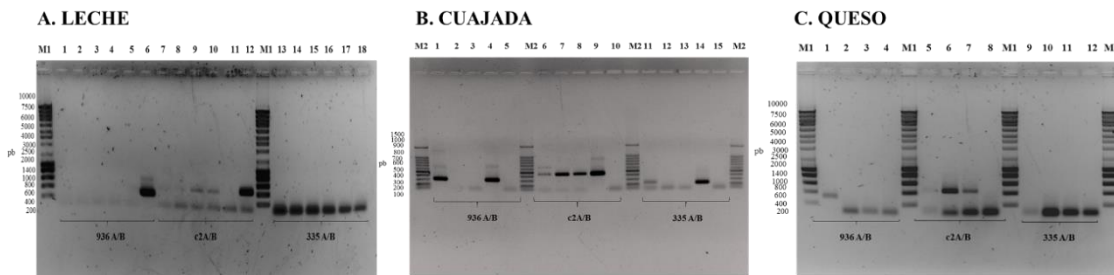


Figura 15. PCR de las muestras de leche, cuajada y queso de Cabrales para la detección de ADN de tres especies de fagos (936, c2 y P335) que infectan a *Lactococcus lactis*: **A. Leche.** Calles 1, 7, 13: leche 1. Calles 2, 8, 14: leche 2. Calles 3, 9, 15: leche 3. Calles 4, 10, 16: leche 4. **B. Cuajada.** Calles 1, 6, 11: cuajada 1. Calles 2, 7, 12: cuajada 2. Calles 3, 8, 13: cuajada 3. **C. Queso.** Calles 1, 5, 9: queso 1. Calles 2, 6, 10: queso 2. Calles 3, 7, 11: queso 3. Como control positivo se ha empleado una muestra de ADN de un cóctel de fagos capaces de infectar a *L. lactis*. **M1:** marcador de peso molecular Nzytech Ladder III. **M2:** marcador de peso molecular GRS Ladder.

4.4. Análisis de la microbiota resistente a antibióticos en cuajada y queso

A continuación, se analizó el contenido de las muestras en distintas poblaciones bacterianas (mesófilos totales, estafilococos-micrococos y enterobacterias), sus niveles de resistencia a diversos antibióticos y la posible evolución de las mismas durante el proceso de elaboración y maduración del queso.

En general, los recuentos bacterianos fueron superiores en la cuajada, en torno a 1-2 unidades Log_{10} de diferencia respecto al queso, tanto para las bacterias totales como para las bacterias resistentes a los antibióticos analizados (Figura 16 y Tabla 2). En cuanto a la resistencia a antibióticos, se observó una amplia diversidad, detectándose microorganismos resistentes a todos los antibióticos analizados en todos los grupos poblacionales enumerados. Estos resultados apoyan las teorías que sugieren que la cadena alimentaria es una de las principales vías de diseminación de resistencias a antibióticos.^[30,31,32,56,59]

En consonancia con estudios previos, se encontró que la resistencia a tetraciclina y la eritromicina son las más extendidas tanto en la microbiota de la cuajada como del queso.^[29,30,31] Destacamos también un elevado número de microorganismos resistentes a kanamicina, ciprofloxacino y cefotaxima, todos ellos antibióticos de uso clínico.

En lo que respecta a la población de bacterias mesófilas aerobias, según se observa en la Figura 16 y en la Tabla 2, hay recuentos más elevados en la cuajada que en el queso. Lo que está relacionado con el empleo de una materia prima cruda que no hay sufrido ningún tratamiento térmico o de otro tipo que reduzca la carga microbiana del producto.

Estos resultados concuerdan con los observados por nuestro grupo con anterioridad, en los que hemos visto que los lactococos, grupo mayoritario de la población de mesófilos totales, descienden en torno a una unidad logarítmica en el queso de Cabrales hacia los 60 días de maduración, respecto a las etapas iniciales de elaboración y maduración.^[23]

Asimismo, la población de mesófilos totales presenta mayor resistencia a tetraciclina, eritromicina, kanamicina y cefotaxima en la cuajada a diferencia de lo que sucede en el queso, en el que se observó mayor resistencia a eritromicina. El nivel de resistencia a vancomicina observado en la cuajada puede deberse a la presencia de lactobacilos que posee resistencia intrínseca a este antibiótico.^[88]

De igual forma que en el caso anterior y por la misma razón, en la cuajada se observa una mayor carga microbiológica de estafilococos, micrococos, etc. (ver Figura 16 y Tabla 2). Las poblaciones presentan mayor resistencia a tetraciclina en la cuajada y en el queso a la kanamicina, resistencias ampliamente extendidas entre distintas especies de enterococos,^[30,31] capaces de desarrollarse igual que estafilococos y micrococos en el medio BP.

Finalmente, como en los casos anteriores, hay mayor número de enterobacterias en la cuajada que en el queso, no detectándose crecimiento alguno de este grupo en el queso, debido a la escasa resistencia al ácido de estas bacterias (ver Figura 16 y Tabla 2). En la cuajada esta población presenta mayor resistencia a cefotaxima, una cefalosporina de tercera generación de amplio uso clínico. Sin embargo, dado que en el queso no se observa crecimiento de enterobacterias y que el ADN libre tiene un periodo de vida corto en ambientes con mucha carga microbiana,^[87] no existiría posibilidad de diseminación de la resistencia a esta cefalosporina en el tracto gastrointestinal tras el consumo del queso. Este hecho pone de manifiesto que una correcta fermentación es garantía no solo de eliminación de microorganismos alterantes o patógenos, sino también de contención de la dispersión de la resistencia a antibióticos.

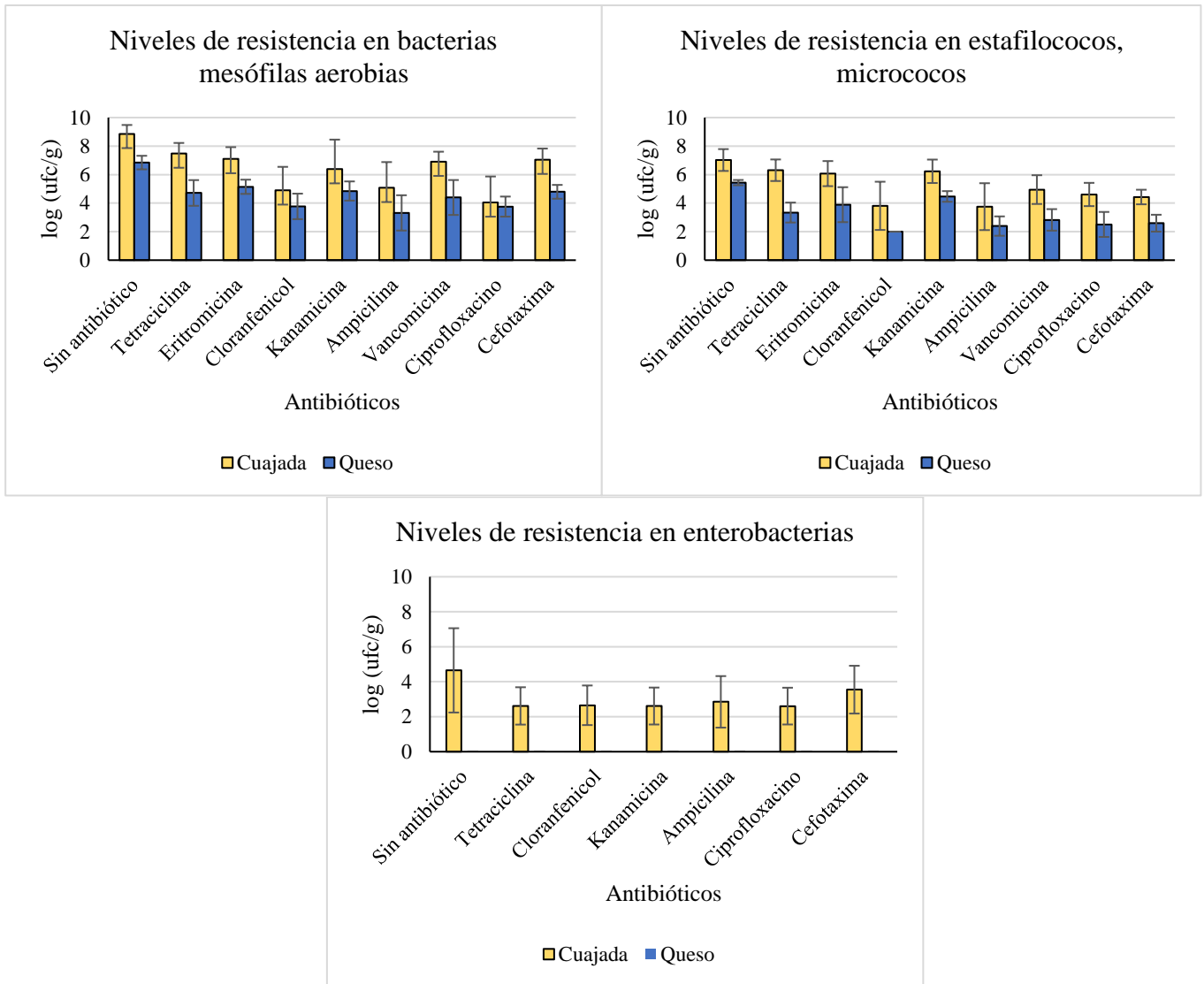


Figura 16. Evolución en los niveles de resistencia en cuajada y queso mediante recuento microbiológico. Nota. Ver Tablas S2 y S3 del Anexo para obtener más información.

Tabla 2. Evolución en los niveles de resistencia desde la cuajada al queso mediante recuento microbiológico.

log (ufc/g)							
Grupo bacteriano							
		Bacterias mesófilas aerobias		Estafilococos y micrococos		Enterobacterias	
Antibióticos	Grupo de antibióticos	Cuajada	Queso	Cuajada	Queso	Cuajada	Queso
Sin antibiótico	-	8,86	6,84	7,02	5,44	4,65	<2
Tetraciclina	Tetraciclina	7,48	4,71	6,31	3,34	2,62	<2
Eritromicina	Macrólido	7,10	5,15	6,07	3,89	<2	<2
Cloranfenicol	Afenicol	4,90	3,77	3,81	2,00	2,65	<2
Kanamicina	Aminoglucósido	6,39	4,85	6,23	4,47	2,61	<2
Ampicilina	Betalactámico	5,08	3,32	3,75	2,39	2,85	<2
Vancomicina	Glucopéptido	6,91	4,40	4,95	2,83	<2	<2
Ciprofloxacino	Fluoroquinolona	4,05	3,76	4,61	2,51	2,61	<2
Cefotaxima	Cefalosporina de 3ª generación	7,05	4,79	4,43	2,60	3,55	<2

Nota. En sombreado se indican los antibióticos con mayores recuentos en los distintos grupos bacterianos.

4.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos en la fracción fágica y distintos grupos microbianos mediante la técnica de PCR

Con el objetivo de obtener información sobre qué microorganismos y en qué producto portan determinados genes de resistencia a antibióticos y poder establecer si el mecanismo de transducción podría ser una potencial vía de movilización de genes de resistencia, se llevó a cabo un estudio genómico del ADN fágico y bacteriano presentes en las cuajadas y en los quesos.

Para lo cual, tras la extracción y purificación del material genético de ambas poblaciones, se realizaron varias reacciones de PCR con oligos específicos para la detección de un buen número de genes de resistencia. Los resultados obtenidos se relacionan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Matriz de correlación entre los genes de resistencia a antibióticos, las fracciones fágica y bacteriana y la cuajada en la que se encuentran.

Genes de resistencia a antibióticos	Grupo de antibióticos	Fracción fágica	Fracción bacteriana								
			Bacterias mesófilas aerobias			Estafilococos y micrococos			Enterobacterias		
<i>DI/DII</i>	Tetraciclina		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1		
<i>tetM</i>	Tetraciclina		C1		C3		C2	C3	C1		
<i>tetW</i>	Tetraciclina		C1	C2	C3	C1	C2	C3			
<i>tetS</i>	Tetraciclina		C1	C2	C3						
<i>tetO</i>	Tetraciclina										
<i>tetA</i>	Tetraciclina								C1		
<i>ermB</i>	Eritromicina		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	
<i>ermF</i>	Eritromicina										
<i>bla_{TEM}</i>	Betalactámico		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	Betalactámico				C3		C2				
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	Betalactámico	C2		C2							
<i>bla_{OXA-48}</i>	Betalactámico										
<i>qnrS</i>	Quinolona										
<i>qnrA</i>	Quinolona							C3			
<i>sulI</i>	Sulfanamida	C2					C2	C3	C1	C2	
<i>mecA</i>	Meticilina										
<i>armA</i>	Aminoglucósido						C2				

Nota. En la cuajada 3 no hubo crecimiento de enterobacterias, por lo que no hay información sobre el contenido de genes de resistencia de esta población en esta muestra. En color amarillo se identifica la cuajada 1, en verde la cuajada 2 y en azul la cuajada 3.

Tabla 4. Matriz de correlación entre los genes de resistencia a antibióticos, las fracciones fágica y bacteriana y el queso en el que se encuentran.

Genes de resistencia a antibióticos	Grupo de antibióticos	Fracción fágica	Fracción bacteriana					
			Bacterias mesófilas aerobias			Estafilococos y micrococos		
<i>DI/DII</i>	Tetraciclina		Q1	Q2		Q1	Q2	Q3
<i>tetM</i>	Tetraciclina		Q1	Q2		Q1	Q2	
<i>tetW</i>	Tetraciclina		Q1	Q2		Q1	Q2	Q3
<i>tetS</i>	Tetraciclina			Q2				
<i>tetO</i>	Tetraciclina							
<i>tetA</i>	Tetraciclina		Q1				Q2	
<i>ermB</i>	Eritromicina	Q2	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3
<i>ermF</i>	Eritromicina							
<i>bla_{TEM}</i>	Betalactámico	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3	Q3
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	Betalactámico							Q3
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	Betalactámico			Q2				
<i>bla_{OXA-48}</i>	Betalactámico			Q2		Q2		
<i>qnrS</i>	Quinolona							
<i>qnrA</i>	Quinolona			Q2				Q3
<i>sulI</i>	Sulfanamida							
<i>mecA</i>	Meticilina							
<i>armA</i>	Aminoglucósido		Q1	Q2		Q1		Q3

Nota. No fue detectado crecimiento de enterobacterias, por tanto, no hay información sobre el contenido de esta población en genes de resistencia a antibióticos. En color amarillo se identifica el queso 1, en verde el queso 2 y en azul el queso 3.

En la fracción fágica de las muestras de cuajada y queso no se observa una amplia distribución ni diversidad de genes de resistencia a antibióticos. Por un lado, en la cuajada se detectaron genes de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (*bla*_{CTX-M-9}) y a sulfanamidas (*sulI*), mientras otros autores los detectaron en vegetales, productos cárnicos y en aguas residuales de granjas.^[8,59,60] En los quesos, por su parte, se detectaron genes de resistencia distintos a los de la cuajada, *ermB* y *bla*_{TEM}, que confieren resistencia a macrólidos y a betalactámicos, respectivamente.^[8,59] Mientras que el gen *bla*_{TEM}, al igual que el gen *bla*_{CTX-M-9} han sido detectados en gran variedad de muestras de carne, vegetales y ambientales^[8,59], el gen *ermB* solo ha sido encontrado en muestras de heces de pollo.^[83]

Ninguno de los fagos aislados en este trabajo portaba genes de resistencia a los antibióticos tetraciclina, quinolonas, meticilina y aminoglucósidos. Genes de resistencia que sí han sido descritos en la fracción fágica de gran variedad de ambientes, si bien ninguno relacionado con productos fermentados o lácteos.^[73]

En el caso de las resistencias detectadas en la población bacteriana, cabe resaltar que tanto en las cuajadas como en los quesos, los genes de resistencia de mayor prevalencia confieren resistencia a las tetraciclinas (*tetM*, *tetW*, *tetS*), eritromicina (*ermB*)^[29,30,32] y betalactámicos (*bla*_{TEM}). Estos antibióticos son comúnmente empleados en clínica, veterinaria y agricultura. Por tanto, es posible que, a través de diversas vías, estos genes sean transferidos desde los animales o el pienso a la leche: la materia prima empleada para la elaboración de queso.

Resulta notorio destacar que en las muestras de cuajada y queso solo se detectó *tetS* en el ADN procedente de las bacterias mesófilas aerobias, mientras que los genes *tetM* y *tetW* fueron detectados en casi todas las muestras analizadas, en el ADN procedente de las bacterias mesófilas y de los estafilococos-micrococos. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas que indican que estos genes de resistencia se encuentran ampliamente en las BAL y otros grupos bacterianos presentes en los productos lácteos.^[29,30,32]

En la cuajada, el gen *tetA* se detectó únicamente en ADN procedente de las enterobacterias. Sin embargo, ese mismo gen se encontró también en las poblaciones de mesófilos totales y estafilococos-micrococos del queso. Tal como se mencionó anteriormente, especies de enterococos capaces de crecer en el medio BP, podrían ser también los portadores de estos genes de resistencia.

El gen *bla*_{TEM} que confiere resistencia a los betalactámicos se encontró ampliamente extendido entre los distintos grupos microbianos tanto en las muestras de cuajada como de queso. Sin embargo, los genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-1}, que también confieren resistencia a la acción de los betalactámicos, solo se detectaron, respectivamente, en las poblaciones de bacterias mesófilas aerobias y en las de estafilococos-micrococos.

Los genes *qnrA* y *armA*, que confieren resistencia frente a quinolonas y aminoglucósidos, se encontraron solo en los estafilococos de la cuajada. El gen *sulI* fue hallado en varias de las muestras de cuajada analizadas; sin embargo, no se localizaron en ninguna muestra de queso. Por el contrario, los genes *armA* y *bla*_{OXA-48}, que confieren resistencia, respectivamente, a aminoglucósidos y betalactámicos, se detectaron en muestras de queso y cuajada (*armA*). La sucesión microbiana que tiene lugar a lo largo de la elaboración y maduración del queso por la que unas poblaciones incrementan su número y otras lo reducen o desaparecen, podría explicar la presencia de determinados genes de resistencia en cuajada y no en queso, y viceversa.^[84,85]

Comparativamente, se observa que hay menor variedad en genes de resistencia en la fracción fágica con respecto a la bacteriana en los productos lácteos estudiados. En las muestras de cuajada, la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-9} y *sulI* en el ADN fágico aislado de la cuajada 2, se correlaciona con la presencia de estos mismos genes en el ADN bacteriano de ese mismo producto. Este hecho conduce a pensar en la transducción como una posible vía de transmisión de esos genes de resistencia entre fagos y bacterias. En las muestras de queso, se aprecia que el gen *ermB* detectado en la fracción fágica de la muestra de queso 2 y el gen *bla*_{TEM} detectado en los quesos 1, 2 y 3, también se encuentran en el ADN de la fracción bacteriana de esos mismos productos. Nuevamente, es posible que, por coincidencia en el mismo espacio, pueda haber habido transferencia génica de virus a bacterias por medio de la infección viral.



5. CONCLUSIONES



Este Trabajo Fin de Máster ha tratado de establecer una posible vinculación entre la aparición de bacterias resistentes en los productos lácteos con la transferencia génica mediada por fagos, conocida como transducción.

Las conclusiones más relevantes del trabajo se pueden resumir en los siguientes epígrafes:

- El protocolo de aislamiento de la fracción fágica de muestras lácteas desarrollado en este trabajo fue de utilidad para la detección de fagos mediante PCR.
- Sin embargo, debido, seguramente, a una baja concentración en estas muestras, no fue posible llevar a cabo la caracterización de los fagos mediante métodos fenotípicos.
- La PCR detectó fagos de las especies mayoritarias que infectan BAL: 936, c2 y P335; encontrando que en la cuajada, la incidencia y diversidad de estos fue mayor.
- En la fracción fágica de cuajada y queso se detectaron los genes *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM}, *sul1* y *ermB*, que confieren resistencia a betalactámicos, sulfonamidas y macrólidos.
- El análisis microbiológico reveló la presencia de bacterias resistentes a una amplia variedad de antibióticos en la microbiota de cuajada y queso.
- En la fracción bacteriana de estas muestras predominaron los genes *tetM*, *tetW* y *ermB*; responsables de resistencia a tetraciclina y eritromicina.
- La presencia de genes de resistencia a antibióticos idénticos en la fracción fágica y bacteriana sugiere que, en las matrices lácteas, los bacteriófagos pueden jugar un papel en la dispersión de las resistencias.



6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS



2xTy	Medio de cultivo 2x triptona de extracto de levadura
ABC	Transportadores dependientes de ATP (<i>ATP-Binding Cassette</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
C	Citosina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
CO₂	Dióxido de carbono
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
D.O.P.	Denominación de Origen Protegida
Da	Dalton
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EGMs	Elementos Genéticos Móviles
g	Gramos
G	Guanina
HGT	Transferencia horizontal de genes (<i>Horizontal Gene Transfer</i>)
LOD	Límite de detección (<i>Limit Of Detection</i>)
Log₁₀	Logaritmo en base diez
mL	Mililitros
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
°C	Grados Celsius
p/v	Relación entre masa y volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol (<i>Polyethylene Glycol</i>)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
QPS	Presunción calificada de seguridad (<i>Qualified Presumption of Safety</i>)

RND	Proteínas de resistencia-nodulación-división
SDS	Dodecilsulfato sódico
subsp.	Subespecie
U	Unidades enzimáticas
ufc	Unidades formadoras de colonia
ufp	Unidades formadoras de placa
UV	Ultravioleta
v/v	Relación de volúmenes
VIS	Visible
VRBGA	Violeta Rojo y Bilis Glucosa Agar



7. BIBLIOGRAFÍA



- [1] M. Muniesa, M. Colomer-Llunch, J. Jofre. *Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? Mobile Genetics Elements* **2013**, 3, 2-5.
- [2] European Commission. *Opinion of the scientific panel on additives and products in substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human and veterinary importance. The EFSA Journal* **2005**, 223, 1-12.
- [3] T. Kloesges, O. Popa, W. Martin, T. Dagan. *Networks of gene sharing among 239 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths. Molecular Biology and Evolution* **2011**, 28, 1057-1074.
- [4] W.B. Whitman, D.C. Coleman, W.J. Wiebe. *Prokaryotes: the unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **1998**, 95, 6578-83.
- [5] H.W. Ackermann. *5500 phages examined in the electron microscope. Archives of Virology* **2006**, 152, 227-243.
- [6] W. Calero-Cáceres, M. Ye, J.L. Balcázar. *Bacteriophages as environmental reservoirs of antibiotic resistance. Trends in Microbiology* **2019**, 27, 570-576.
- [7] I. Lekunberri, J. Subirats, C.M. Borrego, J.L. Balcázar. *Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. Environmental Pollution* **2017**, 220, 981-984.
- [8] C. Gómez-Gómez, P. Blanco-Picazzo, M. Brown-Jaque, P. Quirós, L. Rodríguez-Rubio, M. Cerdà-Cuellar, M. Muniesa. *Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. Scientific Reports* **2019**, 9, 1-11.
- [9] F.J. Carr, D. Chill, N. Maida. *The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiology* **2002**, 28, 281-370.
- [10] F. Dellaglio, H. de Roissart, S. Torriani, MC. Curk, D. Janssens. *Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En Bactéries Lactiques* **1994**. Volumen 1, 25-116. Editado por H. de Roissart y F. M. Luquet. Uriage. Francia.
- [11] B. Mayo, T. Aleksandrak-Piekarczyk, M. Fernández, M. Kowalczyk, P. Álvarez-Martín, J. Bardowski. *Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. En Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*. Editado por: F. Mozzi, R. Raya, G. Vignolo, Wiley-Blackwell. EEUU.
- [12] O. Kandler. *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek* **1983**, 49, 24-209.
- [13] T. Asahara, M. Takahashi, K. Nomoto, H. Takayama, M. Onoue, M. Morotomi, R. Tanaka, T. Yokokura, N. Yamashita. *Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2003**, 10, 169-173.
- [14] EFSA (European Food Safety Authority). *Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganism referred to EFSA. The EFSA Journal* **2007**, 587, 1-16.
- [15] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición. **2004**. Editado por: G. Garrity, M. Boone, R. David, R.W. Castenholz.
- [16] R. Kant, L. Blom, A. Palva, R.J. Siezen. W.M. de Vos. *Comparative genomics of *Lactobacillus*. Microbial Biotechnology* **2011**, 4, 323-332.

- [17] D. Hemme, C. Foucaud-Scheunemann. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* **2004**, *14*, 467-494.
- [18] E. Parente, T.M. Cogan. *Starter cultures, general aspects*. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3ª edición. Volumen 1. *General Aspects*. Editado por: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee. EEUU.
- [19] T.P. Beresford, N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan, T.M. Cogan. *Recent advances in cheese microbiology*. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 259-274.
- [20] J.T.M Wouters, E.H.E. Ayad, J. Hugenholtz, G. Smith. *Microbes from raw milk from fermented dairy products*. *International Dairy Journal* **2002**, *12*, 91-209.
- [21] V.L. Crow, B. Curry, M. Hayes. *The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar*. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 275-283.
- [22] J. Estepar, M.M. Alonso, B. Mayo. *Biochemical and microbiological characterization of artisan "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria*. *International Dairy Journal* **1999**, *9*, 737-746.
- [23] A.B. Flórez, P. Álvarez-Martín, T.M. López-Díaz, B. Mayo. *Microbiological characterization of the traditional Spanish blue veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria*. *European Food Research and Technology* **2006**, *223*, 503-508.
- [24] G. Giraffa. *Functionality of enterococci in dairy products*. *International Journal of Food Microbiology* **2003**, *88*, 215-222.
- [25] M.R. Foulquié Moreno, P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. De Vuyst. *The role and application of enterococci in food and health*. *International Journal of Food Microbiology* **2006**, *106*, 1-24.
- [26] Food and Drug Administration (FDA). *FDA approves "zyvox", the first antimicrobial drug in a new class*. **2000**.
- [27] R.C. Moellering. *Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial*. *Annals of Internal Medicine* **2003**, *138*, 135-142.
- [28] T. M. Magican. *Brock Biología de los microorganismos*. **2009**. 12ª edición.
- [29] M. Gueimonde, B. Sánchez, C. G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles. *Antibiotic resistance in probiotic bacteria*. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*, 1-5.
- [30] C. Devirgiliis, S. Barile, A. Caravelli, D. Coppola, G. Perozzi. *Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product*. *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *109*, 313-323.
- [31] A.B. Flórez, B. Mayo. *Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis*. *International Journal of Food Microbiology* **2015**, *214*, 63-69.
- [32] M. Salim, A.B. Flórez, B. Mayo. *Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria*. *Food Microbiology* **2007**, *24*, 559-570.

- [33] C. Liu, Z.Y. Zhang, K. Dong, J.-P. Yuan, X.-K. Guo. *Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. Biomedical and Environmental Sciences* **2009**, 22, 401-412.
- [34] J. Haaber, J.R. Penadés, H. Ingmer. *Transfer of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Trends in Microbiology* **2017**, 25, 893-905.
- [35] I. Lekunberri, J. Subirats, C.M. Borrego, J.L. Balcázar. *Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. Environmental Pollution* **2017**, 220, 981-984.
- [36] Organización Mundial de la Salud (OMS). *Resistencia a los Antibióticos* **2020**.
- [37] S. Berkner, S. Konradi, J. Schonfeld. *Antibiotic resistance and the environment-there and back again. EMBO Reports* **2014**, 15, 740-744.
- [38] R.L. Finley, P. Collignon, D.G.J. Larsson, S.A. McEwen, X.-Z. Li, W.H. Gaze, et al. *The source of antibiotic resistance: the important role of the environment. Clinical Infectious Diseases* **2013**, 57, 704-710.
- [39] N.-J. Krüger, K. Stingl. *Two steps away from novelty – principles of bacterial DNA uptake. Molecular Microbiology* **2011**, 80, 860-867.
- [40] C. García-Aljaro, E. Ballesté, M. Muniesa, J. Jofre. *Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution. Microbial Biotechnology* **2017**, 10, 1775-1780.
- [41] C. Moreno, R. González, C. Beltrán. *Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello Cabeza Cuello* **2009**, 69, 185-192.
- [42] D. Harper, E. Kutter. *Bacteriophage: therapeutic uses. The Encyclopedia of Life Sciences* **2008**.
- [43] H. Engelberg-Kulba, S. Kumar. *Yet another way that phage λ manipulates its Escherichia coli host: λ rexB is involved in lysogenic-lytic switch. Molecular Microbiology* **2015**, 96, 689-693.
- [44] S. Gandon. *Why be temperate: lessons from bacteriophage λ . Trends in Microbiology* **2016**, 24, 356-365.
- [45] M. Radman, I. Matic, F. Taddei. *Evolution of evolvability. Annals of New York* **1999**, 870, 146-155.
- [46] M. Butala, D. Zgur-Bertok, S.J.W. Busby. *The bacterial LexA transcriptional repressor. Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, 66, 82-93.
- [47] H.W. Ackermann, M.S. Dubows. *Bacteriophage taxonomy. Viruses of Prokaryotes. CRC Press Boca Raton* **1987**, 1, 13-28.
- [48] A.W. Jarvis, G.F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I.B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin, M. Teuber. *Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirology* **1991**, 33, 2-9.
- [49] H. Deveau, S.J. Labrie, M.C. Chopin, S. Moineau. *Biodiversity and classification of lactococcal phages. Applied and Environmental Microbiology* **2006**, 72, 4338-4346.
- [50] E. Dugat-Bony, J. Lossouarn, M. De Paepe, A.-S. Sarthou, Y. Fedala, M.-A. Petit, S. Chaillou. *Viral metagenomic analysis of the cheese surface: a comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. Food Microbiology* **2020**, 85, 1-11.

- [51] M.C. García-Anaya, D.R. Sepulveda, A.I. Sáenz-Mendoza, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta-Muñiz. *Phages as biocontrol agents in dairy products. Trends in Food Science and Technology* **2020**, 95, 10, 20.
- [52] P. García, B. Martínez, J.M. Obeso, R. Lavigne, *et al.* *Functional genomic analysis of two Staphylococcus aureus phages isolated from the dairy environment. Applied and Environmental Microbiology* **2009**, 75, 7663-7673.
- [53] D. Gutiérrez, L. Fernández, A. Rodríguez, P. García. *Role of bacteriophages in the implementation of a sustainable dairy chain. Frontiers in Microbiology* **2019**, 10, 1-14.
- [54] H.W. Ackermann. *Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Archives of Virology* **2001**, 146, 843-857.
- [55] M. Touchon, J.A. Moura de Sousa, E.P. Rocha. *Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. Current Opinion in Microbiology* **2017**, 38, 66-73.
- [56] A. Colavecchio, B. Cadieux, A. Lo, L.D. Goodridge. *Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens on the Enterobacteriaceae family. Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 1-13.
- [57] A. Beumer, J.B. Robinson. *A broad host-range generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 8301-8304.
- [58] C. Torre-Barceló. *The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. Emerging Microbes and Infections* **2018**, 7, 1-12.
- [59] O. Larrañaga, M. Brown-Jaque, P. Quirós, C. Gómez-Gómez, A. R. Blanch, L. Rodríguez-Rubio, M. Muniesa. *Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. Environmental International* **2018**, 115, 133-141.
- [60] M. Colomer-Llunch, L. Imamovic, J. Jofre, M. Muniesa. *Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs and poultry. Antimicrobial, Agents and Chemotherapy* **2011**, 55, 4908-4911.
- [61] J. Subirats, A. Sánchez-Melsió, C. M. Borrego, J.L. Balcázar. *Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. International Journal of Antimicrobial Agents* **2016**, 48, 163-167.
- [62] B. del Río, M.C. Martín, V. Ladero, N. Martínez, D.M. Linares, M. Fernández, M. A. Álvarez. *Bacteriophages in dairy industry: PCR methods as valuable tools.* En *Bacteriophages* **2012**, Editado por I. Kurtboke. Croatia.
- [63] S.A. Pujato, A. Quiberoni, D.J. Mercanti. *Bateriophages on dairy foods. Journal of Applied Microbiology* **2018**, 126, 14-30.
- [64] L. Fernández, S. Escobedo, D. Gutiérrez, S. Portilla, B. Martínez, P. García, A. Rodríguez. *Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. Antibiotics* **2017**, 6, 1-14.
- [65] M. Polaska, B. Sokolowska. *Bacteriophages – a new hope or a huge problem in the food industry. AIMS Microbiology* **2019**, 5, 324-346.

- [66] L. G. Biesecker. *Reacción en cadena de la polimerasa. Talking Glossary of Genetic Terms*. NCBI. **2021**.
- [67] J. M. Peña- Castro, O. Gregorio- Ramírez, B. E. Barrera-Figueroa. *Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas*. *Educación química* **2013**, *24*, 237-246.
- [68] L.C. Junqueira, J. Carneiro. *Métodos de estudio en histología*. En *Histología básica*. **2015**. 12ª edición.
- [69] B. del Rio, A.G. Binetti, M.C. Martín, M. Fernández, A.H. Magadán, M.A. Alvarez. *Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk*. *Food Microbiology* **2007**, *24*, 75-81.
- [70] M. Colomer-Llunch, J. Jofre, M. Muniesa. *Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, 1-11.
- [71] M.B. Jaque, W. Calero-Cáceres, P. Espinal, J. Rodríguez-Navarro, E. Miró, J.J. González-López, T. Cornejo, J.C. Hurtado, F. Navarro, M. Muniesa. *Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2018**, *51*, 434-442.
- [72] W. Calero-Cáceres, A. Melgarejo, M. Colomer-Lunch, C. Stoll, F. Lucena, J. Jofre, M. Muniesa. *Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions*. *Environmental Science and Technology* **2014**, *48*, 7602-7611.
- [73] M. Colomer-Llunch, J. Jofre, M. Muniesa. *Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particle from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2014**, *69*, 1265-1274.
- [74] M. Galimand, S. Sabtcheva, P. Courvalin, T. Lambert. *Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 2949-2953.
- [75] A.B. Flórez, M. Danielsen, J. Korhonen, J. Zycka, A. von Wright, J. Bardowski, B. Mayo. *Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of new susceptibility-resistance cut-off values*. *Journal of Dairy Research* **2007**, *74*, 262-268.
- [76] M.S. Ammor, A.B Flórez, P. Álvarez-Martín, A. Margolles, B. Mayo. *Analysis of tetracycline resistance *tet(W)* genes and their flanking sequences in intestinal *Bifidobacterium* species*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *62*, 688-693.
- [77] D. Gevers, M. Danielsen, G. Huys, J. Swings. *Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage*. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *69*, 1270-1275.
- [78] H. Allmeier, B. Cresnar, M. Greck, R. Schmitt. *Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein*. *Gene* **1992**, *111*, 11-20.
- [79] W.O. Chung, C. Werckenthin, S. Schwarz, M.C. Roberts. *Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, *43*, 5-14.
- [80] F. A. Sadiq, G. He, H. Arbab, Y. Li, K. Ou. **Lactococcus lactis* phages from the perspective if their diversity, thermal and biocidal resistance*. *International Dairy Journal* **2019**, *90*, 29-38.

- [81] J. E. Garneau, S. Moineau. *Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations*. *Microbial Cell Factories* **2011**, *10*, 1-10.
- [82] J. Mahony, B. McDonnell, E. Casey, D. van Sinderen. *Phage-host interactions of cheese-making lactic acid bacteria*. *Food Science and Technology* **2016**, *7*, 1-19.
- [83] Y. Yang, X. Xie, M. Tang, J. Liu, H. Tuo, J. Gu, Y. Tang, C. Lei, H. Wang, A. Zhang. *Exploring the profile of antimicrobial resistance genes harboring by bacteriophage in chicken feces*. *Science of the Total Environment* **2020**, *700*, 1-9.
- [84] B. Tilocca, N. Costanzo, V.M. Morittu, A.A. Spina, A. Soggiu, D. Britti, P. Roncada, C. Piras. *Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production*. *Journal of Proteomics* **2020**, *210*, 1-14.
- [85] M.C. Montel, S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D.A. Vuitton, N. Desmasures, F. Berthier. *Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits*. *International Journal of Food Microbiology* **2014**, *177*, 136-154.
- [86] J. Zheng, S. Wittouk, E. Salvetti, C.M.A.P. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, P.W. O'Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G.E. Felis, M.G. Gänzle, S. Lebeer. *A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **2020**, *70*, 2782-2858.
- [87] G. van den Eede, H. Aarts, H.J. Buhk, G. Corthier, H.J. Flint, W. Hammes, B. Jacobsen, T. Midtvedt, J. van der Vossen, A. von Wright, W. Wackernagel, A. Wilcks. *The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants*. *Food and Chemical Toxicology* **2004**, *42*, 1127-56.
- [88] B.G. Elisha, P. Courvalin. *Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase related enzymes in Leuconostoc mesenteroides and Lactobacilli spp.* *Gene* **1995**, *152*, 79-83.



8. ANEXOS



Tabla S1. Clasificación de los antibióticos.

Grupo de antibióticos	Mecanismo de acción	Estructura química	Espectro antimicrobiano	Resistencia	Tipos (BAL y microbiota 2ª resistentes) ^a
Aminoglucósidos	Se unen a la fracción 30S de los ribosomas bacterianos y ocasionan o bien la producción de proteínas bacterianas defectuosas, o la inhibición total de la síntesis proteica. Son capaces de alterar la permeabilidad de membrana externa	Compuestos policatiónicos que contienen un aminociclitol con aminoazúcares cíclicos unidos por enlaces glicosídicos	Actúan frente a bacilos Gram-negativos aerobios. Estreptomina, kanamicina y amikacina son activos frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Presentan una acción sinérgica con los betalactámicos	La resistencia en la mayoría de ellos, excepto a la estreptomina, se adquiere a través de plásmidos o transposones. La resistencia a estreptomina ocurre por mutación puntual	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Estreptomina</u> (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus lactis</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Oenococcus oeni</i>, <i>Bifidobacterium</i>) - Neomicina (<i>Bifidobacterium</i>) - Amikacina - <u>Kanamicina</u> (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Oenococcus oeni</i>, <i>Bifidobacterium</i>) - Tobramicina - Gentamicina (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>O. oeni</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>) - Capreomicina - Paromomicina
Betalactámicos	Inhiben la síntesis de la pared bacteriana	Poseen un anillo central llamado anillo betalactámico que da nombre al grupo			
Penicilinas	El general de los betalactámicos	El anillo central betalactámico se encuentra asociado con el anillo tiazolidínico, formando el núcleo de la actividad biológica, el ácido 6-amino-penicilánico. A este se asocia una cadena lateral variable que es la responsable de las distintas características antibacterianas y farmacocinéticas de cada penicilina	Efectivas en general, frente a Gram-positivos y Gram-negativos	Las bacterias adquieren resistencias a este grupo de antibióticos a través de la producción de betalactamasas	<ul style="list-style-type: none"> - Bencilpenicilinas (penicilina G y V) - Isoxazolilpenicilinas (cloxacilina) - Aminopenicilinas (amoxicilina; <u>ampicilina</u>) - Ureidopenicilinas (piperacilina)

Cefalosporinas	El general de los betalactámicos	Antibióticos semisintéticos derivados del antibiótico natural: cefalosporina. El núcleo activo es el ácido 7-amino-cefalosporánico que, por modificación de sus cadenas laterales, da lugar a diversas variantes	Amplio espectro, aunque no son efectivas frente a enterococos, <i>Listeria monocytogenes</i> y estafilococos resistentes a la cloxacilina (penicilina). Se dividen en generaciones		<ul style="list-style-type: none"> - 1ª G.: cefadroxilo, cefalexina (<i>E. faecalis</i>), cefazolina sódica - 2ª G.: cefaclor, cefuroxima (<i>E. faecalis</i>), cefonicida, cefoxitina (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>E. faecalis</i>), cefminox - 3ª G.: cefixima, cefpodoxima proxetilo (<i>E. faecalis</i>), cefditoreno pivoxilo <u>cefotaxima</u> (<i>E. faecalis</i>), ceftazidima (<i>E. faecalis</i>), ceftriaxona (<i>Lactobacillus</i>) - 4ª G.: cefepima (<i>E. faecalis</i>) - 5ª G.: ceftarolina fosami (<i>E. faecalis</i>), ceftobiprole medocaril, ceftolozano
Monobactámicos	El general de los betalactámicos	Presentan un anillo betalactámico monocíclico	Actividad frente a microorganismos Gram-negativos aerobios, buena efectividad frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-negativa). No cubre microorganismos con betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) como las enterobacterias, pero sí aquellos que son productores de metalobetalactamasas	Presentan elevada resistencia a la inhibición por betalactamasas y no hay resistencia cruzada con otros betalactámicos	Aztreonam
Carbapenemas	El general de los betalactámicos	El azufre endocíclico del anillo betalactámico es sustituido por un grupo metileno	Muy amplio espectro	Carbapenemasas en ciertos Gram negativos como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> o las pertenecientes al G. <i>Klebsiella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Imipenem (<i>Ln. lactis</i>) - Meropenem (<i>Ln. lactis</i>) - Ertapenem (<i>Ln. lactis</i>)
Inhibidores de las betalactamasas	Se emplean asociado con los betalactámicos, potenciando su actividad	Análogos estructurales de las penicilinas	Los 4 inhibidores de betalactamasas: ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam, se emplean asociados a una penicilina de amplio espectro. Activos frente a bacterias que dejaron de ser susceptibles a los betalactámicos (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i> spp. y <i>Bacteroides fragilis</i>). Los dos últimos presentan un espectro más amplio incluyendo bacilos Gram-negativos multirresistentes	Los dos primeros no son activos frente a las betalactamasas cromosómicas de <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Morganella</i> y algunas cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Si se combinan con los dos últimos, no presentan acción frente a metalobetalactamasas	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido clavulánico - Sulbactam - Tazobactam - Avibactam
Afenicoles	Inhiben la síntesis proteica a través de su unión a la fracción 50S de los ribosomas	El cloranfenicol (principal representante) es un derivado del ácido dicloroacético y contiene un anillo de	Amplio espectro	Se debe a la presencia de la enzima acetiltransferasa específica capaz de inactivar al antibiótico	<u>Cloranfenicol</u> (<i>Lb. reuteri</i> y <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> spp.)

		nitrobenzeno. Otros componentes de este grupo son derivados del cloranfenicol			
Glucopéptidos	Inhiben la síntesis de la pared bacteriana	Glucopéptidos, aunque la dalvabancina es un lipoglucopéptido	Alta actividad frente a cocos Gram-positivos. La vancomicina se emplea frente a infecciones por estafilococos meticilinresistentes y como último recurso en endocarditis. La teicoplanina de espectro similar presenta mayor durabilidad en su acción. La dalvabancina presenta actividad frente a estafilococos (incluyendo los resistentes a meticilina), estreptococos, neumococos y enterococos sensibles a vancomicina, así como a cocos Gram-positivos y anaerobios		<ul style="list-style-type: none"> - <u>Vancomicina</u> (<i>Lactobacillus</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>E. faecalis</i>) - Teicoplanina (<i>Lactobacillus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>E. faecalis</i>) - Dalvabancina
Lincosamidas	Inhiben la síntesis proteica mediante su unión a la fracción 50S del ribosoma	Existen dos tipos, la lincomicina y la clindamicina. La primera es un derivado del ácido propiligrínico y la segunda de su derivado 7-desoxi 7-cloro	Las lincosamidas (clindamicinas) son activas frente a Gram-positivos (excepto enterococos) y microorganismos anaerobios, incluyendo <i>Bacteroides</i> spp. Presentan también actividad frente a protozoos como el <i>Plasmodium</i> spp. o el <i>Toxoplasma gondii</i>	La resistencia a lincosaminas (clindamicinas) sucede a través de la dimetilación de residuos de adenina en el rRNA 23S de la subunidad ribosomal 50S. Pueden aparecer resistencias cruzadas entre lincosamidas, macrólidos y estreptograminas	<ul style="list-style-type: none"> - Lincosamidas - Clindamicinas (<i>L. lactis</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Propionibacterium acnes</i>, <i>Propionibacterium freudenreichii</i>, <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.)
Macrólidos	Inhiben la síntesis proteica mediante su unión a la fracción 50S del ribosoma	Formados por un anillo de lactona macrocíclico que puede tener 14, 15 ó 16 átomos de carbono, al que se unen diversos desoxiazúcares	Similar a las penicilinas, pero efectivos también frente a <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> y algunas <i>Rickettsias</i> y <i>Clamidas</i>	Han sido identificados 3 mecanismos de resistencia adquirida: la aparición de modificaciones estructurales en el lugar de unión al ribosoma, la existencia de bombas de expulsión activa y el desarrollo de enzimas inactivantes	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Eritromicina</u> (<i>Lactobacillus</i>, <i>L. lactis</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Propionibacterium acnes</i>, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Enterococcus</i> spp.) - Claritromicina - Roxitromicina - Azitromicina - Espiramicina acetil - Josamicina - Midecamicina diacetil

Nitroimidazoles	Son capaces de penetrar en el citoplasma celular por difusión pasiva y originar un producto intermedio reducido, que induce daño oxidativo en las cadenas de ADN de aquellos microorganismos anaerobios o microaerófilos	Se sitúa un grupo nitro normalmente en la posición 5 del anillo de imidazol	Son efectivos frente a protozoos (<i>Trypanosoma cruzi</i>) y bacterias anaerobias (<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>T. pallidum</i> , algunas cepas de <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> y <i>Klebsiella</i>)	El principal mecanismo de resistencia se produce por alteración de enzimas implicadas en la activación intracelular del antibiótico	<ul style="list-style-type: none"> – Metronidazol (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Bifidobacterium</i>) – Tinidazol – Benznidazol
Oxazolidinona	Inhiben la síntesis proteica mediante su unión a la fracción 50S del ribosoma y generar el complejo de iniciación 70S	Estructura de una oxazolidinona a la que se le adiciona un grupo hidroxacetilo y se sustituye por flúor en la posición 3 (mayor actividad)	Actividad frente a Gram-positivos	Debidas a mutaciones en los ribosomas o de enzimas modificadoras de los antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> – Linezolid (<i>Lactobacillus</i>, <i>E. faecalis</i>) – Tedizolid (<i>Lactobacillus</i>)
Quinolonas	Inhiben selectivamente la ADN girasa bacteriana, impidiendo el plegamiento de la doble hélice	Son 4-oxo-1,4-dihidroxiquinoleína, compuesta por dos anillos, uno de tipo piridona y otro aromático, que puede ser bencénico. La incorporación de un átomo de flúor en posición 6 dio origen a las fluoroquinolonas	Las quinolonas de 1ª generación son activas frente a los Gram-negativos. Las fluoroquinolonas tienen un espectro más amplio	La resistencia puede surgir por 4 posibles mecanismos: en bacilos Gram-negativos, por mutaciones cromosómicas en los genes codificantes de la ADN girasa; en bacilos Gram-positivos, por sobreexpresión de bombas de extracción del antibiótico; por producción de proteínas codificadas en plásmidos, que compiten con el antibiótico por su unión con la ADN girasa; por presencia de una enzima que acetila e inactiva los antibióticos (ciprofloxacino, norfloxacino)	<ul style="list-style-type: none"> – 1ª generación: ácido nalidíxico (<i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>O. oeni</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>E. faecalis</i>) – Fluoroquinolona: ciprofloxacino (<i>Pediococcus</i>, <i>E. faecalis</i>), norfloxacino (<i>Lactobacillus</i>) – 2ª generación: ofloxacino y ozenoxacino – 3ª generación: levofloxacino – 4ª generación: moxifloxacino y nadifloxacino
Rifamicinas	Inhiben la transcripción del ADN por unión a la subunidad B de la ARN polimerasa	Derivados de antibióticos macrocíclicos	Amplio espectro	La aparición de resistencia se provoca por una alteración en una región del gen <i>rpoB</i> de la ARN polimerasa. Asimismo, la presencia de pared dificulta la entrada del antibiótico al interior de la bacteria	<ul style="list-style-type: none"> – Rifabutina – Rifampicina (<i>Lactococcus</i>) – Rifaximina
Sulfanamidas	Inhiben la síntesis del ácido fólico de los organismos que lo necesitan para sobrevivir	Análogos estructurales del ácido <i>p</i> -aminobenzoico (sustrato para la síntesis del ácido fólico)	Amplio espectro, que se va reduciendo por la aparición de nuevas resistencias	Puede deberse a una mutación cromosómica o venir transmitida a través de plásmidos, induciéndose la sobreproducción del ácido <i>p</i> -aminobenzoico, una disminución en la permeabilidad al antibiótico o una	<ul style="list-style-type: none"> – Cotrimoxazol – Cotrimacina – Sulfacetamida – Sulfadiazina argéntica (<i>S. thermophilus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>O. oeni</i>)

				modificación en la estructura de la enzima diana	
Tetraciclinas	Interfieren en la síntesis proteica por unión a la subunidad 30S de los ribosomas	Cuatro anillos tetracíclicos con variación en sus cadenas laterales	Espectro muy amplio, que se va reduciendo por la aparición de nuevas resistencias	La mayoría viene codificada en plásmidos y se debe a una disminución en la permeabilidad y el bombeo activo al exterior. En ocasiones, tiene lugar a través de proteínas con capacidad para proteger a los ribosomas, inactivación enzimática o modificaciones de la diana	<ul style="list-style-type: none"> - 1ª generación: <u>tetraciclina clorhidrato</u> (<i>Lactobacillus</i>, <i>L. lactis</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Enterococcus spp.</i>) - 2ª generación: doxiciclina (<i>Pediococcus</i>, <i>E. faecalis</i>), minociclina - 3ª generación: oxitetraciclina, tigeciclina

^a Los antibióticos empleados en este trabajo aparecen subrayados.

Tabla S2. Recuentos microbiológicos de las cuajadas de Cabrales utilizadas en este estudio.

Medios (grupo microbiano)	BHI (mesófilos aróbcicos totales)									BP (estafilococos y micrococos)									VRBGA (enterobacterias)						
	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Cm	Km	Amp	Cipro	Cefo
Nº de cuajada	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Cm	Km	Amp	Cipro	Cefo
ufc/g de C1	3,64 x10 ⁹	4,86 x10 ⁷	1,01 x10 ⁸	4,98 x10 ⁵	3,17 x10 ⁷	1,72 x10 ⁶	1,43 x10 ⁶	1,42 x10 ⁶	8,15 x10 ⁷	5,51 x10 ⁶	3,90 x10 ⁶	9,14 x10 ⁵	1,20 x10 ⁴	2,98 x10 ⁶	1,02 x10 ⁴	1,24 x10 ⁴	2,25 x10 ⁴	1,41 x10 ⁴	1,76 x10 ⁵	7,12 x10 ³	9,20 x10 ³	6,80 x10 ³	3,55 x10 ⁴	6,67 x10 ³	1,13 x10 ⁴
ufc/g de C2	4,37 x10 ⁸	1,23 x10 ⁸	8,4 x10 ⁶	<10 ³	4,60 x10 ⁷	<10 ³	1,16 x10 ⁷	<10 ³	2,50 x10 ⁶	2,77 x10 ⁶	2,85 x10 ³	1,80 x10 ⁵	2,26 x10 ⁵	2,10 x10 ⁵	1,81 x10 ⁵	1,16 x10 ⁶	3,30 x10 ⁵	1,05 x10 ⁵	5,18 x10 ⁶	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	3,90 x10 ⁴
ufc/g de C3	2,40 x10 ⁸	4,60 x10 ⁶	2,35 x10 ⁶	9,80 x10 ⁵	<10 ⁴	1,00 x10 ⁶	3,32 x10 ⁷	<10 ³	7,00 x10 ⁶	7,77 x10 ⁷	7,71 x10 ⁶	1,01 x10 ⁷	<10 ²	8,22 x10 ⁶	<10 ²	5,06 x10 ⁴	9,05 x10 ³	1,32 x10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

Nota. En color amarillo se identifica la cuajada 1, en verde la cuajada 2 y en azul la cuajada 3. -: No se añadió antibiótico; Tc: tetraciclina; Em: eritromicina; Cm: cloranfenicol; Km: kanamicina; Amp: ampicilina; Va: vancomicina; Cipro: ciprofloxacino; Cefo: cefotaxima.

Tabla S3. Recuentos microbiológicos de los quesos maduros de Cabrales utilizados en este estudio.

Medios (grupo microbiano)	BHI (mesófilos aróbcicos totales)									BP (estafilococos y micrococos)									VRBGA (enterobacterias)						
	Antibiótico									Antibiótico									Antibiótico						
Nº de queso	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Em	Cm	Km	Amp	Va	Cipro	Cefo	-	Tc	Cm	Km	Amp	Cipro	Cefo
ufc/g de Q1	4,88 $\times 10^6$	3,6 $\times 10^5$	3,61 $\times 10^5$	5,64 $\times 10^4$	3,52 $\times 10^5$	2,867 $\times 10^4$	3,9725 $\times 10^5$	3,6425 $\times 10^4$	2,15 $\times 10^5$	4,2 $\times 10^5$	1,395 $\times 10^4$	3,915 $\times 10^4$	<10 ²	5,72 $\times 10^4$	1,5 $\times 10^3$	3,0 $\times 10^3$	3,3 $\times 10^3$	4,0 $\times 10^2$	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
ufc/g de Q2	2,92 $\times 10^6$	5,8 $\times 10^3$	3,905 $\times 10^4$	10 ³	6,35 $\times 10^4$	10 ²	1,413 $\times 10^3$	1,8 $\times 10^3$	2,485 $\times 10^4$	1,79 $\times 10^5$	7,5 $\times 10^2$	3x 10 ²	1 $\times 10^2$	4,0125 $\times 10^4$	<10 ²	10 ³	<10 ²	1,525x 10 ³	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
ufc/g de Q3	2,39 $\times 10^7$	6,645 $\times 10^4$	1,96 $\times 10^5$	3,66 $\times 10^3$	1,6 $\times 10^4$	3,083 $\times 10^3$	2,736 $\times 10^4$	2,865 $\times 10^3$	4,497 $\times 10^4$	2,756 $\times 10^5$	<10 ³	4,0575 $\times 10^4$	<10 ²	1,115 $\times 10^4$	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

Nota. En color amarillo se identifica el queso 1, en verde el queso 2 y en azul el queso 3. -: No se añadió antibiótico; Tc: tetraciclina; Em: eritromicina; Cm: cloranfenicol; Km: kanamicina; Amp: ampicilina; Va: vancomicina; Cipro: ciprofloxacino; Cefo: cefotaxima.