



UNIVERSIDAD DE JAÉN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

•

**BIODIVERSIDAD, PRODUCCIÓN DE
BACTERIOCINAS, SEGURIDAD Y
PROPIEDADES FUNCIONALES DE CEPAS
BACTERIANAS AISLADAS DE LECHE
MATERNA**

**PRESENTADA POR:
Wendy María Marín Gómez**

**DIRIGIDA POR:
Rosario Lucas López, María José Grande Burgos, y Antonio
Gálvez del Postigo**

JAÉN, mayo de 2020

ISBN

BIODIVERSIDAD, PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS, SEGURIDAD Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE LECHE MATERNA

Memoria para optar al grado de Doctor
Jaén, mayo, 2020

Fdo.: Wendy María Marín Gómez
Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:

LUCAS LOPEZ
MARIA DEL
ROSARIO -
26018383R

Firmado digitalmente por LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Número de reconocimiento IDN: c=ES, serialNumber=DCEP-26018383R, cn=LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO, o=UNIVERSIDAD DE JAÉN, cn=LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Fecha: 2020.05.21 09:48:53 +0200

GRANDE
BURGOS MARIA
JOSE -
76145521L

Firmado digitalmente por GRANDE BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Nombre de reconocimiento IDN: c=ES, serialNumber=DCEP-76145521L, cn=GRANDE BURGOS MARIA JOSE, cn=GRANDE BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Fecha: 2020.05.21 11:46:55 +0200

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo: María José Grande Burgos

GALVEZ DEL POSTIGO
RUIZ ANTONIO MIGUEL -
25041147N

Firmado digitalmente por GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N
Nombre de reconocimiento IDN: c=ES, serialNumber=DCEP-25041147N, givenName=ANTONIO MIGUEL, cn=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ, cn=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N
Fecha: 2020.05.21 11:56:52 +0200

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

Los directores de tesis **D^a. Rosario Lucas López, D^a. María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Biodiversidad, producción de bacteriocinas, seguridad y propiedades funcionales de cepas bacterianas aisladas de leche materna”** presentado por **D^a. Wendy M. Marín Gómez** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor.

Jaén, mayo de 2020

LUCAS LOPEZ
MARIA DEL
ROSARIO -
26018383R

Firmado digitalmente por LUCAS
LOPEZ MARIA DEL ROSARIO -
26018383R
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-26018383R,
givenName=MARIA DEL ROSARIO,
sn=LUCAS LOPEZ, cn=LUCAS LOPEZ
MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Fecha: 2020.05.22 08:34:21 +02'00'

GRANDE
BURGOS MARIA
JOSE -
76145521L

Firmado digitalmente por GRANDE
BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-76145521L,
givenName=MARIA JOSE,
sn=GRANDE BURGOS, cn=GRANDE
BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Fecha: 2020.05.21 23:37:49 +02'00'

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo.: María José Grande Burgos

GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ
ANTONIO MIGUEL -
25041147N

Firmado digitalmente por GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO
MIGUEL - 25041147N
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-25041147N, givenName=ANTONIO
MIGUEL, sn=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ, cn=GALVEZ DEL
POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N
Fecha: 2020.05.21 22:50:18 +02'00'

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Este trabajo ha sido subvencionado por el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Estructura AGR230), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), el Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología MESCyT de la República Dominicana y La Universidad ISA de Santiago, República Dominicana. La doctoranda ha disfrutado de una ayuda de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Jaén para la realización de estancias destinadas a la obtención de Mención Internacional en el título de doctor.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
I INTRODUCCIÓN	9
1.1 LECHE MATERNA	11
1.1.1 Componentes nutricionales de la leche materna.....	14
1.1.2 Componentes no nutricionales de la leche materna.....	20
1.1.3 Beneficios inmunológicos de la leche materna	24
1.1.3.1 Compuestos inmunológicos de la leche	25
1.1.4 Microbiota de la leche	26
1.1.4.1 Origen de la microbiota de la leche materna	27
1.1.4.2 Correlación geográfica con la composición de la microbiota de la leche materna.....	29
1.1.4.3 Correlación de la microbiota de la leche y la microbiota que se establece en los intestinos de los bebés.....	30
1.1.4.4 Importancia de la microbiota de la leche en bebés prematuros	31
1.2 BACTERIOCINAS	33
1.2.1 Clasificación de las bacteriocinas	34
1.2.2 Mecanismo de acción	35
1.2.3 Aplicación de las bacteriocinas de BAL en productos lácteos	36
1.3 PROBIÓTICOS	46
II OBJETIVOS	53
III MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1 MUESTRAS	59
3.2 MATERIALES	59
3.2.1 Medios de cultivo	59
3.2.1.1 Medios de cultivo de crecimiento	59

3.2.1.2 Medios de caracterización	63
3.2.1.3 Medios de evaluación de la actividad antimicrobiana	65
3.2.2 Microorganismos	66
3.3 MÉTODOS	67
3.3.1 Aislamiento y recuento de bacterias lácticas de la leche	67
3.3.1.1 Preparación de la muestra	67
3.3.1.2 Siembra e incubación	67
3.3.2 Caracterización mediante tinción y medios selectivos	67
3.3.2.1 Siembra en medios selectivos	67
3.3.2.2 Aislamiento y selección de bacterias	68
3.3.2.3 Tinción de Gram	68
3.3.3 Producción de bacteriocinas	68
3.3.3.1 Técnica en gota	69
3.3.3.2 Técnica con pocillos	69
3.3.3.3 Comprobación la naturaleza proteica del compuesto antibacteriano	70
3.3.4 Caracterización de las cepas seleccionadas	70
3.3.4.1 Crecimiento a pH alcalino (8 y 9,5)	71
3.3.4.2 Crecimiento a pH ácido (4,5)	71
3.3.4.3 Crecimiento en presencia de NaCl al 6,5% y 4%	71
3.3.4.4 Crecimiento en presencia de sales biliares e hidrólisis de la esculina	71
3.3.4.5 Determinación de la actividad hemolítica	71
3.3.4.6 Determinación de la actividad ADNasa	72
3.3.4.7 Determinación de la actividad proteasa	72
3.3.4.8 Ensayo de producción de exopolisacáridos	72
3.3.4.9 Determinación de la actividad amilolítica	73
3.3.4.10 Hidrólisis de la rafinosa y la estaquiosa	73
3.3.5 Estudio molecular	73
3.3.5.1 Extracción de ADN	73

3.3.5.2 Identificación bacteriana mediante la secuenciación del ADNr 16S.....	75
3.3.5.3 Análisis de resistencia a antimicrobianos mediante PCR.....	76
3.3.6 Estudio de biodiversidad bacteriana	78
3.3.6.1 Extracción de ADN total.....	78
3.3.6.2 Análisis de la biodiversidad bacteriana	78
IV RESULTADOS	81
4.1 AISLAMIENTO Y RECUENTO BACTERIANO	83
4.1.1 Tinción de Gram	85
4.2 PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS	86
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIOCINOGÉNICAS	90
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIOCINOGÉNICAS	95
4.4.1 Propiedades funcionales	95
4.4.2 Presencia de genes de resistencia a antimicrobianos	99
4.5 ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE LA LECHE MATERNA	102
4.6 ANEXOS.....	114
V DISCUSIÓN	157
VI CONCLUSIONES/ CONCLUDING REMARKS	177
VII BIBLIOGRAFÍA	185

RESUMEN

Se tomaron 3 muestras semanales de leche materna de una sola donante durante las semanas 21 a la 48 de la lactancia. Las ochenta y cuatro muestras obtenidas, se sembraron en diferentes medios de cultivo con el fin de realizar recuentos bacterianos tanto de mesófilos totales (TSA), bacterias ácido lácticas en dos medios (MRS y ELLIKER), estafilococos (VJ) como de enterobacterias y bacilos gram negativos (EMB). Los aerobios mesófilos totales y las bacterias ácido lácticas mantuvieron recuentos en torno a 3 - 4 unidades logarítmicas por mL de leche. Durante las 28 semanas en los medios TSA, MRS y ELLIKER siguieron la misma tendencia. Las primeras 9 semanas los niveles de estafilococos se mantuvieron en 2 logaritmos. A partir de ahí los recuentos fueron disminuyendo, incluso no se detectaron células viables en muchas de las semanas. En el caso de las enterobacterias solo durante 3 semanas se detectaron recuentos superiores a 2 logaritmos (semana 2, 5 y 6), después de la semana 18 los recuentos en placas fueron de cero. De las 582 cepas aisladas, 560 se identificaron como bacterias gram positivas representando el 96% de la población total y sólo el 3% (18 cepas) fueron identificadas como gram negativas. El 1% restante (4 cepas) pertenecían a levaduras. Así mismo 420 de las cepas bacterianas mostraron morfología cocoide (72%) y 158 presentaron una morfología bacilar (27%). Se estudió la producción de sustancias antimicrobianas de las 578 cepas bacterianas aisladas, mediante ensayos en gota y en pocillos. Las 101 cepas que producían sustancias inhibitoras de tipo bacteriocina fueron identificadas mediante secuenciación del ADNr 16S. Los resultados indicaron que este conjunto de cepas pertenecían solo a 3 filos; 84 cepas pertenecían al filo *Firmicutes*, 14 a *Proteobacteria* y 3 a *Actinobacteria*. Se observaron 5 órdenes: *Bacillales* con 73 cepas, *Lactobacillales* con 11 cepas, *Micrococcales* con 3 cepas, *Enterobacterales* (11 cepas) y *Pseudomonadales* (3 cepas). De la misma forma se obtuvieron 10 familias: *Staphylococcaceae* (47 cepas), *Bacillaceae* (22 cepas), *Listeriaceae* (1 cepa), *Paenibacillaceae* (3 cepas), *Leuconostocaceae* (4 cepas), *Enterococcaceae* (5 cepas), *Micrococcaceae* (3 cepas), *Pseudomonadaceae* (3 cepas) y *Enterobacteriaceae* (11 cepas). Se obtuvieron 11 géneros, siendo los más abundantes: *Staphylococcus* con el 46% de las bacterias, *Bacillus* con 22% y *Enterobacter* con 10%, seguido de *Enterococcus* (5%) y *Leuconostoc* (4%). Los géneros menos comunes fueron *Streptococcus* (2%),

Arthrobacter (3%), *Escherichia* (1%), *Listeria* (1%), *Paenibacillus* (3%) y *Pseudomonas* (3%). Posteriormente las cepas fueron caracterizadas funcionalmente y como parámetro principal para la selección se tomaron cepas que no mostrase actividad hemolítica ni hidrolítica del ADN, así como que pudieran al menos crecer en el medio de bilis esculina, a alta concentración de sal y bajo pH. De esta selección se obtuvieron 18 cepas como posibles probióticas. Por ultimo teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante pruebas de PCR para detectar genes de resistencia a antibiótico se seleccionaron 13 cepas que no presentaban genes de resistencia a antimicrobianos. Las cepas seleccionadas pertenecían a *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*.

Por otro lado se realizó un estudio de la diversidad bacteriana mediante secuenciación y análisis de los amplicones de la región variable V3-V4 del gen ribosómico 16S a partir del ADN extraído de las muestras de leche materna. Los principales phyla bacterianos detectados en las muestras de leche fueron *Firmicutes* y *Proteobacteria*, seguidos de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. La proporción de *Firmicutes* y *Proteobacteria* cambió considerablemente dependiendo de la semana de muestreo. Se detectaron un total de 411 géneros o taxones superiores en el conjunto de muestras, 63 de los cuales tenían abundancias relativas $\geq 1.0\%$ en al menos una de las muestras. Los géneros bacterianos más importantes detectados fueron *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, y *Cupriavidus* además de algunos miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*. El género *Streptococcus* se detectó en todas las muestras, con abundancias relativas entre 2.0% y 68.8%, siendo además el grupo más abundante en 14 de las muestras. *Carnobacterium* y *Lactobacillus* sin embargo presentaron abundancias relativas bajas. A nivel de género, la diversidad bacteriana cambió considerablemente en algunas semanas concretas dentro del período de tiempo estudiado. Las muestras de aquellas semanas o períodos con la abundancia relativa más baja de *Streptococcus* mostraron composiciones bacterianas más diversas, incluyendo géneros pertenecientes a *Proteobacteria* que estaban muy poco representados en el resto de las muestras.

SUMMARY

Milk samples were collected from a single mother three times a week during weeks 21 to 28 of the lactating period. The resulting 84 samples were spread-plated on different culture media in order to determine total viable counts for aerobic mesophiles (TSA), lactic acid bacteria (MRS and ELLIKER agars), staphylococci (VJ agar), enterobacteria and other gram-negative bacilli (EMB). Viable counts for total aerobic mesophiles and lactic acid bacteria remained between 3 and 4 log units per mL of milk. Counts obtained on TSA, MRS and ELLIKER agars followed similar trends during the 28 weeks. Counts of staphylococci remained around two log units for the first 9 weeks and then decreased (becoming undetectable at some weeks). Viable counts of enterobacteria only were above 2 log units for weeks 2, 5 and 6. No viable enterobacteria were detected after week 18. Among the collection of 582 isolates obtained from the plating media, 560 (96%) were gram positive bacteria and only 18 (3%) were gram negatives. The remaining 1% (4 isolates) were yeasts. 420 (72%) of the bacterial isolates were cocci, and 158 (27%) were bacilli. Production of antimicrobial substances by the 578 bacterial isolates was determined by the spot-on-a lawn test. Production in liquid media was tested by the agar well diffusion method. The selected 101 bacterial strains producing bacteriocin-like substances were identified by sequence analysis of the 16S rRNA gene. The results indicated that the 101 strains could be assigned to the following taxonomic categories, e.g., 3 phyla: *Firmicutes* (84 strains), *Proteobacteria* (14) and *Actinobacteria* (3); 5 orders: *Bacillales* (73), *Lactobacillales* (11), *Micrococcales* (3), *Enterobacteriales* (11) and *Pseudomonadales* (3); and 10 families: *Staphylococcaceae* (47), *Bacillaceae* (22), *Listeriaceae* (1), *Paenibacillaceae* (3), *Leuconostocaceae* (4), *Enterococcaceae* (5), *Micrococcaceae* (3), *Pseudomonadaceae* (3) and *Enterobacteriaceae* (11). The identified strains belonged to a total of 11 genera, the most abundant being *Staphylococcus* (46% of the strains), *Bacillus* (22%) and *Enterobacter* (10%), followed by *Enterococcus* (5%) and *Leuconostoc* (4%). Other less frequent genera found were *Streptococcus* (2%), *Arthrobacter* (3%), *Escherichia* (1%), *Listeria* (1%), *Paenibacillus* (3%) and *Pseudomonas* (3%). Further functional characterization of the strains was carried out aimed at selecting strains lacking haemolytic and DNase activities, and being able to grow on media containing bile-aesculin, a high salt concentration, and having low pH. Accordingly, 18 of the strains were selected as candidates to further

study their probiotic potential. Among them, after analysis of the results on PCR amplification of antimicrobial resistance genes, the resulting 13 strains lacking antimicrobial resistance genes were finally selected. The selected strains belonged to the following genera: *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*.

Bacterial diversity of the milk samples was studied by amplicon sequencing analysis of the V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene. *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the main phyla detected in the milk samples, followed by *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The proportion of *Firmicutes* to *Proteobacteria* changed considerably depending on the sampling week. A total of 411 genera or higher taxons were detected in the set of samples, 63 of which had relative abundances of $\geq 1.0\%$ in at least one of the samples. The most important bacterial genera detected were *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Cupriavidus* and members of F. *Enterobacteriaceae*. Genus *Streptococcus* was detected in all the samples, at relative abundances between 2.0% and 68.8%, and it was the most abundant group in 14 of the samples. *Carnobacterium* and *Lactobacillus* had low relative abundances. At genus level, bacterial diversity changed considerably at certain weeks within the studied period. The weeks or periods with lowest relative abundance of *Streptococcus* had more diverse bacterial compositions including genera belonging to *Proteobacteria* that were poorly represented in the rest of samples.

INTRODUCCIÓN

1.1 LECHE MATERNA

La leche materna es un biofluido extremadamente complejo y altamente variable que ha evolucionado a lo largo de milenios para así poder nutrir a los bebés y protegerlos de enfermedades mientras su propio sistema inmunológico madura. La composición de la leche materna humana cambia en respuesta a muchos factores, que se ajustan a las necesidades del bebé según su edad y otras características (Fujita et al., 2012; Michaelsen et al., 1990). Por lo tanto, se cree que la composición de la leche materna está específicamente adaptada en cada madre para así poder cubrir con precisión los requisitos de su bebé (Rockville, 2011).

La leche materna es un alimento específico de cada especie que suple las necesidades nutricionales de los bebés en su proceso de crecimiento, además de preparar su sistema inmunológico y de brindarles protección frente a los patógenos (Gómez-Gallego et al., 2016; Fernández et al., 2013). Este fluido biológico le proporciona al bebé hasta los seis meses de vida todas sus necesidades nutricionales y complementa su alimentación en los siguientes meses del desarrollo infantil (OMS, 2003). Hasta hace unos pocos años se creyó que la leche materna solo aportaba nutrientes, energía y compuestos inmunológicos al niño, y que esta era estéril, es decir que no contenía ningún tipo de microorganismo si no se había contaminado. Hoy sabemos que la leche humana proporciona múltiples componentes biológicamente activos: factores inmunológicos, lípidos, oligosacáridos, microRNAs y hormonas (Hennet y Borsig, 2016), cuya concentración varía según la madre y los factores ambientales y se adapta a las necesidades del bebé (Hunt et al., 2011; Andreas et al., 2015; Feng et al., 2016; Gómez-Gallego et al., 2016; Kumar et al., 2016; Ruiz et al., 2017).

Gracias a estudios recientes sabemos que la leche materna tiene una amplia microbiota que la madre pasa al hijo a través de la misma para mejorar sus defensas y poblar los intestinos del bebé. Estos microorganismos son los que ayudaran a un correcto y adecuado desarrollo de las funciones intestinales

(Fernández et al., 2013). Es conocida la importancia de una adecuada microbiota, ya que la misma puede tanto ayudarnos a mejorar nuestra salud como hacernos más propensos a enfermedades tales como diabetes, obesidad, alergias, diarreas, enterocolitis, colon irritable, etc.

Se ha demostrado que existe una inoculación directa de la madre a través de la leche de bacterias de los grupos *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Algunas de estas cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se utilizan también en la industria alimentaria como probióticos (McGuire y McGuire, 2015). Se ha descrito en diferentes estudios que la leche materna aporta hasta 10^7 microorganismos al lactante por día, aunque la función de estos microorganismos en la salud de los lactantes no se ha estudiado muy a fondo, se sabe que son estos microorganismos los que poblarán la boca y los intestinos del mismo (Fernández et al., 2013; Jeurink, 2013). El límite máximo establecido de unidades formadoras de colonias está en el rango 6 a 8×10^2 UFC/mL (Salamanca-Grosso et al., 2019). Estas bacterias podrían proteger al bebé frente a las infecciones y contribuir a la maduración de su sistema inmunitario, entre otras funciones. Diferentes estudios sugieren que algunas bacterias presentes en el intestino materno podrían llegar a la glándula mamaria durante la última etapa del embarazo y durante la lactancia a través de un mecanismo que involucra monocitos intestinales. Por lo tanto, la modulación de la microbiota intestinal materna durante el embarazo y la lactancia también podría tener un efecto directo en la salud infantil (Fernández et al., 2012). Los estudios de los últimos años han comprobado los beneficios de dar el pecho desde un punto de vista microbiológico, metabólico e inmunológico y se están buscando estrategias que puedan promover la salud materna infantil a través de la transferencia de microbiota de la leche humana a niños que no puedan ser amamantados (Fernández et al., 2018).

La colonización microbiana temprana del intestino neonatal ejerce un efecto importante sobre el estado de salud del huésped (Penders et al., 2006;

Dominguez-Bello et al., 2010). La colonización temprana está influenciada por una serie de factores, como pueden ser la práctica de la alimentación, o la composición del microbioma intestinal que difiere entre los lactantes amamantados y los alimentados con leche de fórmula (Bezirtzoglou et al., 2011). Se ha descrito que los lactantes alimentados con leche materna tienen una población bacteriana más estable, mientras que la microbiota de los lactantes alimentados con leche de fórmula parece ser más diversa y contiene un mayor número de *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (Penders et al., 2005; Wang et al., 2015; Backhed et al., 2015). Los lactantes alimentados con fórmula tienen una mayor morbilidad y mortalidad durante el primer año de vida y tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones respiratorias y gastrointestinales y enfermedades como enterocolitis necrosante y sepsis, en comparación con los lactantes amamantados (Kramer et al., 2003; Ladomenou et al., 2010).

Los efectos que promueven la salud de la leche humana se han relacionado con la abundancia de moléculas bioactivas presentes en la misma, incluidos anticuerpos secretores, células inmunes, proteínas antimicrobianas como lactoferrina, CD14 y lisozima, citocinas reguladoras y oligosacáridos de la leche humana (Newburg, 2005). Aunque no son digeribles por el lactante, estos oligosacáridos ejercen efectos inmunomoduladores, estimulan el crecimiento de bacterias comensales, particularmente las bifidobacterias, y participan en la defensa frente a patógenos al evitar la adhesión al epitelio intestinal durante un período vulnerable de la vida, cuando las propias defensas del lactante son inmaduras (Bode, 2012).

Se sabe que la leche humana es en sí misma una fuente de bacterias comensales que pueden colonizar el intestino del lactante. Las principales poblaciones bacterianas que se han identificado son especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, aunque también se han aislado bacterias del ácido láctico y bifidobacterias (Heikkila y Saris, 2003; Martin, 2003; Martin, 2006). En estudios publicados anteriormente, mediante técnicas dependientes de cultivo, en la

microbiota de la leche de la mayoría de las madres predominaban *Staphylococcus* y *Streptococcus*, mientras que un estudio más reciente reveló una mayor diversidad microbiana en la leche humana de lo que se pensaba originalmente, con más de 700 especies identificadas (Hunt et al., 2011; Cabrera-Rubio et al., 2012). Curiosamente, el estudio también describió que la microbiota de la leche humana era diferente en su composición a la de otros nichos corporales y eran también determinantes en la composición el peso materno y el tipo de parto.

El origen del microbioma de la leche humana ha sido objeto de debate durante mucho tiempo. Los posibles orígenes incluyen bacterias de la piel materna y de la cavidad oral del bebé, donde se ha demostrado que durante la lactancia, se produce un alto grado de reflujo hacia los conductos mamarios (Ramsay et al., 2004). Más recientemente, se ha publicado que el intestino materno es una fuente de bacterias que ingresan a las glándulas mamarias a través de la vía entero-mamaria, una ruta que involucra células dendríticas fagocíticas que penetran en el epitelio intestinal y transportan bacterias a través del sistema circulatorio (Fernández et al., 2013; Rescigno et al., 2001; Perez et al., 2007). Esto es importante ya que la manipulación de la microbiota materna podría usarse para promover un microbioma óptimo de la leche humana. Dados los importantes efectos que la lactancia materna ejerce sobre la salud y el desarrollo del lactante, es importante definir la composición de la microbiota de la leche humana.

1.1.1 Componentes nutricionales de la leche materna

a) Lípidos

Los lípidos son la mayor fuente de energía en la leche materna, contribuyendo con el 40-55% de la energía total (Koletzko y Rodriguez-Palmero, 2001). Estos lípidos están presentes como una emulsión. La gran mayoría de los lípidos secretados son triacilglicéridos, contribuyendo al 98% de la fracción lipídica (Figura 1). El resto consiste predominantemente en diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol (Lopez y Menard 2011; Michalski et al., 2005).

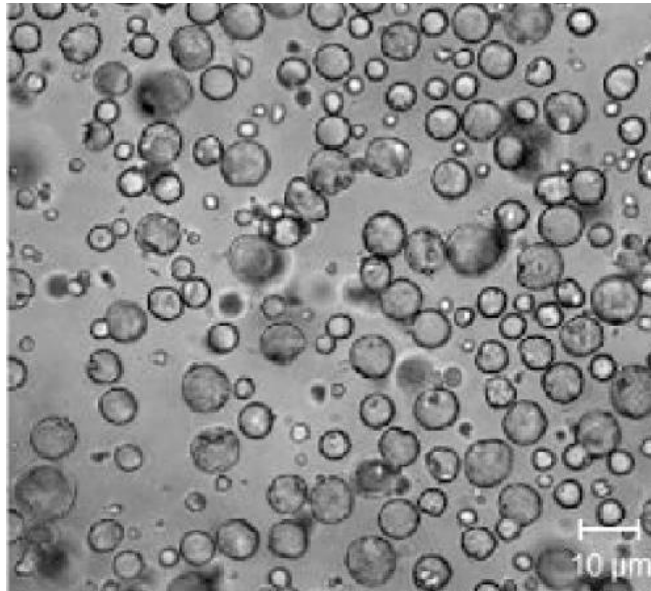


Figura 1: Imagen por microscopía óptica de los lípidos de la grasa de la leche (Zou et al., 2012; Andreas et al., 2015).

La leche materna contiene más de 200 ácidos grasos; sin embargo, muchos de estos están presentes en concentraciones muy bajas, mientras otros son los que dominan, por ejemplo el ácido oleico representa 30-40 g/100 g de grasa en la leche materna (Koletzko et al., 1988). La síntesis de ácidos grasos representa aproximadamente el 17% de la grasa total en la leche materna (Prentice et al., 1989). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, moléculas con una longitud de cadena de más de 20 átomos de carbono, con 2 o más enlaces dobles, constituyen el 2% del total de ácidos grasos presentes en la leche materna (Laryea et al., 1995).

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que se encuentran en la leche materna son también una fuente importante de energía (Donohoe et al., 2011), además de ser esenciales en la maduración normal del tracto gastrointestinal

(Peng et al., 2009). Las esfingomielinas, presentes en la membrana del glóbulo de grasa láctea, son especialmente importantes para la mielinización del sistema nervioso central, y se ha demostrado que mejoran el desarrollo neuroconductual de los lactantes con bajo peso al nacer (Tanaka et al., 2013).

Por otro lado los lípidos de la leche materna inactivan una serie de patógenos in vitro, incluido los estreptococos del Grupo B (GbS). Esto sugiere que los lípidos, particularmente monoglicéridos de cadena media, proporcionan una protección adicional frente a infecciones invasivas en la superficie de la mucosa (Isaacs et al., 1995).

b) Proteínas

La leche materna contiene más de 400 proteínas diferentes que realizan una variedad de funciones: nutrición, actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras, así como estimular la absorción de nutrientes (Molinari et al., 2012; Lonnerdal, 2004). Las proteínas presentes en la leche se pueden dividir en tres grupos, caseínas, proteínas del suero de la leche y mucina (Lonnerdal, 2003). Las proteínas del suero de la leche y la caseína se clasifican según su solubilidad, las primeras solubles están presentes en la solución, mientras que las caseínas están presentes en micelas, suspendidas en solución (Jensen, 1995). Las mucinas están presentes en la membranas de los glóbulos grasos (Lonnerdal, 2004). Las proteínas presentes en cantidades significativas en la fracción de suero de leche son la lactalbumina, lactoferrina, IgS, albúmina sérica y lisozima (Lonnerdal, 2004).

Hay tres tipos de caseína presentes en la leche humana, la alfa, beta y gamma caseínas. La caseína total estabiliza las caseínas insolubles y forman una suspensión coloidal, la micela de caseína que se muestra en la Figura 2. El contenido total de proteínas de la leche materna humana consiste en un 13% de caseína, la concentración de caseína más baja de cualquier especie estudiada (Neville, 1983).

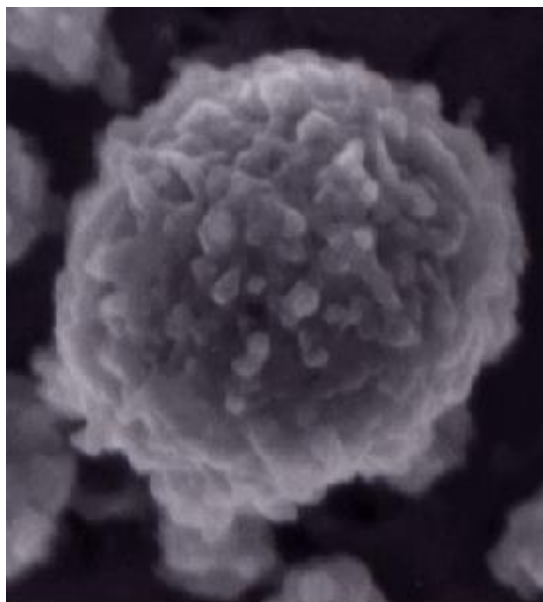


Figura 2: Imagen a microscopio electrónico de barrido de la estructura de una micela de caseína (Dalglish et al., 2004; Andreas et al., 2015).

c) Nitrógeno no proteico

El nitrógeno no proteico, compuesto por moléculas como la urea, la creatinina, los nucleótidos, los aminoácidos libres y los péptidos, contribuye al 25 % del nitrógeno total presente en la leche (Jenness, 1979). Esta fracción poco estudiada de la leche materna contiene muchas moléculas bioactivas. Por ejemplo, los nucleótidos se consideran nutrientes condicionalmente esenciales durante los primeros años de vida, y desempeñan funciones clave en diversos procesos celulares, como alterar las actividades enzimáticas y actuar como mediadores metabólicos (Uauy et al., 1994). Además, se sabe que los nucleótidos son beneficiosos para el desarrollo, maduración y reparación de la mucosa gastrointestinal (Uauy et al., 1994), así como para el desarrollo de la microbiota (Singhal et al., 2008), y la función inmune (Gutierrez-Castrellon et al., 2007).

d) Carbohidratos

En la leche están presentes una gran variedad de carbohidratos diferentes y complejos, siendo el más abundante con diferencia un disacárido que consiste en glucosa ligada covalentemente a la galactosa. De hecho, la lactosa está presente en concentración mayor en los seres humanos en comparación con cualquier otra especie, y responde a las altas demandas de energía del cerebro humano. Los oligosacáridos de la leche humana (HMO) también conforman una fracción significativa de los carbohidratos de la leche materna, pero son indigeribles por el bebé, su función en su lugar es nutrir la microbiota gastrointestinal (Coppa et al., 1993).

e) Oligosacáridos

Los oligosacáridos son un componente importante dentro de los carbohidratos de la leche materna, siendo el tercer componente más importante, con un total de 12,9 g/l en leche madura y 20,9 g/L a los 4 días después del parto (Coppa et al., 1993). Contienen entre 3 a 22 unidades de sacárido por molécula, y se componen de 5 azúcares diferentes, que se encuentran en diferentes secuencias y orientaciones.

Los monosacáridos que componen los oligosacáridos son L-fucosa, D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico. Se sabe que hay más de 200 tipos diferentes de oligosacáridos en la leche materna, y todos cuentan con lactosa en el extremo reductor (German et al., 2008).

Los oligosacáridos funcionan como prebióticos, fomentando el crecimiento de ciertas cepas de bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium infantis*, dentro del tracto gastrointestinal infantil, y protegiendo al bebé de la colonización por bacterias patógenas (Ward et al., 2006). Desempeñan un papel importante en la prevención de infecciones diarreicas y respiratorias en neonatos (Newburg y Walker, 2007; Morrow et al., 2004).

La producción de oligosacáridos viene determinada genéticamente, se producen diferentes perfiles de oligosacáridos de la leche como resultado de las enzimas transferasas específicas expresadas en los lactocitos. Además, se ha observado que sirven para modular las respuestas de las células epiteliales intestinales, como moduladores inmunes, alterando tanto el entorno del intestino, reduciendo el crecimiento celular, e induciendo la diferenciación y la apoptosis (Kuntz et al., 2009), así como las respuestas inmunitarias, modificando las respuestas de las células T a una producción equilibrada de citoquinas Th1/Th2 (Eiwegger et al., 2010).

El mecanismo por el cual los oligosacáridos protegen a los bebés frente a una infección gastrointestinal es su capacidad de actuar como receptores señuelos. Un paso crucial en el inicio de la infección es la unión de los patógenos a carbohidratos presentes en las células epiteliales intestinales. Los oligosacáridos inhiben este proceso debido a sus formas análogas a los carbohidratos de la superficie celular, los patógenos reconocen y se unen a estos, se anclan las bacterias a la capa mucosa y previenen la adhesión celular a las células epiteliales. Una vez unidos, los patógenos pasan inofensivamente fuera del tracto gastrointestinal. Morrow et al., en 2004 encontraron una asociación significativa entre los niveles de oligosacáridos específicos vinculados a la leche materna y las tasas de diarrea por infección por *Campylobacter* en lactantes alimentados con leche materna. Además, los lactantes que recibieron leche que contenía una baja concentración de lacto-N-difucohexaosa tuvieron una mayor incidencia de diarrea por calicivirus (Morrow et al., 2004). Los oligosacáridos también previenen la adherencia de *Streptococcus pneumoniae* (Andersson et al., 1986) y *E. coli* (Cravioto et al., 1991), lo que sugiere que estos son capaces de proporcionar protección frente a muchas infecciones bacterianas y virales (Gray et al., 1988; Wilkinson, 1975; Kobata, 2010; Pritchard et al., 1992). Del mismo modo que las estructuras de los oligosacáridos están determinadas genéticamente, las madres que poseen diferentes genotipos, y por lo tanto diferentes perfiles de estos, pueden proteger a sus lactantes de ciertas infecciones en mayor o menor medida,

dependiendo de la presencia de estos oligosacáridos específicos en el momento del establecimiento de la microbiota (Lewis et al., 2015).

f) Minerales

Aunque la proporción de minerales en la leche materna es más baja que la que podemos encontrar en la leche de otros animales es una concentración constante compuesta por sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio y fósforo, junto con trazas de hierro, zinc, cobre, manganeso, selenio y yodo. Según Piciano (1998) estos minerales en relación con la proporción de otros componentes facilitan la absorción, metabolismo y excreción de la leche.

1.1.2 Componentes no nutricionales de la leche materna

La composición de la leche materna es extremadamente compleja, variando con la hora del día, la etapa del proceso de lactancia, y muchos otros factores, siendo los lípidos los que más varían en términos de concentración (Lawrence, 2005).

a) Duración de la lactancia

La leche se clasifica comúnmente en calostro, leche de transición y leche madura. Sin embargo, no se trata de clases distintas de leche, sino que se refiere a la alteración gradual del contenido de la leche a lo largo de la lactancia (Jenness, 1979). El calostro, la primera leche producida, es significativamente diferente de la leche madura, y contiene altas concentraciones de proteína de suero de leche, mientras que las caseínas son casi indetectables (Jenness, 1979). El contenido medio de proteínas en la leche materna disminuye gradualmente desde el segundo hasta el séptimo mes, después de lo cual la velocidad de reducción del contenido proteico disminuye. El calostro contiene bajas concentraciones de lactosa y grasa en comparación con la leche madura (Jenness, 1979; Saint et al., 1984). La producción de lactosa es más alta del cuarto al séptimo mes, después

de lo cual disminuye, mientras se produce un aumento gradual en la concentración de lípidos con la lactancia (Kader et al., 1972).

El calostro es diferente a la leche materna madura en términos de propiedades bioactivas, ya que contiene altas concentraciones de inmunoglobulinas secretoras (Castellote et al., 2011). Estas cualidades sugieren que el papel principal del calostro no es nutricional, sino inmunológico, protegiendo al bebé a medida que emerge del ambiente relativamente estéril del útero, a estar expuesto a muchos patógenos ambientales. De acuerdo con esto, la concentración de oligosacáridos en el calostro es particularmente alta, siendo aproximadamente el doble que en la leche madura, con concentraciones que reducen de 21 g/L a 13 g/L desde el día 4 hasta el día 120 post-parto (Coppa et al., 1999).

Además de sus funciones inmunológicas y nutricionales, el calostro parece actuar también como un promotor del crecimiento. Contiene muchos factores de crecimiento, de nuevo a menudo en concentraciones mayores que en la leche Madura; por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (Okada et al., 1991), TGF- β (Saito et al., 1993) y factor estimulante de colonias-1 (Flidel-Rimon y Roth, 1997) se encuentran en concentraciones más altas en el calostro que en la leche materna madura.

b) Tiempo desde la última alimentación

Uno de los factores más significativos de la concentración de grasa láctea es el período de tiempo transcurrido desde la última toma del bebe, cuanto más largo sea este intervalo entre tomas, menor será la concentración de grasa en la leche. De acuerdo con esto, se ha descrito que las concentraciones de grasa al final de la toma, así como el volumen de leche recibida, son factores particularmente importantes en la concentración de grasa láctea (Jackson et al., 1988).

c) Etapa del proceso de lactancia

La etapa del proceso de lactancia da lugar a una gran alteración en la composición de la leche materna, y es la responsable de algunas de las mayores variabilidades que se ven en la composición de la leche. Hay un aumento gradual en el contenido de grasa desde el principio, conocido como leche inicial, hasta el final de un alimento, leche final, mientras que la lactosa muestra una correlación inversa con el contenido de grasa (Hyttén, 1954).

d) Variación diurna

Se produce una variación diurna en la concentración de grasa de la leche, con un contenido máximo de grasa que se produce a media mañana, y un contenido bajo durante la noche, que varía de 5 g/100 mL a 3 g/100 mL (Jenness, 1979).

e) Edad de la Madre

La concentración de proteínas es más alta en la leche materna de las madres de 20 a 30 años. Sin embargo, la edad materna no parece influir en las concentraciones de lípidos o lactosa (Kader et al., 1972), en general la edad materna no tiene un gran impacto en la composición de la leche.

f) Dieta

La influencia de la dieta materna en la composición de la leche materna es compleja. Dependiendo del tipo de nutrientes, la dieta materna puede prácticamente no tener ningún impacto en una concentración de determinados nutrientes, mientras que para otros nutrientes, la dieta materna puede tener grandes variaciones (Innis, 2014).

Investigaciones previas sobre el contenido de macronutrientes de la leche materna de madres de diferentes etnias encontraron poca variación basada en la

dieta (Lonnerdal et al., 1976), y la variación en la concentración de lípidos de la leche parece ser independiente de la dieta materna (Ballard y Morrow, 2013). Sin embargo, los ácidos grasos específicos que forman la fracción lipídica sí son sensibles a la dieta materna. Estos ácidos grasos son sintetizados endógenamente por la glándula mamaria, o tomados del plasma materno, y ambas de estas fuentes de ácidos grasos están influenciados por la dieta materna (Innis, 1992).

Numerosos estudios que investigan el perfil de ácidos grasos de la leche materna han observado que puede ser alterado mediante la manipulación de la dieta materna (Innis, 1992; Brenna et al., 2007; Koletzko et al., 1992), especialmente los ácidos grasos omega-6 y omega-3 monoinsaturados. Los ácidos grasos dietéticos se transfieren rápidamente a la leche materna, en un periodo de 2 a 3 días la leche materna cambia para imitar la grasa dietética (Insull, 1959). Se ha observado que las mujeres que reciben una dieta alta en carbohidratos y bajas en grasas aumentan la síntesis ácidos grasos de cadena media para mantener la cantidad de triacilglicéridos en la leche materna (Novak y Innis, 2011).

g) Origen étnico

Un análisis que resume la investigación sobre la composición de la leche de las madres de siete países sugiere que la composición de la leche materna es relativamente coherente en diferentes etnias. Tan sólo se observa alguna variación en el contenido de grasa. Es importante destacar que la magnitud de la variación interindividual entre madres de la misma etnia fue igual que la observada entre madres de diferentes etnias (Jenness, 1979).

h) Aumento de peso durante el embarazo

Se ha descrito que existe una correlación entre el aumento de peso materno durante el embarazo y el contenido de grasa de la leche maternal. Sin embargo,

esto sólo se observó que era estadísticamente significativo a los cuatro meses después del parto. Los investigadores plantean la hipótesis de que éste fenómeno puede deberse a la acumulación de reservas de grasa durante el embarazo, que se utilizan como reserva de energía durante la lactancia y que disminuye más rápidamente en el grupo de madres de bajo aumento de peso (Michaelsen, 1997). A pesar de este hallazgo, otros dos estudios no pudieron identificar una asociación entre el aumento de peso materno durante el embarazo y el contenido de grasa de la leche materna (Butte et al., 1984; Dewey et al., 1986).

i) Peso al nacer

La concentración de grasa de la leche aumenta cuando se produce una desviación del peso normal del nacimiento; es decir, existe una asociación en forma de U entre el contenido de grasa y el peso al nacer del bebé, con un aumento del 20-30% observado en los pesos de nacimiento infantil más bajos y más altos. La concentración de proteínas y carbohidratos no parece cambiar significativamente en relación con el peso del bebé al nacer (Michaelsen et al., 1990). Sin embargo, este estudio no recopiló información sobre la duración de la gestación, por lo tanto, esta influencia puede ser simplemente un marcador de la madurez del bebé.

1.1.3 Beneficios inmunológicos de la leche materna

La leche materna con factores inmunológicos, se podría ver como una interfase entre el sistema inmunológico del niño y la madre. Los nutrientes de la leche ayudan a desarrollar el sistema inmune y a la maduración intestinal. La composición de la leche materna varía según la etapa de la lactancia, algunas personas lo ven como un elemento vivo que se adapta a las necesidades del niño. El niño no tendrá un sistema inmunológico propio hasta los 30 días, por lo que la primera leche tiene un contenido mucho más alto de IgAs (Rodrigo-Aviles et al., 2020).

1.1.3.1 Compuestos inmunológicos de la leche.

Entre los compuestos inmunológicos de la leche están: Inmunoglobulina A, lactoferrina, lisozima, caseína, citoquinas, o enzimas. Los antígenos de la madre se integran a la mucosa del intestino y ayudan al desarrollo de la respuesta inmunológica del recién nacido. En resumen, la leche materna contiene factores antimicrobianos, antiinflamatorios e inmunomoduladores. La leche tiene efecto frente bacterias, virus, parásitos y hongos (Rodríguez-Aviles et al., 2020).

Se considera que la leche materna puede prevenir, entre otras enfermedades: bronquiolitis, dermatitis atópica, diabetes tipo 1 y 2, enfermedades celíacas, enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis necrotizante, gastroenteritis, infecciones del tracto respiratorio superior, leucemia, obesidad, otitis media, o síndrome de muerte súbita del lactante (Basulto, 2015).

La leche materna contiene factores bioactivos que son capaces de inhibir la inflamación, así como mejorar la producción de anticuerpos específicos, incluyendo los compuestos PAF-acetilhidrolasa, antioxidantes, interleuquinas 1, 6, 8, y 10, el factor de crecimiento transformante (TGF), inhibidores de la proteasa de leucocitos secretores (SLPI) y defensina 1 (Hanson y Korotkova, 2002). La leche materna también contiene factores con potencial para mediar la diferenciación y el crecimiento de las células B, incluidas las altas concentraciones de molécula de adhesión intracelular 1 y la molécula de adhesión vascular 1; y concentraciones más bajas de S-selectina soluble, L-selectina y CD14 (Hanson y Korotkova, 2002).

Además, los receptores de reconocimiento de patrones, que son factores cruciales en el reconocimiento de microorganismos en el tracto respiratorio neonatal y el intestino, también están presentes en la leche materna. Factores como los receptores tipo Toll (TLR-2 y TLR-4) proporcionan un reconocimiento microbiano eficiente, trabajando en sinergia con el coreceptor CD14 y el CD14 soluble, que se encuentran en grandes cantidades en la leche materna (Labeta et al., 2000). También se ha observado una mayor regulación por el receptor tipo Toll

2 (sTLR-2) que regula la activación celular a través de TLR2 de la superficie celular en la leche materna, pero no en la leche de fórmula infantil (Levy, 2007).

1.1.4 Microbiota de la leche

Mediante estudios basados en técnicas de cultivo solo se han aislados bacterias de rápido crecimiento, especialmente bacterias gram positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*). Solamente utilizando medios específicos y largas incubaciones de forma anaeróbica se han obtenidos bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*) y *Bifidobacterium* (Solís et al., 2010; Arboleya et al., 2011; Murphy et al., 2017). Estos ensayos tienen la ventaja de que permiten el aislamiento de las cepas para posteriores estudios y pruebas, entre los estudios más comunes destacan: búsqueda de bacterias probióticas, de bacteriocinas, o virulencia y resistencia a antibióticos (Ruiz et al., 2019). Gracias a algunos de estos estudios se sabe que la leche materna de madres saludables cumple con todos los requisitos necesarios para ser un probiótico humano (Fernández, 2013). En general se han estudiado más las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, dejando a un lado los estafilococos y estreptococos que son la microbiota más abundante de la leche materna.

En un estudio realizado por Torres-Ramírez et al., (2018) "Análisis bacteriológico de leche materna del banco de leche humana del Hospital General Fresnillo" esperaban, debido al bajo nivel socio-cultural de las donantes, una carga importante de cepas gram negativas patógenas. En los ensayos de las veinte muestras tomadas se aislaron 27 cepas bacterianas: diez de *Serratia*, seis *Staphylococcus*, cinco *Streptococcus*, dos *Shigella*, dos *Escherichia*, un *Micrococcus*, y una *Salmonella*.

Mediante los estudios metagenómicos se puede evaluar toda la microbiota de la leche y lograr identificar cepas de bacterias que continúan sin ser

identificadas mediante cultivo por medios tradicionales (Mira y Rodríguez, 2017). Estos estudios comprobaron la presencia de los principales grupos identificados por estudio de cultivo, pero también encontraron grupos como *Bacteroides* y *Clostridium*, que no se habían identificado previamente. Mediante análisis de pirosecuenciación se ha comprobado la complejidad de los ecosistemas de la leche, donde 9 grupos de bacterias fueron comunes a todas las muestras de leche humana evaluadas: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* spp., y *Bradyrhizobiaceae*. Los resultados de pirosecuenciación fueron diferentes a los de cultivo y a los análisis de secuenciación total de ADN que indicaban que el 65% de las bacterias son *Proteobacterias*, el otro 34% *Firmicutes* como phyla predominantes, mientras que a nivel de género el 61% pertenecían a *Pseudomonas*, el 33.4% estafilococos y el 0.5% estreptococos. La presencia en las muestras de bacterias estrictamente anaerobias, como *Clostridium* y bifidobacterias, también son parte de los hallazgos sobre la microbiota de la leche materna (Rodríguez, 2014; Rautava et al., 2012). En otro estudio reciente se concluyó que en todas las muestras en general dominaban *Staphylococcus* y/o *Streptococcus* y/o *Pseudomonas*, pero hubo diferencia estadística significativa entre los donantes y el método de extracción de ADN utilizados (Douglas et al., 2020).

Se ha estudiado también el efecto de la localización geográfica en la leche materna, de la salud de la madre, el método de parto, la correlación de la microbiota de la leche y la microbiota intestinal del recién nacido, efectos de almacenaje y temperatura, entre muchos otros factores y correlación de factores (Ruiz et al., 2019). A continuación se detallan algunos de esos estudios.

1.1.4.1 Origen de la microbiota de la leche materna.

Algunos científicos creen que la microbiota de la leche materna proviene de la piel de la madre que coloniza la boca del bebé durante el proceso de amamantado,

otros que existe una vía de transmisión de estas bacterias desde el intestino de la madre hasta los canales mamarios, y una posible tercera vía surge al comprobar la existencia de bacterias comensales en el tejido mamario humano (Fernández et al., 2013; Jeurink et al., 2013). La microbiota de la leche materna no se parece a la microbiota que se puede encontrar en las mucosas, heces u otras muestras corporales humanas, esta es única y muy diversa. La única correlación encontrada es entre la leche materna, la cavidad oral y los intestinos del lactante, al igual que en el líquido amniótico y la placenta materna.

Las fuentes potenciales de bacterias de la leche materna son: la piel de la madre, la boca del bebé y los intestinos de la madre. Inicialmente se pensó que la piel de la madre era la fuente de contaminación de las bacterias en la leche humana, esto debido a que algunas de las bacterias más abundantes en la leche (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*) se relacionan de forma general con la microbiota de la piel. Una inoculación dentro de las glándulas mamarias durante el amamantado parecería una forma clara de entrada de bacterias desde la boca del niño, para esto se basaban en la presencia de *Veillonella*, *Leptotrichia* y *Prevotella* en el calostro, que son bacterias normalmente relacionadas con la microbiota de la boca. Pero ninguna de estas fuentes podría explicar la presencia de bacterias estrictamente anaerobias (*Bifidobacterium* y *Clostridium*), por lo que algunos científicos pensaron en una posible translocación de las bacterias del intestino a las glándulas mamarias.

En los últimos años, los resultados proporcionados por diferentes grupos de investigación sugieren que ciertas bacterias del tracto gastrointestinal materno podrían translocar a través de un mecanismo que involucra células inmunitarias mononucleares, migrar a las glándulas mamarias a través de una vía celular endógena (la vía enteroma bacteriana), y posteriormente colonizar el tracto gastrointestinal del neonato alimentado con mama (Figura 3). Si se confirman tales hallazgos en el futuro, podríamos ejercer una influencia positiva en la salud infantil modulando la microbiota intestinal materna (Rodríguez, 2014). En la actualidad se

tiende a creer que no existe una sola vía de inoculación de la leche materna, sino que las tres vías contribuyen en la diversidad de la microbiota de la leche materna (Mira y Rodríguez, 2017).

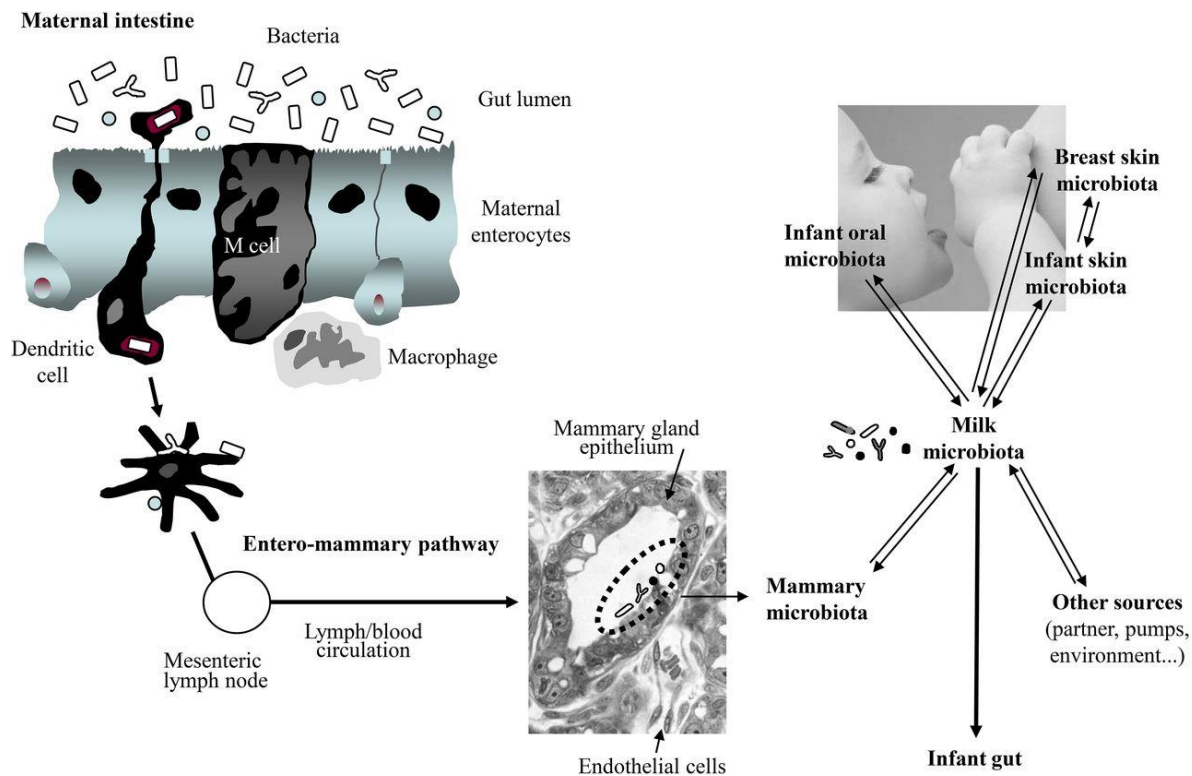


Figura 3: Origen de las bacterias presentes en la leche materna (Rodríguez, 2014).

1.1.4.2 Correlación geográfica con la composición de la microbiota de la leche materna.

Un estudio de 2019 ha evaluado la diferencia de la leche materna entre 11 grupos separados geográficamente, los grupos eran: Etiopía rural, Etiopía urbana, Gambia rural, Gambia Urbana, Kenia, Perú, España, Suecia, Ghana, Estados Unidos Población latina California y Estados Unidos Wisconsin caucásico. En el estudio se identificaron 15 familias de bacterias en la leche, siendo firmicutes,

proteobacterias, actinobacterias y bacteroides el 97,7% de las familias. Los firmicutes fueron estadísticamente menos y las proteobacterias más en Etiopía rural que en los demás grupos. Las actinobacterias fueron más abundantes en Etiopía rural y urbana y en Gambia rural y urbana. Y el grupo de otros, que se conformaba por otras once familias de bacterias fue más abundante en Gambia rural que en los demás grupos (Lackey et al., 2019).

En cuanto al análisis de género, los más abundante fueron *Streptococcus*, y medianamente abundante los *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Dyella*, y *Bacillus*. Los grupos de Perú y España fueron muy parecidos y los grupos de Ghana y Etiopía rural formaron grupos individuales fuera de la media general con su propia combinación de bacterias (Lackey et al., 2019). Debemos tener en cuenta que, aunque podemos ver un efecto geográfico hay que considerar que el proceso de toma de muestra no fue estandarizado, ni la edad de los lactantes, ni tampoco era igual la edad de las madres, etc.

1.1.4.3 Correlación de la microbiota de la leche y la microbiota que se establece en los intestinos de los bebés.

La lactancia materna promueve el establecimiento de una microbiota que puede proteger frente a enfermedades atópicas, disminuir los problemas de diarreas, mejorar la salud de los niños prematuros, también se ha relacionado con el apropiado funcionamiento intestinal y con la protección frente a graves enfermedades intestinales, los componentes de la leche materna en general ayudan al ensamblaje de la microbiota intestinal del bebé (Rodríguez et al., 2020; Chen et al., 2020; Gregory et al., 2016).

En el estudio de Lackey et al. (2019) se correlacionó la microbiota de la leche materna con las heces fecales con un $R=0,663$, $P<0,0001$. Se consiguieron correlaciones positivas entre la cantidad de *Psychrobacter* y *Achromobacter* en la

leche, con los *Leuconostoc* en las heces fecales, y se relacionó la cantidad de lactobacilos en leche y heces.

En el caso de bebés prematuros la composición de sus heces era principalmente (99%) de firmicutes y proteobacterias, con muy pocos bacteroides que suelen encontrarse en cantidades importantes en los bebés de término (Chen et al., 2020). En el caso de los nacidos a término la alimentación con leche materna les da una mayor biodiversidad inicial, que va aumentando gradualmente en comparación con los bebés alimentados con leche de fórmula. Los niños alimentados con fórmula tenían grupos de bacterias más relacionados con su madurez de nacimiento, y si las tomas se suplementaban con leche humana pasteurizada se podía mejorar la biodiversidad de la microbiota intestinal (Gregory et al., 2016). De manera general los estudios recomiendan desde un punto de vista microbiológico la importancia de la alimentación con leche materna (Biagi et al., 2018).

1.1.4.4 Importancia de la microbiota de la leche en bebés prematuros.

La propia leche materna representa una fuente óptima para la nutrición infantil prematura, ya que promueve las defensas inmunes y la función gastrointestinal, protege contra la enterocolitis necrotizante, mejora el resultado clínico a largo plazo y favorece la constitución de la microbiota intestinal. Los bebés prematuros al nacer generalmente no reciben la leche materna directamente del seno, porque la succión activa y la coordinación entre la succión, la deglución y la respiración no se desarrollan hasta las 32–34 semanas de gestación, pero la lactancia materna real es posible a medida que crecen.

Si lo comparamos con la microbiota intestinal de los recién nacidos, la microbiota intestinal de los prematuros cuenta con diez veces menos especies bacterianas, siendo significativa la reducción de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Streptococcus* y detectándose un aumento de anaerobios facultativos, todo esto

puede influir en la maduración del sistema inmunitario de los recién nacidos. Se han descrito por varios autores hasta 6 especies bacterianas (*Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*) que pueden llegar a ser abundantes en la microbiota intestinal de los prematuros.

La comunidad microbiana que coloniza el cuerpo neonatal en los primeros meses ha sido reconocida como uno de los principales contribuyentes al estado de salud infantil a corto y largo plazo (Milani et al., 2017), y por lo tanto está incluida entre los principales participantes en los Orígenes del Desarrollo de Salud y Enfermedades (DOHaD) (Stiemsma y Michels, 2018). La hipótesis del DOHaD propone que las exposiciones ambientales durante los períodos críticos de tiempo en los primeros años de vida pueden afectar a la salud y a las enfermedades posteriores al alterar la programación fetal e infantil (Waterland y Michels, 2007). Específicamente, se ha demostrado que las alteraciones tempranas de la vida en la progresión de los acontecimientos que llevan a la obtención de un microbioma intestinal saludable pueden predisponer a varias enfermedades no transmisibles en la infancia, como la enterocolitis necrótica, asma, enfermedades atópicas, obesidad y trastornos del neurodesarrollo (Stiemsma y Michels, 2018).

El establecimiento de la comunidad microbiana intestinal infantil es un tema de gran interés para las comunidades científicas y clínicas. Se ha estudiado a fondo el impacto de muchas covariables en la composición y el establecimiento del microbioma infantil, señalando que la edad gestacional, el modo del parto y el tipo de nutrición (leche propia de la madre, leche de donante o fórmula) podrían ser de las variables con mayor impacto (Gregory et al., 2016; Chu et al., 2017; Cong et al., 2017; Grier et al., 2017; Hill et al., 2017; Timmerman et al., 2017; Wampach et al., 2017; Dahl et al., 2018). Entre estos factores, se cree que la comunidad bacteriana de la leche materna es un actor relevante (Pannaraj et al., 2017). Los orígenes de la microbiota de la leche humana todavía se debaten, con hipótesis que tienen en cuenta una vía entero-mamaria teórica de translocación junto con

una transferencia bacteriana bidireccional entre la piel de la mama y la boca del bebé durante el amamantado (Ramsay et al., 2004; Fernández et al., 2013; Jeurink et al., 2013; Biagi et al., 2017). En esta perspectiva, parece que la lactancia materna real, con la unión del bebé al pecho de la madre, podría contribuir activamente al establecimiento del microbioma intestinal infantil, que posiblemente implique contaminación bacteriana de la piel materna y la areola, así como de la boca del bebé (Pannaraj et al., 2017). Más recientemente, se han proporcionado pruebas que demuestran la importancia del entorno social y físico que rodean a la madre y el bebe (por ejemplo, cuántas personas cuidan al bebé y con qué frecuencia) para determinar la composición de la microbiota láctea (Meehan et al., 2018). En conjunto, estos hallazgos sugieren la existencia de una interconexión compleja, y todavía parcialmente inexplorada, entre microbiomas maternos, infantiles y ambientales en el establecimiento de microbiomas infantiles.

1.2 BACTERIOCINAS

En los últimos años, los consumidores son cada vez más conscientes del riesgo que supone el uso de conservantes químicos en los alimentos para la salud humana. Por el contrario, la creciente demanda de prolongar la vida útil de los productos lácteos y prevenir su deterioro dan lugar a la búsqueda de nuevos conservantes y nuevos métodos de conservación. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos, que pueden considerarse seguros, ya que se degradan fácilmente por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal de los mamíferos. Además, la mayoría de los productores de bacteriocina pertenecen a las bacterias del ácido láctico (BAL), un grupo de bacterias que se encuentran de forma natural en los alimentos y que se han usado de forma segura a lo largo de la historia en la industria láctea. Dado que no plantean problemas para la salud, las bacteriocinas, purificadas o excretadas por cepas productoras de bacteriocina, son una gran alternativa al uso de conservantes químicos en productos lácteos.

Aunque ya se han descrito varios microorganismos productores de bacteriocinas, las producidas por las bacterias del ácido láctico (BAL) son de gran interés dentro de la industria láctea (Egan et al., 2016). Las BAL se han utilizado durante mucho tiempo en una variedad de alimentos fermentados con fines como la conversión de la lactosa en ácido láctico, así como la producción de moléculas antimicrobianas adicionales como otros ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, péptidos antifúngicos y bacteriocinas (Egan et al., 2016).

Las bacteriocinas se definen generalmente como péptidos o proteínas ribosomales sintetizadas por bacterias, que inhiben o matan otros microorganismos relacionados o no relacionados (Leroy y De Vuyst, 2004; Cotter et al., 2005). Pueden ser de espectro reducido, inhibiendo a bacterias taxonómicamente cercanas, o de amplio espectro, inhibiendo a una amplia variedad de bacterias (Cotter et al., 2005; Mills et al., 2011).

Durante los últimos años, ha aumentado el interés por las bacteriocinas por su uso como conservantes alimentarios seguros, ya que son fáciles de digerir en el tracto gastrointestinal humano (Mills et al., 2011). El uso de bacteriocinas como conservantes alimentarios naturales satisface las demandas de los consumidores de obtener alimentos seguros y de alta calidad minimizando el uso de conservantes químicos. Se pueden utilizar: como cultivos iniciadores o como aditivos en los alimentos (Cleveland et al., 2001). Sin embargo, por otro lado la aplicación de bacteriocinas como aditivos alimentarios puede venir limitada por diversas razones, como la eficacia en la eliminación de algunos patógenos o su alto precio (Chen y Hoover, 2003).

1.2.1 Clasificación de las bacteriocinas

Durante los últimos años, se han propuesto varias clasificaciones para las bacteriocinas teniendo todas ellas en cuenta la primera clasificación propuesta por Klaenhammer (1993). Recientemente, con el fin de clasificar las nuevas

bacteriocinas, Alvarez-Sieiro et al., en 2016, propusieron un esquema de clasificación mixto basado en el mecanismo de biosíntesis y la actividad biológica propuesta por otros autores (Arnison et al., 2013). Diferenciaron tres clases principales: Clase I – pequeños péptidos modificados; Clase II – bacteriocinas no modificadas; y Clase III – péptidos más grandes (>10 kDa y termolábiles), siendo cada clase subdividida a su vez en subclases.

1.2.2 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas poseen diferentes mecanismos de acción y en general se pueden dividir en aquellas que tienen un efecto bactericida, con o sin lisis celular, o las bacteriostáticas, que inhiben el crecimiento celular (da Silva Sabo et al., 2014). La mayoría de las bacteriocinas producidas a partir de las BAL., en particular las que inhiben las bacterias Gram-positivas, ejercen su efecto antibacteriano apuntando a mecanismos asociados a la envoltura celular (Cotter et al., 2013). Ciertos antibióticos y algunas bacteriocinas de clase II se dirigen al Lípido II, un intermediario en la maquinaria de biosíntesis del peptidoglicano dentro de la envoltura celular bacteriana y, de esta manera, inhiben la síntesis del peptidoglicano (Breukink y de Kruijff, 2006).

Otras bacteriocinas se acoplan al lípido II para facilitar la formación de poros, lo que modifica la permeabilidad del potencial de membrana del citoplasma y, en última instancia, producen la muerte celular (Machaidze y Seelig, 2003; Cotter et al., 2005). Algunas bacteriocinas dañan o matan las células diana al unirse al sistema fosfotransferasa (Man-PTS) con la posterior formación de poros en la membrana celular (Cotter et al., 2013). Otras bacteriocinas pueden matar sus células diana mediante la inhibición de la expresión génica (Parks et al., 2007; Vincent y Morero, 2009) y de la producción de proteínas (Metlitskaya et al., 2006).

Son péptidos antimicrobianos heterogéneos que tienen diferentes mecanismos de acción y espectro de actividad (Stoyanova et al., 2012). Aunque pueden ser extraídas de múltiples bacterias Gram positivas o negativas,

frecuentemente son obtenidas de bacterias ácido lácticas, ya que resultan fácil de obtener y tienen un importante uso comercial, como bacterias iniciadoras de quesos, yogur, etc., por su amplio espectro de inhibición (Nes et al., 2007).

Según Cotter et al. (2005) las bacteriocinas son excretadas extracelularmente y tienen funciones bactericidas o bacteriostáticas frente a bacterias alterantes o patógenas. Entre sus características destacan ser estables a pH bajos y a altas temperaturas y por lo general son producidas durante la fase logarítmica del crecimiento microbiano (Chen y Hoover, 2003). Esta propiedad hace posible su uso comercial ya que resisten a los tratamientos térmicos de los alimentos y a las matrices ácidas, en la mayoría de los alimentos. Pero, aunque pueden sobrevivir a los ácidos estomacales, al ser de origen proteico, son desnaturalizadas por las proteasas del tracto gastrointestinal (Therdatha et al., 2016).

De cara a su potencial uso, las bacteriocinas deben de cumplir ciertas características tales como: ser activas a bajas concentraciones, que afecten tanto a bacterias Gram positivas patógenas y alterantes como a Gram negativas, no deben alterarse por tratamientos térmicos (Wu et al., 2004), y deben ser bacterias no relacionadas con riesgo para la salud y ser aceptadas para su uso en alimentos (Gautam y Sharma, 2009).

1.2.3 Aplicación de las bacteriocinas de BAL en productos lácteos

Como se ha indicado anteriormente, aunque existen varios microorganismos productores de bacteriocinas, las producidas por las BAL son de particular interés para la industria láctea (Egan et al., 2016). Las bacterias lácticas se han utilizado durante mucho tiempo en las fermentaciones lácticas, por la conversión de la lactosa en ácido láctico, así como por la producción de moléculas antimicrobianas como pueden ser ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, péptidos antifúngicos, y bacteriocinas (Egan et al., 2016). Como resultado de su extenso uso en productos fermentados tradicionales, son consideradas como

seguras (GRAS) por la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también otorgó el estatus de Presunción de Seguridad Calificada (QPS) a la mayoría de los géneros de las BAL, como son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y algunos estreptococos (EFSA, 2007). Sin embargo, las especies del género *Enterococcus* y algunos *Streptococcus* son patógenas, por lo tanto, no tienen el estado GRAS y no fueron propuestos para el estatus QPS (EFSA, 2007).

Las bacteriocinas producidas por las BAL son casi todas activas a una amplia gama de valores de pH, resistentes a altas temperaturas y activas frente a una serie de bacterias alterantes y patógenos alimentarios (Ahmad et al., 2017). Además, son sensibles a las proteasas digestivas como la tripsina y la quimotripsina, y por lo tanto no afectan a la microbiota intestinal (Egan et al., 2016). Se han utilizado en la bioconservación de diferentes alimentos, ya sea solas o con otros métodos de conservación, conocido como tecnología de barreras (De Vuyst y Leroy, 2007; Pérez et al., 2014). Existen muchos estudios que avalan la aplicación de las bacteriocinas o cepas productoras de bacteriocinas en alimentos, como carne, productos lácteos, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas o verduras fermentadas (O'Sullivan et al., 2003; Ramu et al., 2015). Aunque hasta la fecha, sólo la nisina (Nisaplin, Danisco) y la pediocina PA1 (MicrogardTm, ALTA 2431, Quest) se han comercializado como conservantes o como aditivos alimentarios (Simha et al., 2012). Pero existen otras bacteriocinas que ofrecen perspectivas prometedoras para ser utilizadas como bioconservantes, como por ejemplo la enterocina AS-48 (Sánchez-Hidalgo et al., 2011) o la lacticina 3147 (Suda et al., 2012).

El cribado de las bacteriocinas que se utilizan en los alimentos requiere el cumplimiento de algunos criterios importantes. Las cepas productoras deben ser de grado alimentario (GRAS o QPS), presentar un amplio espectro de inhibición, mostrar una alta actividad específica, no tener riesgos asociados para la salud, presentar efectos beneficiosos (por ejemplo, mejorar la seguridad, la calidad y el

sabor de los alimentos), mostrar la estabilidad al calor y el pH, y la solubilidad y estabilidad óptimas para un alimento en particular (Cotter et al., 2005; Leroy y De Vuyst, 2010). Varios autores han descrito que la inactivación de varios patógenos transmitidos por los alimentos por las bacteriocinas puede diferir en gran medida dependiendo de la matriz alimentaria en la que se utilicen (Muñoz et al., 2007). Por lo tanto, la eficacia de diferentes bacteriocinas frente a patógenos transmitidos por los alimentos debe probarse en todos los sistemas alimentarios.

Las aplicaciones recientes de las bacteriocinas en los alimentos lácteos para controlar los patógenos transmitidos por estos, van desde la inoculación de los alimentos con cepas de BAL que producen bacteriocinas hasta la adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas directamente a los alimentos. La aplicación de cepas BAL productoras de bacteriocina como cultivos iniciadores antibacterianos y cultivos protectores puede conferir una ventaja sobre el uso de bacteriocinas semipurificadas/purificadas. En la mayoría de los casos, las bacteriocinas se absorben en las matrices de los alimentos y se degradan fácilmente, lo que resulta una pérdida de actividad antibacteriana. Por lo tanto, un método alternativo es la incorporación de bacteriocinas en películas o recubrimientos de envases alimentarios, que mejoren su actividad y estabilidad en los sistemas alimentarios complejos (Salgado et al., 2015). Muchos investigadores han descrito la posibilidad de utilizar las bacteriocinas como películas inmovilizadas en los envases con antimicrobianos para así poder controlar las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, como puede ser *Listeria monocytogenes* (Sánchez-González et al., 2013; Iburguren et al., 2015; Narsaiah et al., 2015). Dentro de los alimentos fermentados, la contaminación por *L. monocytogenes* es una preocupación importante. Varios de los brotes de listeriosis se han relacionado con el consumo de productos lácteos, en particular quesos blandos, causando esto un problema a la industria láctea y a las autoridades de salud pública (Melo et al., 2015). A pesar de que la mayoría de los productos lácteos, en particular los quesos, se elaboran a partir de leche pasteurizada, todavía se produce contaminación con *Listeria*. Los quesos son productos listos

para el consumo y generalmente se conservan a temperaturas de refrigeración que permiten la supervivencia y el crecimiento de bacterias como *L. monocytogenes*, por lo que la contaminación puede ocurrir en etapas posteriores al procesado del producto (Carpentier y Cerf, 2011; Melo et al., 2015). Teniendo esto en cuenta, las bacteriocinas activas frente a *Listeria* son una solución ideal para prevenir el crecimiento de este patógeno después de cocinar o envasar el producto (Cotter et al., 2005). También se pueden utilizar para controlar la microbiota en productos como el queso o el vino, y de esta manera, contribuir a la calidad del producto final (Oumer et al., 2001; O'Sullivan et al., 2003), ya que pueden mejorar la fermentación de los alimentos, acelerar la maduración del queso, e incluso mejorar su sabor (Oumer et al., 2001).

Se han descrito más de 230 bacteriocinas producidas por BAL, pero sólo la mitad de ellas se han identificado a nivel de proteína o ADN (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Además, se han probado un número limitado de bacteriocinas purificadas o semipurificadas en sistemas alimentarios, especialmente en productos lácteos (Tabla 1).

Tabla 1. Bacteriocinas estudiadas en los últimos años

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	REFERENCIA
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> W8	Mitra et al., 2011
Nisin Z y A	<i>Lactococcus lactis</i>	DalBello et al., 2012
Nisaplin	<i>Lactococcus lactis</i>	Kykkidou et al., 2007
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i>	Oshima et al., 2014
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> N5764	Alves et al., 2016
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC3147	Morgan et al., 2001
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> L3A21M1	Ribeiro et al., 2016
Lactococcin BZ	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> BZ	Yildirim et al., 2016
Leucocin K7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> K7	Shi et al., 2016
Reuterin	<i>Lactobacillus reuteri</i> INIA PRO 137	Arqués et al., 2011
Variacin	<i>Kocuria varians</i> NCC 1482	O'Mahony et al., 2001

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	REFERENCIA
Bovicin HC5	<i>Streptococcus bovis</i> HC5	Pimentel-Filho et al., 2014
Gassericens A y T	<i>Lactobacillus gasserii</i> LA39 y LA158	Arakawa et al., 2009
Aureocin A70	<i>Staphylococcus aureus</i> A70	Fagundes et al., 2016
Enterocin CCM 4231	<i>Enterococcus faecium</i> CCM 4231	Lauková et al., 2001
Enterocin AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> A-48-32	Muñoz et al., 2007
Ent35-MccV	<i>Escherichia coli</i> BL21	Acuña et al., 2015
Enterocins	<i>Enterococcus faecalis</i> L3B1K3	Ribeiro et al., 2017
Enterocin KP	<i>Enterococcus faecalis</i> KP	Yildirim et al., 2016

a) Nisina

La nisina es una bacteriocina agrupada en la clase Ia y es actualmente la bacteriocina mejor caracterizada y de importancia comercial (Ross et al., 2002). Tiene licencia como conservante alimentario (E234) y es reconocida como segura por el Comité de Expertos de Aditivos Alimentarios de la Organización Conjunta de la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) (FAO y OMS, 2006; Favaro et al., 2015). Hasta la fecha, se han descubierto y caracterizado ocho tipos de variantes de la nisina: nisinas A, Z, F y Q producidas por *Lactococcus lactis* y nisinas U, U2, P y H producidas por algunas cepas de *Streptococcus* (O'Connor et al., 2015). La forma comercial disponible de nisina para su uso como conservante alimentario es la Nisaplina™, con el ingrediente activo nisina A (2,5%) y otros ingredientes como NaCl y leche seca sin grasa (Chen y Hoover, 2003).

La nisina tiene actividad antimicrobiana frente a numerosas bacterias Gram-positivas, incluyendo BAL, patógenos como *Listeria* y *Staphylococcus*, y las bacterias que forman esporas, *Bacillus* y *Clostridium* (Chen y Hoover, 2003). Una de las primeras aplicaciones de la nisina fue prevenir los efectos en el queso causados por *Clostridium* spp. como productor de gas (Gálvez et al., 2008). También se ha demostrado que es eficaz en el control de diferentes patógenos

como *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en productos lácteos (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008). En un estudio de Arqués et al. (2011), se demostró que la nisina reduce la concentración de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en la leche almacenada a temperaturas de refrigeración. Varios estudios también probaron que la adición de nisina a diversos tipos de queso provocaba una reducción del crecimiento de *L. monocytogenes*, aunque limitado a 1-3 Log (Chen y Hoover, 2003). Varios informes indican que la nisina A no es muy activa frente a *L. monocytogenes* en sí, pero su efecto anti-listerial se ve reforzado por la reducción del pH y la adición de NaCl (Chen y Hoover, 2003; Khan y Oh, 2016).

También está comprobada su actividad en otros productos lácteos pasteurizados, como postres refrigerados, dulces de leche, nata y leche en polvo enlatada, en estos productos la presencia de *L. monocytogenes* disminuía en las muestras previamente inoculadas con esta bacteria (Gálvez et al., 2008). En otros estudios demostraron la eficacia de la combinación de nisina y bovicina HC5 frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso fresco (Pimentel-Filho et al., 2014), se observó una reducción de *L. monocytogenes* a niveles no detectados después de 9 días de almacenamiento a 4 °C, aunque la combinación de bacteriocinas no impidió el crecimiento de *S. aureus*.

Varios estudios demuestran que la actividad antimicrobiana de la nisina se ve afectada por varios factores, como el pH, la temperatura, la composición, la estructura y la microbiota natural de los alimentos (Zhou et al., 2014). La aplicación de nisina en productos lácteos también se limita a valores de pH inferiores a 7, ya que la nisina pierde en gran medida su actividad a un pH mayor (de Arauz et al., 2009). Otros estudios también mencionan varias limitaciones en el uso de nisina en productos lácteos, debido a su interacción con la grasa y otros componentes en la matriz alimentaria (Favaro et al., 2015). Por otro lado el amplio espectro de inhibición asociado con la nisina incluye a las BAL entre ellos mismos (Abee et al., 1995), por lo tanto, en los alimentos lácteos que requieren de las BAL para los procesos de fermentación, la aplicación de la nisina presenta una gran

limitación. Una alternativa consiste en emplear otras bacteriocinas con un rango de actividad muy específico (Abee et al., 1995). Por todo esto, ha habido un gran interés en la búsqueda de nuevas bacteriocinas con una amplia gama de actividad antibacteriana, estabilidad en diferentes ambientes alimentarios, tolerancia al calor y resistencia a las enzimas proteolíticas.

b) Pediocinas

Las pediocinas son bacteriocinas incluidas en la clase IIa producidas por *Pediococcus* spp. y están disponibles comercialmente bajo el nombre ALTA 2341TM (Garsa et al., 2014). Esta bacteriocina ha demostrado ser más eficaz que la nisina frente a algunos patógenos transmitidos por los alimentos como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Cintas et al., 1998; Eijsink et al., 1998). Por otra parte, los extractos parcialmente purificados de cepas de *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. cerevisiae* mostraron actividad frente a organismos Gram-negativos como *Pseudomonas* y *E. coli* (Jamuna y Jeevaratnam, 2004). La aplicación de pediocinas a los productos lácteos se ve reforzada por su estabilidad en soluciones acuosas, su amplia gama de pH y su alta resistencia al calor o la congelación (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008). A pesar de este alto potencial, se ha investigado poco la adición de pediocinas a la leche o alimentos lácteos. Se sabe que la pediocina PA-1 reduce el recuento de *L. monocytogenes* en queso cottage, en crema y salsa de queso (Pucci et al., 1988). El efecto frente a *Listeria* fue notable a una amplia gama de temperatura y rangos de pH y fue particularmente eficaz con una baja contaminación inicial de *L. monocytogenes* (10^2 UFC/mL). Recientemente Verma et al. (2017) describieron la producción de la pediocina de grado alimentario en un medio de suero de leche de queso. Esta pediocina semipurificada demostró ser eficaz para reducir el recuento de *S. aureus* y mejorar la vida útil de la leche de búfala cruda (Verma et al., 2017).

c) Lactinas

Las lactinas son producidas por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* e incluyen las lactinas 3147 y 481 entre otras (Piard et al., 1992; McAuliffe et al., 1998).

La cepa productora de lacticina 3147 fue aislada de un grano de kéfir irlandés utilizado para la fabricación de suero de leche. Esta lacticina es un lantibiótico de dos componentes, que requiere ambas proteínas estructurales para su actividad biológica (McAuliffe et al., 1998). Esta bacteriocina es activa frente a una amplia gama de bacterias alterantes y patógenas de los alimentos (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008; Martínez-Cuesta et al., 2010). Se demostró que una preparación en polvo de lacticina 3147 era eficaz para el control de *Listeria* y *Bacillus* en muestras de leche infantil, yogur natural y queso cottage (Morgan et al., 2001). Sin embargo, debido a las altas concentraciones necesarias de lacticina, que representaban el 10% del peso del producto, los autores la consideraron como no rentable (Morgan et al., 2001).

La lacticina 481 es un lantibiótico monopéptido que exhibe un espectro medio de inhibición, principalmente activo frente a otras BAL, *Clostridium tyrobutyricum* (O'Sullivan et al., 2003) y *L. monocytogenes* (Ribeiro et al., 2016). El uso de lacticina 481 no purificada en la leche almacenada a temperaturas de refrigeración, demostró tener una actividad bacteriostática leve (Arqués et al., 2011). Sin embargo, la aplicación de lacticina 481 semipurificada en quesos frescos almacenados a temperaturas de refrigeración, redujo *L. monocytogenes* en 3 ciclos al cabo de 3-7 días (Ribeiro et al., 2016). Sin embargo, no es probable que la aplicación de lactinas en los sistemas alimentarios garantice la total eliminación de patógenos como *L. monocytogenes*.

d) Enterocinas

Las enterocinas son producidas por diferentes especies enterococos y comprenden un diverso grupo de bacteriocinas, tanto en términos de clasificación como de espectro de inhibición (Egan et al., 2016).

Aunque la mayoría de las BAL tienen el estado GRAS y se pueden utilizar de forma segura en aplicaciones alimentarias, los enterococos bacteriocinogénicos plantean algunos problemas de seguridad (EFSA, 2007). Los enterococos se encuentran entre los patógenos que se han asociado con un determinado número de infecciones en humanos (Moreno et al., 2006). Además, algunos pueden albergar determinantes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos (EFSA, 2007). Aunque los enterococos aislados de alimentos tienen menos determinantes de virulencia que las cepas clínicas, son conocidos por su capacidad para intercambiar información genética (Eaton y Gasson, 2001). Teniendo en cuenta las preocupaciones de seguridad en el uso de enterococos bacteriogénicos, puede considerarse más adecuado el uso de enterocinas purificadas para el consumo de alimentos

La enterocina AS-48 es producida por *E. faecalis* y es una bacteriocina cíclica de clase IIc que es activa contra un número de *Bacillus* y *Clostridium* sp. (Lucas et al., 2006; Burgos et al., 2014). Esta es una de las bacteriocinas más estudiadas, mostrando una alta estabilidad al pH y al calor, lo que la hace una gran candidata para su aplicación en los alimentos. Muñoz et al. (2007) estudiaron la eficacia de la enterocina AS-48 frente a los estafilococos en la leche desnatada. Observaron un efecto bactericida proporcional a la concentración de bacteriocina (10-50 µg/mL), pero no se logró la eliminación completa de los estafilococos para ninguna de las concentraciones ensayadas. Esta eficacia aparentemente menor de AS-48 en la leche en comparación con el medio de cultivo podría atribuirse a una mayor retención de las moléculas de bacteriocina por componentes lácteos y a una difusión más lenta (Muñoz et al., 2007).

Yildirim et al. (2016) investigaron los efectos antimicrobianos de la enterocina KP frente a *L. monocytogenes* en leche descremada, semidesnatada y leche entera. La Enterocina KP tuvo un alto efecto antilisteria, pero este efecto bactericida disminuyó a medida que aumentaba tanto el contenido de grasa de la leche como la cantidad de inóculo de *L. monocytogenes*. Anteriormente, Lauková y Czikková (1999) habían descrito un efecto inhibitorio de la enterocina purificada CCM 4231 (3200 AU/mL) sobre el crecimiento de *S. aureus* y *L. monocytogenes* en leche desnatada y yogur. Aunque, el efecto antagónico de la enterocina en *S. aureus* en el yogur fue menor después de 24 h.

Por lo general, las enterocinas son activas frente a patógenos transmitidos por los alimentos, como *Listeria* spp. y *Clostridium* spp., pero su aplicación en los sistemas alimentarios no impide el crecimiento de patógenos durante todo el tiempo de almacenamiento (Zacharof y Lovitt, 2012; de Souza Barbosa et al., 2015). Sin embargo, Arqués et al. (2011) observaron la reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* en la leche por debajo de los límites de detección después de 24 h cuando se combinaban de dos bacteriocinas, reuterina y enterocina AS-48.

A pesar de los recientes avances en la investigación de las bacteriocinas en aplicaciones alimentarias, el uso de bacteriocinas purificadas en la industria láctea sigue siendo limitado. Con frecuencia, la aplicación de una bacteriocina por sí sola no proporciona la suficiente protección frente a la contaminación microbiana de los productos lácteos. El alto coste de la obtención y la purificación de las bacteriocinas también limita la exploración comercial de nuevas bacteriocinas. Además, la legislación alimentaria regulada por las autoridades sanitarias (FDA y EFSA) limita la aprobación de nuevas bacteriocinas como conservantes alimentarios y, como consecuencia, sólo dos bacteriocinas (nisina y pediocina) se encuentran actualmente en el mercado.

1.3 PROBIÓTICOS

Fue a principios del siglo XX cuando se empezó a relacionar el efecto beneficioso de las bacterias de los alimentos fermentados como la leche, frente a enfermedades infecciosas intestinales (Moro, 1900; Beijerinck, 1901; Cahn, 1901; Tissier, 1906). A partir de 1919 se empezaron a fabricar productos lácteos de venta en farmacias y con receta médica aconsejados para prevenir enfermedades como diarrea, estreñimiento, colitis ulcerosa, disbiosis, cistitis o dermatitis. A partir de entonces se han ido desarrollando numerosos productos cuyo componente principal son bacterias probióticas.

El término probiótico se deriva de la preposición latina "pro," que significa "para" y la palabra griega "biótico" que significa "vida". El principio probiótico se remonta a más de 100 años atrás. En 1908, Elie Metchnikoff sugirió que sería posible modificar la microbiota de nuestros cuerpos y reemplazar microbios dañinos por microbios útiles. Los beneficios que aportan para la salud los probióticos incluyen la modulación de la respuesta inmune, el mantenimiento de la barrera intestinal, el antagonismo de la adhesión de patógenos al tejido huésped, y la producción de diferentes metabolitos como vitaminas, ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), y moléculas que actúan como neurotransmisores implicados en la comunicación intestino-cerebro (Duranti et al., 2017). En 2002 un comité científico de la FAO y la OMS definió a los probióticos como "organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud". Esta definición ha seguido evolucionando conforme ha ido avanzando la investigación determinando las características necesarias de un probiótico así como el efecto beneficioso en numerosos trastornos, no sólo intestinales. En las últimas décadas, la investigación en el área de los probióticos ha progresado considerablemente y se han hecho avances significativos en la selección y caracterización de cultivos probióticos específicos.

Varias bacterias del grupo de las bifidobacterias y de los estreptococos se consideraron inicialmente como bacterias probióticas, destacan las bacterias lácticas y las bifidobacterias, pero también bacterias que pertenecen a otros géneros, como *E. coli* y *Bacillus cereus*, o levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Shortt, 1999; Vaughan et al., 2002) (Tabla 2). Las bacterias probióticas son suplementos alimentarios que consisten en un microorganismo vivo que coloniza los intestinos y puede beneficiar de forma positiva al huésped (Viswanathan et al., 2016; Vaibhav et al., 2012).

Tabla 2. Especies bacterianas más utilizadas como probióticos.

Lactobacillus	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. casei</i> , <i>freundereichi</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbruecki</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jonhsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L rhamnosus</i> .
Bifidobacterium	<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentes</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> .
Otras bacterias lácticas	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .
Otros microorganismos	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Streptococcus termophilus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> .

Todos los años el Comité Científico de la EFSA actualiza la lista de microorganismos considerados seguros basados en su historial de uso en alimentación a los que se les ha concedido la condición de QPS (Qualified Presumption of Safety) (EFSA, 2019). Esta lista, incluye bacterias Gram-positivas, bacterias Gram negativas, y levaduras (Tabla 3). Todas estas especies a las que se le ha atribuido la condición de QPS no necesitan la realización de ensayos de seguridad que avalen su uso seguro.

Tabla 3. Lista de 2016 de los agentes biológicos recomendados por el estado como QPS para las evaluaciones de riesgos de seguridad, actualizada por los paneles y unidades científicas de la EFSA en 2019.

Bacteria			
Gram-positive non-spore forming bacteria			
Species			Qualifications^(a)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>		
<i>Carnobacterium divergens^(f)</i>			
<i>Corynebacterium ammoniagenes^(g)</i>	<i>Corynebacterium glutamicum^(b)</i>		QPS applies for production purposes only. ^{(n),(o)}
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	
<i>Lactobacillus amyolyticus</i>	<i>Lactobacillus dextrinicus^(a)</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus diolivorans⁽ⁱ⁾</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Lactobacillus animalis^(k)</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus gasserii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus casei^(c)</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus kefiranoformis</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>		
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>		
<i>Lactobacillus curvatus</i>			
<i>Lactococcus lactis</i>			
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	
<i>Leuconostoc lactis</i>			
<i>Microbacterium imperiale^(f)</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Oenococcus oeni</i>			
<i>Pasteuria nishizawae^(h)</i>			
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus parvulus⁽ⁱ⁾</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>			

Gram-positive spore-forming bacteria			
Bacillus			
Species			Qualifications^(a)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	Absence of toxigenic activity.
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus smithii^(j)</i>	
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus flexus⁽ⁱ⁾</i>		<i>Bacillus vallismortis</i>	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>			Absence of toxigenic activity.

Gram-negative bacteria			
Species		Qualifications^(a)	
<i>Gluconobacter oxydans</i>			QPS only applies when the species is used for vitamin production.
<i>Komagataeibacter sucrofermentans^{(p),(a)}</i>			QPS applies for production purposes only. ⁽ⁿ⁾
<i>Xanthomonas campestris^(a)</i>			QPS only applies when the species is used for the production of xanthan gum.
Yeasts^(e)			
Species		Qualifications	
<i>Candida cylindracea^(f)</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Debaryomyces hansenii</i>			
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
<i>Komagataella pastoris</i>	<i>Komagataella phaffi^(l)</i>		QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Lindnera jadinii</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Ogataea angusta</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production.
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae^(d)</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain. In the case of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> this qualification applies for yeast strains able to grow above 37°C.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			QPS only applies when the species is used for enzyme production. Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.

Aunque según estudios de Johansson et al. (1993) y Rinkinen et al. (2003) la capacidad de adherirse de las cepas probióticas al epitelio intestinal es independiente de su origen, otros estudios (Holzapfel et al., 1998) recomiendan que las cepas utilizadas como probióticos sean aisladas de la misma especie donde se pretenden aplicar. Una vez estudiada y caracterizada la cepa debe ser identificada y clasificada según la FAO y OMS mediante la secuenciación total del

genoma bacteriano permitiendo estudiar la existencia de genes que puedan derivar en un carácter patógeno de la cepa en cuestión.

Dentro de los estudios a realizar está la posible transferencia de factores de resistencia a antibióticos de cepas probióticas a cepas potencialmente patógenas, este hecho podría acarrear un problema de salud grave al conceder a estas bacterias patógenas una serie de herramientas para poder defenderse frente a los tratamientos con antibióticos, pudiendo por otro lado dificultar el tratamiento de infecciones de difícil resolución con bacterias implicadas como *L. monocytogenes* o *S. aureus* (Leclercq et al., 1989; Noble et al., 1992). Se recomienda en general por los expertos que las bacterias probióticas no posean resistencia frente a antibióticos u otras drogas y se plantea el requisito de que ningún probiótico posea la capacidad de albergar en su genoma genes relacionados con la resistencia a antibióticos, que puedan ser transferidos (Bhardwaj et al., 2010).

Por otro lado algunas cepas probióticas son capaces de producir aminas biógenas, compuestos orgánicos alcalinos que se producen debido a la actividad amino-descarboxilasa de algunos microorganismos. Aunque estas aminas biógenas pueden ser necesarias para algunas de las funciones fisiológicas, una alta concentración de estos compuestos pueden producir graves problemas toxicológicos. La histamina y la tiramina tienen propiedades vasoactivas y psicoactivas, mientras que la cadaverina y la putrescina potencian los efectos de las anteriores además de ser precursores de nitrosaminas carcinogénicas en alimentos (Bover-Cid et al., 1999). Dado que algunos lactobacilos tienen la capacidad de producir estas sustancias (Coton et al., 1998; de las Rivas et al., 2005) habría que evaluar esta propiedad en cualquier cepa que se pretenda utilizar como probiótico.

Otra de las características que se deben estudiar en los probióticos es su capacidad de resistir al proceso de digestión, así como su capacidad de adherirse al epitelio intestinal (He et al., 2002; 2005). Hay que estudiar su resistencia a la

acidez gástrica y a las sales biliares, por ejemplo, se conoce que determinadas especies de lactobacilos y bifidobacterias pueden resistir a las condiciones del proceso de digestión, apareciendo vivas en las muestras de heces (Jiménez et al., 2008; Olivares et al., 2007).

Se han estudiado los efectos terapéuticos de los probióticos en una gran gama de enfermedades como son: infecciones o enfermedades gastrointestinales, intolerancia a la lactosa, tratamiento en reacciones alérgicas, en infecciones respiratorias, así como en recién nacidos (Ford et al., 2014; Le Barz et al., 2015). En individuos enfermos se puede medir fácilmente el efecto beneficioso de los probióticos, pero es muy difícil en individuos sanos, más que nada porque no existe un consenso a nivel internacional sobre cuál debe ser la microbiota intestinal de un individuo sano (Backhed et al., 2012; McFarland, 2014).

Ya que se sabe que la leche materna es el mejor alimento para los bebés durante sus fases de rápido desarrollo, en diferentes estudios como el de Vaibhav et al., y Olivares et al., en 2012, se ha estudiado el potencial de la leche materna como fuente de bacterias probióticas. Los efectos beneficiosos potencialmente ejercidos por la leche en el lactante son la razón por lo que están siendo incluidas determinadas cepas probióticas de la leche materna en las fórmulas infantiles. Entre los efectos que se han sugerido para dichas bacterias cabe resaltar su papel antimicrobiano, antiinflamatorio y/o modulador de la respuesta inmunitaria. La existencia de bacterias en la leche materna y los efectos beneficiosos que ejercen sobre el lactante ofrecen nuevas alternativas para la inclusión de determinadas cepas probióticas en las fórmulas infantiles.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de la tesis ha sido realizar un estudio de los microorganismos presentes en la leche materna obteniendo una colección de cepas tras un programa de muestreo, para posteriormente ensayar su producción de bacteriocinas, identificarlas a nivel de especie, estudiar sus genes de resistencia, y valorar la presencia de cepas seguras. Por otro lado realizar un estudio de la microbiota de la leche y para así poder identificar cepas de bacterias que no se habían identificado mediante cultivo por los medios tradicionales.

Para ello se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Obtener una colección de cepas bacterianas procedentes de leche materna.
2. Caracterizar e identificar aquellas cepas productoras de bacteriocinas y evaluar su funcionalidad para la industria alimentaria.
3. Evaluar la resistencia de las bacterias identificadas a las condiciones del tracto digestivo.
4. Determinar la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos
5. Determinar la biodiversidad bacteriana en la leche materna durante el período de lactancia y analizar posibles cambios durante ese período.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS

Las muestras de leche materna se tomaron de una única donante, mujer, 40 años, tercer parto por cesárea, asmática, con sobrepeso, y sin ningún otro padecimiento crónico. La donante había amamantado a sus dos hijos previos hasta los 20 meses, por lo que era una buena candidata a mantener la lactancia pasado los 6 meses hasta cerca del año de vida del niño. La donante extrajo la leche de las mamas limpias, desinfectadas con alcohol al 70%, 3 veces al día (mañana, tarde y noche) una vez por semana, antes de amamantar al niño. Antes de cada extracción la donante se lavaba las manos y se colocaba guantes. La extracción se realizaba con una bomba manual (Phillips Avent SCF330/20). La muestra, de 5 a 7 mL, se colocada en un tubo falcon estéril y se mantenía en frío. Las muestras de leche se transportaron, al laboratorio donde se almacenaban a -20 °C hasta su análisis, en una nevera portátil con hielo reutilizable esterilizado. Se tomaron muestras durante 28 semanas, desde la semana 20 de lactancia hasta la 48.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Medios de Cultivo

3.2.1.1 Medios de cultivo de crecimiento

Caldo tripticaseína-soja (TSB). El caldo tripticasa-soja fue empleado para el crecimiento de las bacterias. El preparado comercial deshidratado (Scharlau) se disolvió a razón de 30 g/litro de agua destilada. En forma sólida (TSA), fue empleado cómo medio de crecimiento para el recuento de células viables.

Composición del medio TSB

Triptona.....	17g
Peptona de soja.....	3g
Cloruro sódico.....	5g

Fosfato dipotásico	2,5g
Glucosa.....	2,5g

Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Este medio se desarrolló en los años 60 y lleva el nombre de sus inventores. Se utiliza para el crecimiento de lactobacilos. El preparado comercial (Scharlau) fue reconstituido a razón de 52 g/litro de agua destilada.

Composición del medio MRS

Peptona de caseína.....	10,00g
Extracto de carne.....	8,00g
Extracto de levadura.....	4,00g
Dextrosa	20,00g
Acetato sódico.....	5,00g
Citrato triamónico	2,00g
Sulfato de magnesio	0,20g
Sulfato de manganeso.....	0,05g
Fosfato dipotásico.....	2,00g
Polisorbato 80.....	1,00g

Eosin Methylene Blue Agar (EMB). El agar eosina-azul de metileno o Agar EMB es un medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias bacilares gram -, para ser más exactos de enterobacterias. Posee un color púrpura rosado o bien, rojizo. La preparación de este medio consiste en suspender 37,5 gramos en 1000 mL de agua destilada, calentar y agitarlo hasta llevarlo a ebullición, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se vierte en placas de petri dejándolas enfriar y solidificar.

Composición del medio EMB

Peptona.....	10,00g
Lactosa.....	10,00g
Fosfato dipotásico	2,00g
Eosina amarilla.....	0,40g
Azul de metileno.....	0,065g
Agar	15,00g

pH: 6,90 ±0,2 a 25 °C

Vogel – Johnson. El medio Vogel-Johnson es el medio selectivo que se utiliza para el cultivo, aislamiento y recuento de cocos gram +, para ser más exactos estafilococos. Presenta coloración tostada o anaranjada. La preparación de este medio consiste en suspender 60 gramos en 1000 mL de agua destilada, calentarlo y agitarlo hasta llevarlo a ebullición, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Después se enfría hasta llegar a los 50 °C aproximadamente y se le añade en condiciones de asepsia 20 mL de solución de telurito potásico al 1% o bien 6 mL de solución al 3,5% de telurito potásico. No se debe calentar después de añadir el telurito potásico. La función del telurito potásico es que las colonias de estafilococos obtengan la coloración negra y así poder visualizarse mejor.

Composición del medio Vogel-Johnson

Peptona de caseína.....	10,00g
Extracto de levadura.....	5,00g
Manitol.....	10,00g
Fosfato dipotásico	5,00g
Cloruro de litio.....	5,00g

Glicina	10,00g
Rojo de fenol.....	0,025g
Agar	15,00g
pH: 7,2 ±0,2	

Caldo de ELLIKER. El caldo Elliker o caldo de lactobacilos, es utilizado para el crecimiento de lactobacilos, estreptococos y algunos lactococos de productos lácteos. Este se prepara según la formulación de Elliker, Anderson y Hannesson, con las modificaciones de Mclaughlin. El Agar láctico ó Elliker agar se utiliza para el recuento general de bacterias ácido lácticas. Se prepara diluyendo 48,5 g de polvo en 1 L de agua destilada. Se debe esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Composición del medio Elliker

Peptona de caseína.....	20.00g
Extracto de levadura.....	5.00g
Gelatina.....	2.50g
Dextrosa.....	5.00g
Lactosa	5.00g
Sacarosa.....	5.00g
Cloruro de sodio.....	4.00g
Acetato de sodio.....	1.50g
Ácido ascórbico.....	0.50g

3.2.1.2 Medios de caracterización

Medios de crecimiento con NaCl al 6,5% o al 4,0% (BHI-NaCl 6,5%, BHI-NaCl 4,0%). Este medio se preparó adicionando 60 g ó 35 g de NaCl por litro de medio BHI, según formulación, teniendo en cuenta la cantidad de NaCl que contiene el medio deshidratado.

Medios de crecimiento a pH 4,5, pH 8,0 y pH 9,6 (BHI-pH 4,5, BHI-pH 8,0, BHI-pH 9,6). Estos medios se prepararon adicionando un ácido o bien tampón bicarbonato sódico 0,2 M, al medio BHI.

Agar bilis esculina: El preparado comercial (Scharlau) se disolvió en agua destilada, a razón de 64,5 g/L. Su composición en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

Extracto de carne.....	3,00g
Peptona.....	5,00g
Bilis.....	40,00g
Citrato férrico amónico.....	0,50g
Esculina	1,00g

Medio agar-gelatina. Para la detección de actividad gelatinasa se utilizó agar de Todd-Hewitt (Difco) adicionado de 30 g/L de gelatina.

Medio agar-leche descremada. Este medio fue utilizado para la detección de microorganismos productores de proteasas. Para ello, se utilizó medio TSA adicionado de leche descremada en polvo al 1,5 %.

Triptona	17g
Peptona de soja	3g
Cloruro sódico	5g
Fosfato dipotásico.....	2,5g
Glucosa.....	2,5g
Leche descremada en polvo.....	15g

Medio agar-ADN. Este medio fue utilizado para determinar la presencia de actividad ADNasa. Su composición en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

Triptona.....	20,00g
ADN.....	2,00g
Cloruro sódico	5,00g
Azul de toluidina	0,1g

Medio agar-sangre. Medio utilizado para determinar la presencia de actividad β -hemolítica. Su composición en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

Peptona	23,00g
Cloruro sódico	5,00g
Almidón.....	1,00g
Sangre desfibrinada.....	50,00mL

Medios para la fermentación de la rafinosa y estaquirosa. Se utilizó agar MRS modificado de acuerdo con Gilliland y Speck (1977). El medio MRS se preparó sin extracto de carne y sin glucosa y el citrato de hidrógeno di-amonio se reemplazó por el citrato sódico. Finalmente, se adicionó rojo de clorofenol como indicador de pH a una concentración final del 0,004%. Los azúcares estaquirosa y rafinosa fueron adicionados al medio de cultivo a razón de 3,09 y 8 g/L, respectivamente.

Medios para determinar la producción de exopolisacáridos (EPS). Se prepara el medio MRS con el 10% de sacarosa. Se siembran las cepas y se dejan incubar 48 horas, con el asa de siembra se comprueba si las colonias pueden ser levantadas cómo el hilo, con lo cual se considera que producen EPS.

Medio agar-almidón. Este medio ha sido utilizado para determinar la presencia de actividad a-amilasa. Su composición en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

Peptona	5,00g
Extracto de carne.....	3,00g
Almidón.....	2,00g
Agar.....	7,00g

3.2.1.3 Medios de evaluación de la actividad antimicrobiana

Medio BHA tamponado (BHA-T). Se utilizó cómo capa base de las placas para los ensayos de actividad antibacteriana. El preparado comercial (BHI) se reconstituyó con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2. Su composición en gramos por litro es la siguiente:

BHI	35,00g
Fosfato monosódico.....	4,30g
Fosfato disódico.....	10,00g
Agar.....	17,00g

Medio BHAT blando. Fue empleado cómo sobrecapa para cubrir la capa base de BHAT una vez inoculado con la bacteria indicadora

BHI	15,00g
Fosfato monosódico.....	4,30g
Fosfato disódico	10,00g
Agar.....	8,00g
Tampón fosfato sódico 0,15 M, pH 7,2	1000,00mL

3.2.2 Microorganismos

Como microorganismos indicadores para los ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon las cepas de *Enterococcus faecalis* S-47, *Escherichia coli* CECT 432, *Listeria innocua* CECT 910, *Staphylococcus aureus* CECT 192 y *Salmonella* sp. (Gálvez, 1984; Martínez-Bueno et al., 1986).

Para uso rutinario, las distintas cepas bacterianas se conservaron a 4 °C en tubos de agar inclinado, mediante resiembras periódicas. Para su conservación a largo plazo se almacenaron a -20 °C y a -80 °C, utilizando cómo sustancia crioprotectora glicerol al 20%.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Aislamiento y recuento de bacterias lácticas de la leche

3.3.1.1. Preparación de la muestra

En los días previos a los experimentos se preparaba el material necesario para los experimentos, medios de cultivos, placas y solución salina para las diluciones. El día del ensayo las muestras de leche eran sacadas del congelador y puestas en refrigeración para que se descongelaran lentamente.

3.3.1.2 Siembra e incubación

Se realizaron diluciones seriadas de la muestra de leche bien homogeneizada, y se sembraron en un medio general para la detección de mesófilos totales. El proceso se realizó por triplicado con todas las muestras del ensayo.

Las muestras se incubaron en una estufa a 36 °C durante 24 horas para posteriormente realizar los recuentos de las unidades formadoras de colonias expresando los resultados en UFC/mL

3.3.2 Caracterización mediante tinción y medios selectivos

3.3.2.1 Siembra en medios selectivos

De igual forma se hicieron diluciones seriadas de la muestra de leche y se sembraron en los medios selectivos MRS, Elliker, EMB y VJ, por triplicado. Se utilizaron esferas de vidrio para la distribución homogénea de la muestra y las placas se incubaron a sus determinadas temperaturas, las placas de Elliker y MRS en la estufa de 30 °C y las placas de EMB y VJ a 37 °C.

Tras 24 ± 2 horas se realizó el recuento de los medios VJ y MRS y pasadas 48 ± 2 horas las placas de Elliker y EMB. Se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias y se expresaron los resultados en UFC/mL

3.3.2.2 Aislamiento y selección de bacterias

De las placas de MRS, Elliker, VJ y EMB se aislaron diferentes colonias de forma aleatoria siempre dentro de las identificadas como positivas en cada medio. Las cepas se reaislaron mediante la técnica de estrías por agotamiento y se sembraron en tubos de semilla y guardaron en glicerol para los posteriores ensayos.

3.3.2.3 Tinción de Gram

Una vez seleccionadas las colonias se agruparon mediante la tinción de Gram y la morfología de las bacterias. Esta tinción nos permite examinar y diferenciar, mediante el uso de varios colorantes y el microscopio, las bacterias Gram negativas de las Gram positivas así como su morfología.

3.3.3 Producción de bacteriocinas

A partir de los tubos de semilla de las diferentes cepas se obtuvo un cultivo overnight en el medio MRS incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en los casos en los que la muestra provenía de viales congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, primero se sembraron e incubaron durante 48 horas en tubos de caldo de Elliker a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se ensayó la producción de bacteriocinas mediante dos técnicas: en gota y en pocillos. En ambos casos se utilizaron *Enterococcus faecalis* S-47, *Echerichia coli* CECT 432, *Listeria innocua* CECT 910, *Staphylococcus aureus* CECT 192 y *Salmonella* sp. como bacterias indicadoras. Estas bacterias se utilizaron para los ensayos mediante un cultivo overnight en BHI a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3.1 Técnica en gota

Se parte de un cultivo overnight en medio MRS líquido de cada una de las cepas a ensayar, se ponen 5 microlitros de cada cepa en una placa petri con medio MRS bien seca, depositándose en forma de una gota de unos 5-6 mm. Se colocan unas 7 gotas por placa, de las diferentes cepas, separadas bien entre ellas. Las placas se incuban en la estufa a 30 °C durante 24 horas. Tras crecer las gotas, se le añade la sobrecapa de BHA tamponado que contiene 60 µL de la cepa indicadora *Enterococcus faecalis* S-47, *Echerichia coli* CECT 432, *Listeria innocua* CECT 910, *Staphylococcus aureus* CECT 192 y *Salmonella* sp.. Se incubó 24 horas a 37 °C, y tras esto se pudo examinar el halo de inhibición que presentó cada cepa, dando un resultado de positivo o negativo según la presencia de halo.

3.3.3.2 Técnica con pocillos

La técnica con pocillos fue desarrollada en 1971 por Tagg y McGiven para determinar la actividad antimicrobiana presente en muestras líquidas. Sobre una placa que contiene una capa base de medio BHA tamponado se depositan 7 torrecillas de acero inoxidable (8 mm de diámetro x 1 cm de altura; Scharlau). Seguidamente, se vierte sobre la placa 6 mL del medio de sobrecapa BHAT, mantenido en fusión (45 °C) e inoculado con aproximadamente 3×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria indicadora correspondiente. Una vez solidificada la sobrecapa, se retiraron las torres con pinzas estériles. En los huecos dejados por las torrecillas (pocillos) se depositaron 100 µL del sobrenadante de la muestra a ensayar previamente centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm. Las placas fueron posteriormente incubadas a 37 °C durante 18 h. Tras el crecimiento de la cepa indicadora se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento producidos alrededor de cada pocillo. Las torres de acero son esterilizadas con alcohol, secadas y esterilizadas en autoclave.

3.3.3.3 Comprobación la naturaleza proteica del compuesto antibacteriano

Para saber si la actividad antimicrobiana detectada mediante los ensayos de antagonismo directo era debida a la producción de bacteriocinas se evaluó el posible origen proteico de la sustancia inhibidora, considerando que las bacteriocinas son toxinas proteicas. Para esto las cepas productoras de halo fueron inoculadas (mediante gotas de 10 μ L) por duplicado, 6 gotas por placas, en placas de BHA tamponado. Las placas con las gotas fueron incubadas a 37 °C durante 12 h. A continuación, en una de las placas se depositaron 5 μ L de una solución de tripsina (a una concentración de 10 mg/mL) sobre un lateral del crecimiento obtenido para cada gota. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 3 h para permitir la actuación del enzima, antes de ser cubiertas con una sobrecapa de BHA tamponado inoculada con la bacteria indicadora, 60 μ L por tubo de sobrecapa. Posteriormente, las placas se incubaron a la temperatura adecuada durante 12-14 horas, transcurridas las cuales se observan los halos de inhibición aparecidos en las placas control, pero no alrededor de las gotas de proteasa.

3.3.4 Caracterización de las cepas seleccionadas

Para la realización de los ensayos que se describen en este apartado se partió de cultivos de 12 h obtenidos en medio BHI. Para las pruebas realizadas en medio sólido, la inoculación se realizó depositando gotas de 10 μ L mediante una micropipeta, sobre la superficie de las placas bien secas.

3.3.4.1 Crecimiento a pH alcalino (8 y 9,5)

Las diferentes cepas fueron inoculadas en BHI tamponado a pH 9,5 y 8, e incubadas a 37 °C durante 48 h. Se observó la presencia de crecimiento y se dio un valor de positivo o negativo.

3.3.4.2 Crecimiento a pH ácido (4,5)

Las diferentes cepas fueron inoculadas en BHI acidificado con un ácido hasta 4,5 e incubadas a 37 °C durante 48 h. Se observó la presencia de crecimiento y se dio un valor de positivo o negativo.

3.3.4.3 Crecimiento en presencia de NaCl al 6,5% y 4%

Las diferentes cepas fueron inoculadas en BHI-NaCl 6,5% y 4% e incubadas a 37 °C durante 48 h, observándose la aparición de crecimiento y se dio un valor de positivo o negativo.

3.3.4.4 Crecimiento en presencia de sales biliares e hidrólisis de la esculina

Ambas pruebas se realizaron de forma simultánea mediante la siembra en agar bilis-esculina. Se consideraron positivas para esta prueba las cepas que mostraban una coloración marrón oscuro alrededor del crecimiento.

3.3.4.5 Determinación de la actividad hemolítica

Las diferentes cepas fueron inoculadas en forma de gotas sobre placas de agar sangre e incubadas a 37 °C en una atmósfera anaeróbica. Tras 24 h de incubación se observó la aparición de halos de hemólisis alrededor del crecimiento, existen tres tipos de hemólisis g, a y b. La hemólisis "alfa" distingue por la aparición de halos de color verdoso debido a la degradación parcial de la

hemoglobina. La hemólisis "beta" se manifiesta mediante la aparición de halos transparentes y generalmente mayores, debidos a la lisis completa de los eritrocitos. El término hemólisis "gamma" se emplea para designar la ausencia de actividad hemolítica.

3.3.4.6 Determinación de la actividad ADNasa

Para la realización de esta prueba, las diferentes cepas fueron inoculadas con gotas en placas de agar-ADN, e incubadas a 37 °C durante 24 h - 36 h. La degradación del ADN se puso de manifiesto por la aparición de halos transparentes alrededor del crecimiento.

3.3.4.7 Determinación de la actividad proteasa

La producción de actividad proteolítica se determinó empleando como sustratos gelatina, y caseína. Las diferentes cepas fueron inoculadas sobre agar gelatina o sobre agar-leche descremada y luego incubadas a 37 °C durante 48 h. Seguidamente, las placas que contenían gelatina fueron incubadas a 4 °C durante 5 h. Se consideraron positivas aquellas cepas que presentaban un halo turbio a su alrededor (Ike et al., 1987). Para la hidrólisis de la caseína, se consideraron positivas las cepas que mostraban un halo claro alrededor del crecimiento.

3.3.4.8 Ensayo de producción de exopolisacáridos

En las placas de MRS-sacarosa se colocaron 7 gotas de 8 µL. de las diferentes cepas a evaluar. Se incubaron las cepas a 30 °C durante 48 horas. Después de la incubación se comprobó con el asa estéril si las colonias producían sustancias pegajosas que hilaran, con lo que se consideró la prueba positiva, sino negativa.

3.3.4.9 Determinación de la actividad amilolítica

Las diferentes cepas fueron inoculadas sobre agar almidón, e incubadas a 37 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron cubiertas con una solución de revelado. La reacción del reactivo con el almidón no hidrolizado confiere una intensa coloración azul-violeta. La producción de actividad amilasa se puso de manifiesto por la presencia de zonas claras alrededor del crecimiento.

Solución de revelado:

I₂.....1g
IK.....2g
Agua destilada.....300mL

3.3.4.10 Hidrólisis de la rafinosa y la estaquiosa

Las diferentes cepas fueron sembradas sobre agar MRS-rafinosa y sobre agar MRS-estaquiosa, e incubadas a 37 °C durante 24-72 h. La hidrólisis del azúcar correspondiente se puso de manifiesto por la aparición de un halo amarillo.

3.3.5 Estudio molecular

3.3.5.1 Extracción de ADN

Se realizaron dos tipos de pruebas a partir del ADN extraído, con muestras cultivadas de colonias específicas se realizaron pruebas de identificación mediante la secuenciación del ARNr 16S, para la identificación bacteriana y por otro lado con el ADN total de la muestra de leche se realizó un estudio de biodiversidad microbiana por semana de muestreo.

Para la purificación del ADN se utilizó el kit GenElute Bacterial Genomic DNA de Sigma. De cada una de las cepas aisladas se tomaron 250 μ L de los criotubos con glicerol guardados a -20°C , y después de descongelarlos se inocularon en un tubo con 5 mL de medio de cultivo Elliker. Estos tubos se incubaron durante 48 horas a 30°C , para posteriormente tomar 250 μ L y pasarlos a un tubo con 5 mL de MRS. Los tubos de MRS se incubaron a 30°C overnight. Al día siguiente 2 mL de los tubos de cultivo ya crecidos se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm, desechando posteriormente el sobrenadante y conservando el pellet.

1. El pellet fue resuspendido en 180 μ L de solución de Lisozima y se incubó durante 30 minutos a 55°C , buscando debilitar así la pared celular de las gram positivas.
2. Se agregaron 20 μ L de ARNasa y se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Luego se agregó 20 μ L de solución de proteinasa K y 200 μ L de solución de lisis C, y se mezclaron completamente en el vortex durante 15 segundos. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a 55°C . Este paso busca la lisis celular.
4. Durante la incubación se preparan las columnas de la extracción. Se colocan las columnas en tubos eppendorf de 2 mL, luego se le agrega 500 μ L de solución de preparación de columna y posteriormente se centrifugan los tubos a 12000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se desecha el sobrenadante y se mantienen las columnas para continuar con el siguiente paso.
5. Después de la incubación se adicionaron al líquido lisado 200 μ L de alcohol etílico al 98%, se mezcló bien en un vortex durante 10 segundos.
6. Se transfirió la mezcla a la columna y se centrifugó a 6500 rpm x 1 minuto. Después de la centrifugación se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 mL.
7. Se lavó el ADN con 500 μ L de la solución de lavado 1 y se centrifugó la columna a 6500 rpm x 1 minuto.

8. A continuación se realizó el segundo lavado del ADN con 500 mL de la solución de lavado y se centrifugó la columna a 6500 rpm durante 3 minutos. Pasamos nuevamente la columna a otro tubo de 2 mL.
9. Como último paso se adicionaron 200 mL de solución de elución en el filtro de la columna dejándolo durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 6500 rpm durante 1 minuto. El ADN recolectado fue almacenado en congelación en un tubo de 2 ml hasta su próxima utilización.
10. Se hizo el análisis de la cantidad y calidad del ADN en cada una de las muestras mediante el Nanodrop ND-1000 UV-Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) y el Qubic.

3.3.5.2 Identificación bacteriana mediante la secuenciación del ADNr 16S.

El ADNr 16S se amplificó mediante PCR usando el cebador GAGTTTGATCMTGGCTCAG para S1627F y ACGGYTACCTTGTTACGACTT para S161492R.

El programa de PCR utilizado consiste en una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a 55 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto y extensión final a 72 °C durante 5 minutos. La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler® pro Thermal Cycler (Eppendorf, EE.UU.).

Los productos obtenidos mediante PCR se purificaron posteriormente, utilizando el kit de purificación de PCR comercial denominado ExoProStart™ (GE Healthcare, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y fueron posteriormente secuenciados en una empresa externa (Sistemas Genómicos, Valencia, España). Las dos secuencias de ARNr 16S se alinearon mediante el programa Bioedit y se compararon en el GenBank utilizando las herramientas de búsqueda de alineación local básica de NCBI BLAST.

3.3.5.3 Análisis de resistencia a antimicrobianos mediante PCR

La presencia de genes para bombas de exporte se determinó mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores y las condiciones específicas de PCR descritas previamente por Swick et al. (2011) para el gen *acrB*. Los genes de resistencia a beta-lactamasas investigados fueron *bla*_{TEM} (Sáenz et al., 2004), *bla*_{PSE} (Chiu et al., 2006), *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CTX-M-2} (Bertrand et al., 2006), *bla*_{KPC} (Yigit H, et al. 2001) y *bla*_{OXA-48 like} (Poirel et al., 2011). Los genes de resistencia a la tetraciclina *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) y *tet*(G) también fueron ensayados, según el protocolo descrito por Ng et al. (2001). La presencia del gen *aadA1* para resistencia a aminoglucósidos se investigó de acuerdo con Guerra et al. (2001). Los cebadores de PCR utilizados para determinar la presencia de genes de resistencia utilizados así como sus secuencias aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Cebadores de PCR utilizados para determinar la presencia de genes de resistencia

GEN	Cebador (5´ - 3´)	Amplicón (bp)
<i>bla</i> _{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882
<i>bla</i> _{OXA-48 like}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438
<i>bla</i> _{SHV}	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	231
<i>bla</i> _{TEM}	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	1150
<i>bla</i> _{PSE}	GGCAATCACACTCGATGATGCGT GGCTCAATACGGTCTAGACGAGT	156

GEN	Cebador (5' - 3')	Amplicón (bp)
<i>bla</i> _{CTX-M}	RATGTGCAGYACCAGTAA CGCRATATCRTTGGTGGTG	540
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TCAGAAACCGTGGGTTAC	876-859
<i>tet</i> (B)	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	659
<i>tet</i> (C)	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC	418
<i>tet</i> (D)	AAACCATTACGGCATTCTGC GACCGGATACACCATCCATC	787
<i>tet</i> (A)	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
<i>tet</i> (E)	AAACCACATCCTCCATACGC AAATAGGCCACAACCGTCAG	278
<i>tet</i> (G)	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC	468
<i>aadA1</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC ATTGCCAGTCGGCAGCG	525
<i>acrB</i>	GGT CGA TTC CGT TCT CCG TTA CTACCTGGAAGTAAACGTCATTGGT	107

3.3.6 Estudio de biodiversidad bacteriana

3.3.6.1 Extracción de ADN total

Una vez descongeladas las muestras de leche del mismo día se mezclaron completamente y se centrifugaron a 16000 x g durante 7 minutos. Después de la eliminación de los sobrenadantes, se extrajo el ADN total de los sedimentos restantes con un kit comercial (QIAamp Stool DNA fast mini kit; Quiagen, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN extraído se determinó mediante el sistema dsDNA QuantiFluor® ONE (Promega, Madison, EE. UU.). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

3.3.6.2 Análisis de la biodiversidad bacteriana

Las regiones del 16S rDNA V3-V4 se amplificaron siguiendo el protocolo Illumina Metagenomics Sequencing Library Evaluation (Illumina, Inc., San Diego, CA).

Como cebadores de PCR para el gen 16S rDNA se utilizaron las siguientes secuencias:

Cebador directo:
5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

; Cebador inverso:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA

ATCC (Klindworth et al., 2011).

Para realizar el protocolo de análisis, se utilizó ADN genómico microbiano (5 ng / µl en Tris 10 mM pH 8,5). Después de la amplificación del gen 16S rDNA, el paso de multiplexación se realizó usando el Kit Nextera XT Index (Illumina). Con 1 µl del producto de PCR en un chip Bioanalyzer DNA 1000 se verificó el tamaño correcto (tamaño esperado ~ 550 pb).

Después de la verificación del tamaño, las bibliotecas se secuenciaron (2x300 pb) en un secuenciador MiSeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina). La evaluación de la calidad se realizó mediante el uso del programa prinseq-lite (Schmieder y Edwards, 2011).

Los datos de la secuencia se analizaron utilizando qiime2 pipeline (Caporaso et al., 2011). La eliminación de errores, la unión de extremos emparejados y la eliminación de quimeras se realizaron utilizando la herramienta DADA2 (Callahan et al., 2016). Las afiliaciones taxonómicas se obtuvieron utilizando el clasificador Bayesiano Naive integrado en los complementos qiime2 y la base de datos SILVA_release_132.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 24 (IBM Corp., Foster City, CA)..

RESULTADOS

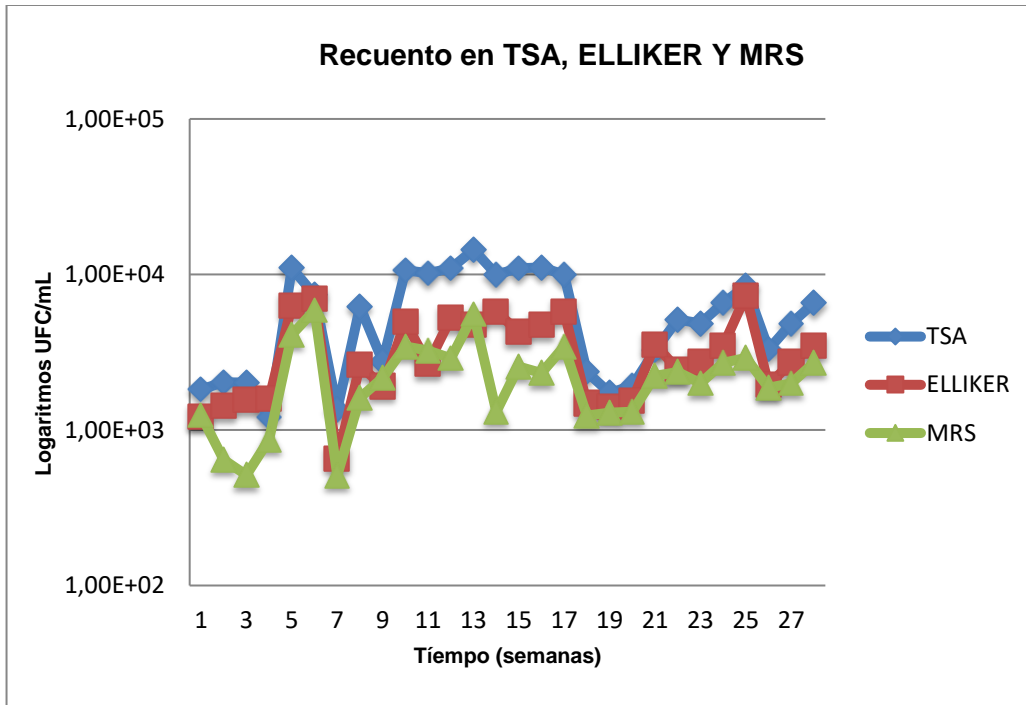
4.1 AISLAMIENTO Y RECUESTO BACTERIANO

Como se ha indicado anteriormente se procedió a la obtención en forma aséptica de las diferentes muestras de leche materna a partir de la semana 20 de lactancia tres veces al día una vez por semana.

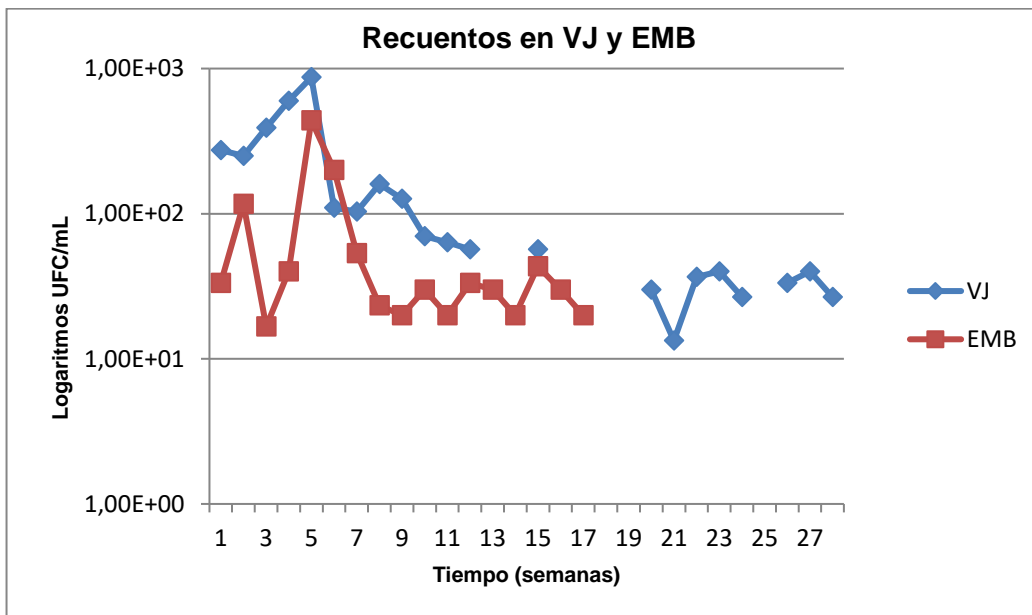
Las ochenta y cuatro muestras que fueron obtenidas durante 28 semanas, se sembraron en diferentes medios de cultivo con el fin de realizar recuentos bacterianos tanto de mesófilos totales (TSA), bacterias ácido lácticas en dos medios (MRS y ELLIKER), estafilococos (VJ) como de enterobacterias y bacilos negativos (EMB).

Los aerobios mesófilos totales y las bacterias ácido lácticas mantuvieron un recuento en torno a 3 - 4 unidades logarítmicas por mL de leche. En general como se muestra en la Gráfica 1, los recuentos de UFC/mL durante las 28 semanas en los medios TSA, MRS y ELLIKER siguieron la misma tendencia. En el recuento de mesófilos aerobios totales se observó su máximo por encima de 4 unidades logarítmicas en la semana 13, manteniéndose el resto de las semanas entre 3 y 4 unidades logarítmicas. El recuento de bacterias ácido lácticas en medio Elliker se mantuvo en torno a las 3 unidades logarítmicas, a excepción de la semana 7, en la que disminuyó algo. En MRS si se observó un descenso por debajo de tres en las semanas 2, 3, 4 y 7.

Las primeras 9 semanas los niveles de estafilococos se mantuvieron en 2 logaritmos. A partir de ahí los recuentos fueron disminuyendo, incluso no se detectaron células viables en muchas de las semanas. En el caso de las enterobacterias solo durante 3 semanas se detectaron recuentos superiores a 2 logaritmos (semana 2, 5 y 6), después de la semana 18 los recuentos en placas fueron de cero, mientras que las semanas anteriores los recuentos fueron menores a 2 log. (Gráfica 2). Los datos totales se muestran en el anexo 1 y por semana en el anexo 2.



Gráfica 1: Recuento bacteriano de UFC/mL en TSA, MRS y Elliker de las muestras de leche materna.



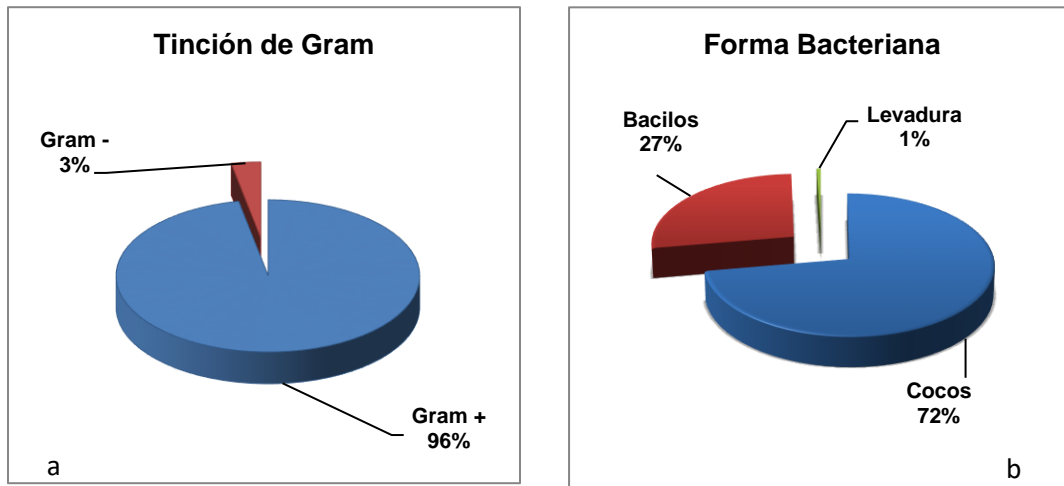
Gráfica 2: Recuento bacteriano de UFC/mL en VJ y EMB de las muestras de leche materna.

Al realizar un análisis de varianza entre los recuentos en TSA, MRS y ELLIKER, se puede determinar que no existe diferencia estadística entre las muestras de MRS y Elliker, con un rango de confianza del 95%, aunque los resultados de ambos medios fueron estadísticamente diferentes de los resultados de TSA (anexo 3). El grado de correlación de los datos de TSA con los de MRS es de 0.74 y con Elliker es de 0.8, siendo esta una correlación significativa.

4.1.1 Tinción de Gram

Una vez realizados los recuentos se aislaron un total de quinientas ochenta y dos cepas de todos los medios ensayados. De las 582 cepas que fueron aisladas, 560 se identificaron como bacterias gram positivas representando el 96% de la población total y sólo el 3% (18 cepas) fueron identificadas como gram negativas. El 1% restante (4 cepas) pertenecían a levaduras.

Así mismo 420 de las cepas bacterianas mostraron morfología cocoide (72%) y 158 presentaron una morfología bacilar (27%). En la gráfica 3 (a y b) se muestran los porcentajes que resumen los datos del anexo 4 y 5.



Gráfica 3: (a) Porcentaje de bacterias Gram + y -. (b) Porcentaje según forma bacteriana.

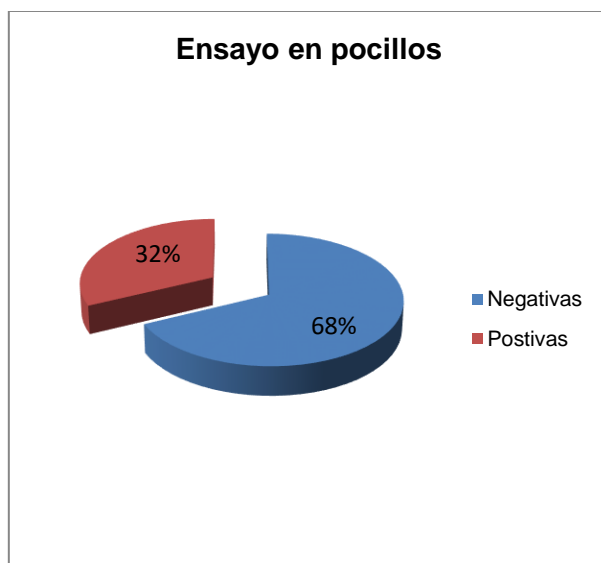
4.2 PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS

Para evaluar la posible producción de bacteriocinas por parte de las diferentes cepas aisladas, se realizó un ensayo de antagonismo frente a un conjunto de cepas indicadoras. Primero se realizó una prueba en gota con las 578 cepas bacterianas y a las muestras positivas 514 se les realizó posteriormente la prueba de producción en medio líquido mediante la técnica en pocillo frente a las 5 cepas indicadoras: *Enterococcus faecalis* S-47, *Escherichia coli* CECT 432, *Listeria innocua* CECT 910, *Staphylococcus aureus* CECT 192 y *Salmonella* sp. (anexos 6 y 7). El 88.9% de las cepas a las que se les realizó el ensayo en gota dieron positivas frente a alguna indicadora. Tabla 5.

Tabla 5. Resultado en porcentaje del ensayo en gota.

Ensayo de Bacteriocina en Gota	
Resultado	%
Positivas	88.9
Negativas	11.1

De las 514 cepas a las que se le realizó la prueba mediante pocillos el 58% fueron negativas y el resto, 216 dieron algún tipo de halo. Se tomó la decisión de considerar positivas solamente las cepas aisladas que presentaran por lo menos un halo \geq a 12mm. Lo que nos deja con un 32% de positivas, que equivalen a 166 cepas (Gráfica 4, anexo 7).



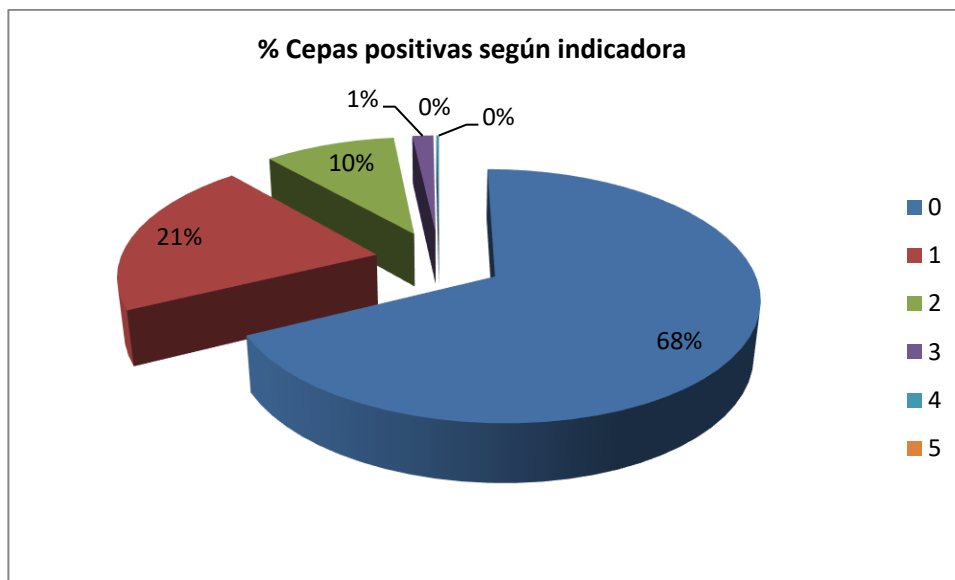
Grafica 4: Porcentaje de cepas que mostraron halo ≥ 12 mm.

De las 216 cepas que dieron algún halo, el promedio de los halos estaba en torno a 14.1 mm, siendo mayor el diámetro promedio de los halos frente a *E. faecalis*, con una media de 18 mm y los halos más pequeños los obtenidos frente a *Salmonella* con 10.5 mm (Tabla 6). Los halos mayores detectados fueron de 25 mm, mientras que los más pequeños fueron de 8.5 mm, solo medio milímetro más que el diámetro del pocillo. De estos, 237 halos eran mayores o iguales a 12 mm.

Tabla 6. Tamaño promedio de los halos según la bacteria indicadora.

BACTERIA INDICADORA	TAMAÑO PROMEDIO HALO (mm)
<i>Salmonella sp.</i>	10.5
<i>L. innocua</i>	14.1
<i>E. coli</i>	13.3
<i>E. faecalis</i>	18
<i>S. aureus</i>	14.7

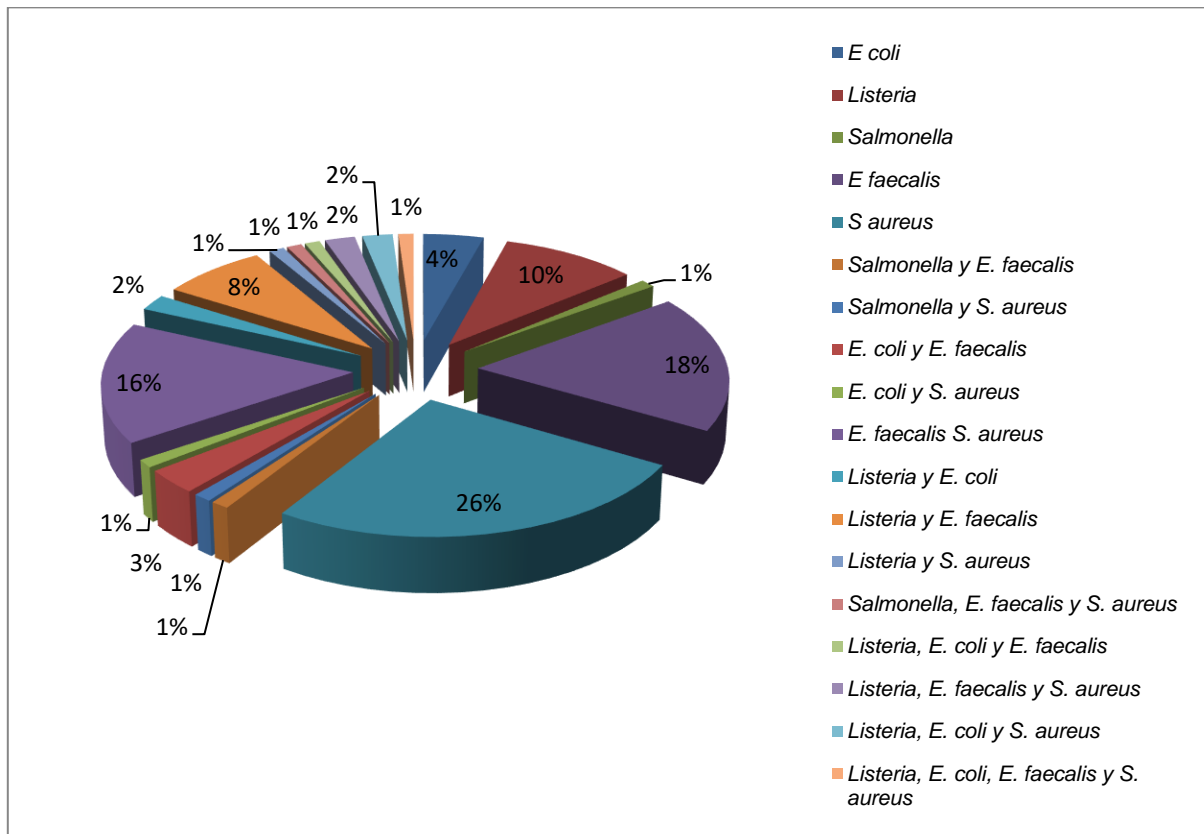
Teniendo en cuenta aquellas cepas que mostraron halos con diámetro superior o igual a 12 mm, 84 cepas mostraron halo frente a *S. aureus*, dos de ellas con 25 mm; 77 de las cepas mostraron halo de inhibición frente *E. faecalis*, llegando seis cepas a 25 mm; 42 de las cepas mostraron halo frente a *Listeria* llegando una a alcanzar 25 mm; 21 cepas mostraron inhibición frente a *E. coli*, con dos cepas con un halo de 23 mm y 12 de las cepas elegidas mostraron halo de inhibición frente a *Salmonella* una de ellas con 17 mm (anexo 7). El 21 % de las 514 cepas (el 68% fueron consideradas negativas por tener un halo menor a 12) fueron positivas para una sola cepa indicadora, mientras que el 10% lo fue para 2 cepas indicadoras, el 1 % para tres cepas indicadoras y solo una cepa dio positivo frente a 4 cepas diferentes (Gráfica 5).



Gráfica 5: % Número de cepas positivas con respecto a las indicadoras: **0:** Cepas consideradas – por tener halo menor 12mm **1:** + a 1 indicadora, **2:** + a 2 indicadoras, **3:** + a 3 indicadoras, **4:** + a 4 indicadoras **y 5:** + a 5 indicadoras.

Del 100% de las cepas consideradas como positivas (166 cepas) el 59% fue positiva frente a una sola cepa, destacando un 26% a *S. aureus* y un 18% a *E. faecalis*. Hubo 8 diferentes combinaciones de positivos frente a 2 cepas indicadoras,

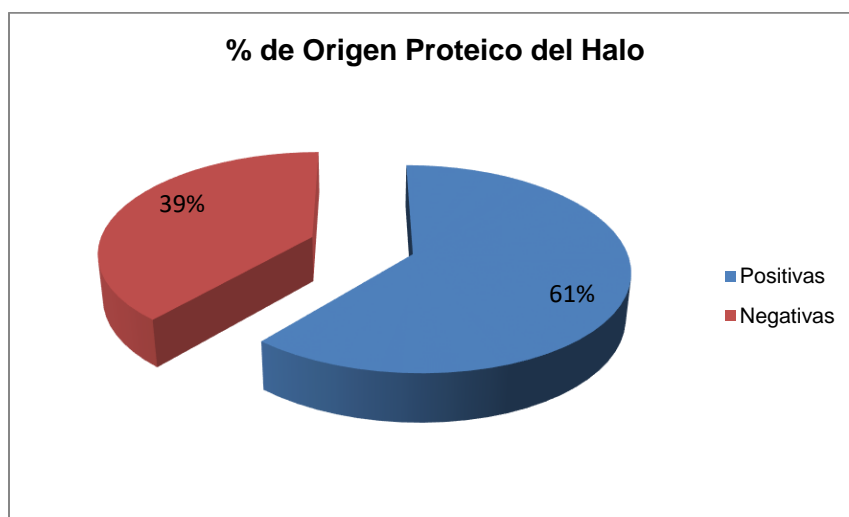
representando el 33% de las cepas positivas. Las combinaciones más comunes fueron *E. faecalis* + *S. aureus* (16%) y *Listeria* + *E. faecalis* (10%). Se observó también resultados frente a 4 combinaciones de 3 cepas indicadoras positivas y una combinación de 4 cepas indicadoras. Todas las combinaciones y sus porcentajes se pueden ver en la gráfica 6.



Gráfica 6: % de cepas positivas en función de las indicadoras susceptibles

Para confirmar el origen proteico de los halos, y así determinar si su causa es posiblemente una bacteriocina se realizó un ensayo con tratamiento con proteasa a las 166 cepas que dieron halo en el ensayo en pocillos. En esta prueba 101 de las cepas

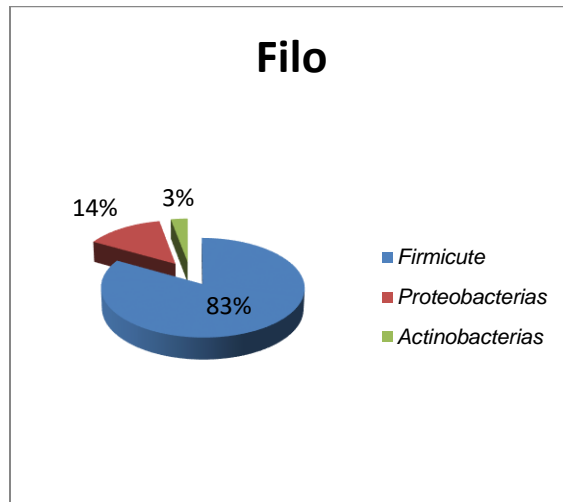
dieron resultado positivo y 65 negativas, con una relación porcentual de 61:39 (Gráfica 7).



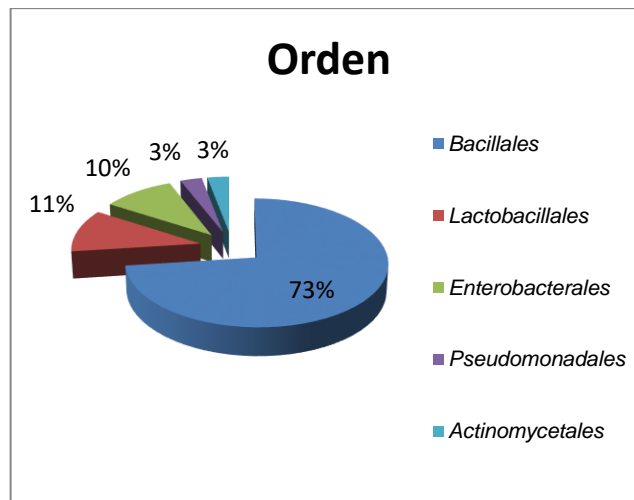
Gráfica 7: Determinación del origen proteico del halo de inhibición

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIOCINOGENICAS

Las 101 cepas productoras de sustancias antimicrobianas sensibles a proteasa (por tanto, presuntas bacteriocinas) fueron identificadas mediante secuenciación de ADNr 16S (anexo 8). Los resultados indicaron que este conjunto de cepas pertenecían solo a 3 filos; 84 cepas pertenecían al filo *Firmicutes*, 14 a *Proteobacteria* y 3 a *Actinobacteria*. La distribución porcentual de las mismas se muestra en la gráfica 8. Se observaron 5 órdenes dentro de los *Firmicutes*: los *Bacillales* con 73 cepas y *Lactobacillales* con 11 cepas. El 11% de las bacterias son *Lactobacillales*. En el filo *Actinobacteria* se observaron cepas del orden *Micrococccineae* con 3 cepas y en el filo *Proteobacteria* se encontraron los órdenes: *Enterobacterales* (11 cepas) y *Pseudomonadales* (3 cepas) (Gráfica 9).

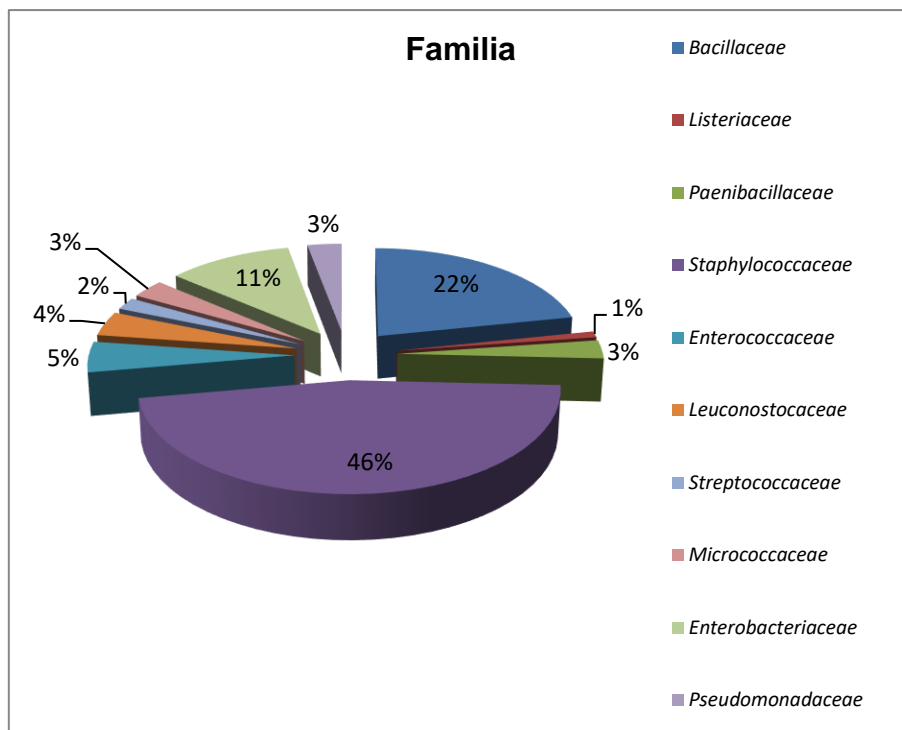


Gráfica 8: Distribución porcentual de las cepas productoras de bacteriocinas por filo



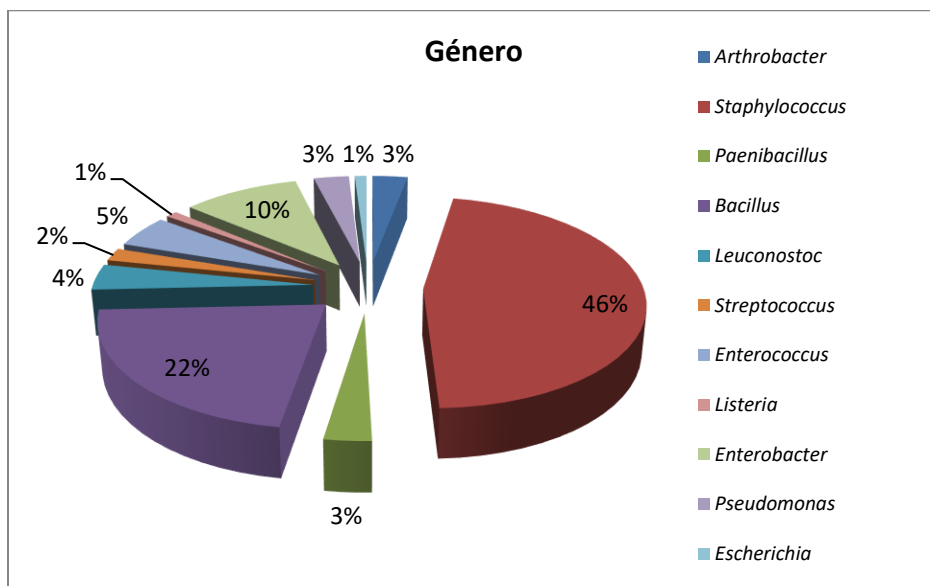
Gráfica 9: Distribución porcentual de las cepas productoras de bacteriocinas por orden

De la misma forma se obtuvieron 10 familias como se muestra en la gráfica 10. Del orden *Bacillales* se obtuvieron bacterias de las familias: *Staphylococcaceae* (47 cepas), *Bacillaceae* (22 cepas), *Listeriaceae* (1 cepa) y *Paenibacillaceae* (3 cepas); y de las *Lactobacillales*: *Streptococcaceae* (2 cepas), *Leuconostocaceae* (4 cepas), *Enterococcaceae* (5 cepas). Del orden *Micrococcales* solo se detectó la familia *Micrococcaceae* (3 cepas), del orden *Pseudomonadales* la familia *Pseudomonadaceae* (3 cepas) y del orden *Enterobacterales* la familia *Enterobacteriaceae* (11 cepas). Siendo la mitad de las bacterias de la familia de las *Staphylococcaceae* y el 22% *Bacillaceae*, como principales familias del filo *Firmicutes*, aunque hay que notar la presencia de *Enterococcaceae* (5%), *Leuconostocaceae* (4%) y *Streptococcus* (2%) consideradas bacterias lácticas. Del filo *Proteobacteria*: *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadales*; representando las *Enterobacteriaceae* el 11% de las bacterias. Y por último en el filo *Actinobacteria* las *Micrococcaceae* 3%.



Gráfica 10: Distribución porcentual de las cepas productoras de bacteriocinas por familias

Se obtuvieron 11 géneros, como podemos observar en la gráfica 11. Los 5 géneros más abundante fueron: *Staphylococcus* con el 46% de las bacterias, *Bacillus* con 22% y *Enterobacter* con 10% *Enterococcus* 5% y *Leuconostoc* 4%. Los géneros menos comunes fueron *Streptococcus* 2%, *Arthrobacter* 3%, *Escherichia* 1% y *Listeria* 1%. El árbol taxonómico de las muestras obtenidas se describe en la figura 4 y en el anexo 8 se muestra la lista completa de todas las cepas identificadas.



Gráfica11: Distribución porcentual de las cepas productoras de bacteriocinas por géneros

Relación Taxonómica

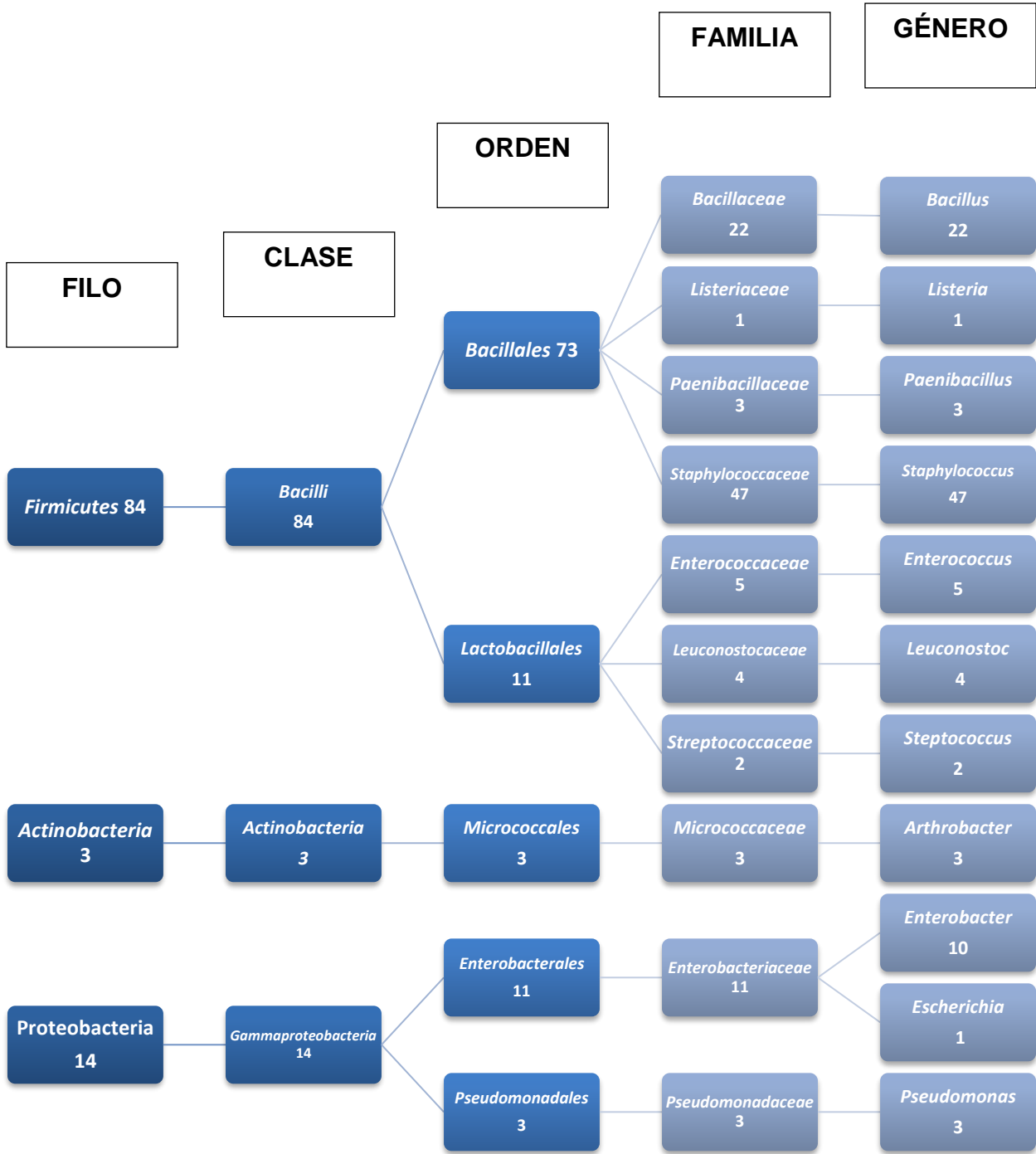


Figura 4: Relación Taxonómica de las Cepas Productoras de Bacteriocinas Identificadas

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIOCINOGÉNICAS

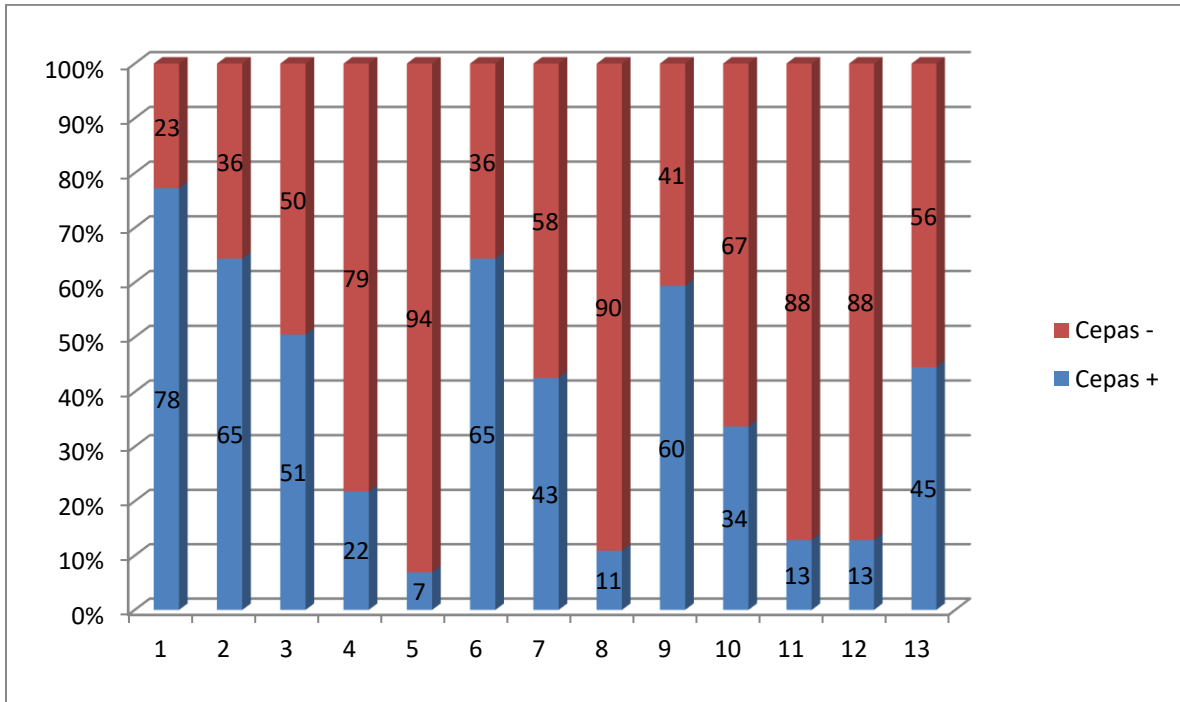
4.4.1 Propiedades funcionales

Las 101 cepas seleccionadas anteriormente fueron sometidas a una serie de pruebas para evaluar su resistencia bajo condiciones adversas, como las que se pueden producir en el tracto intestinal, y así también estudiar algunas de las características que se requieren para poder determinar su potencial probiótico. Los resultados se muestran en la tabla 7 y en el anexo 9.

El 77% de las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a concentraciones moderadas de sal (4%) y un 64% a concentraciones elevadas de sal del 6.5%, concentración equivalente a una salmuera. Poco más de la mitad de las cepas crecieron a pH 4,5. 22 de las cepas crecieron a pH 8 y solo cerca de un 7% creció a un pH más alcalino de 9 (Gráfica 12).

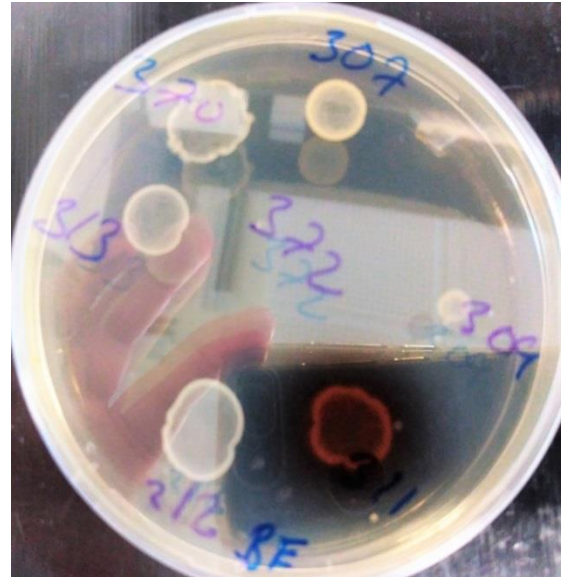
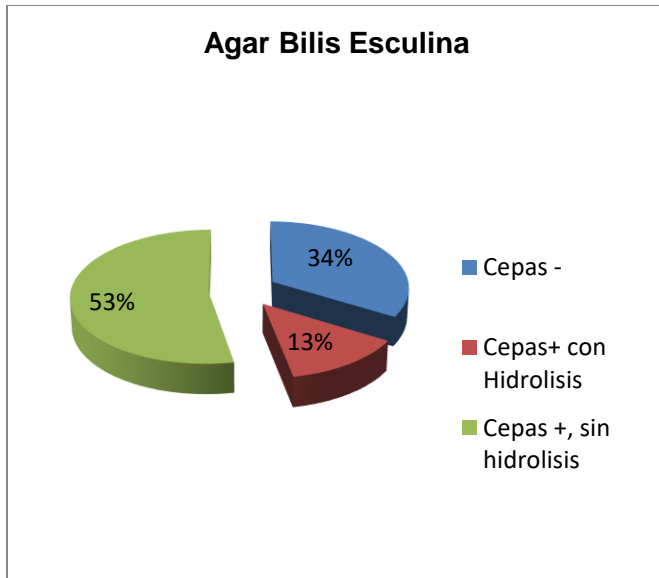
Tabla 7. Crecimiento de cepas en los diferentes medios de caracterización

	Nº de Cepas	
	+	-
NaCl 4%	78	23
NaCl 6.5%	65	36
pH 4,5	51	50
pH 8	22	79
pH 9	7	94
Crecimiento Sales Biliares e Hidrólisis Esculina	52/13	36
Actividad Hemolítica a y b	43	58
Actividad ADNasa	11	90
Actividad Proteasa	60	41
Actividad Amilolítica	34	67
Hidrólisis de Estaquirosa	14	87
Hidrólisis de Rafinosa	13	88
Producción Exopolisacáridos	45	56



Gráfica 12: Resultado de las pruebas de caracterización de las bacterias en %. **1:** NaCl al 4%; **2:** NaCl al 6.5%; **3:** pH 4,5; **4:** pH 8; **5:** pH 9; **6:** hidrólisis de sales biliares y esculina; **7:** actividad hemolítica; **8:** hidrólisis de ADN; **9:** actividad de proteasas; **10:** actividad amilolítica; **11:** hidrólisis de estaquiosa; **12:** hidrólisis de rafinosa; **13:** producción de exopolisáridos.

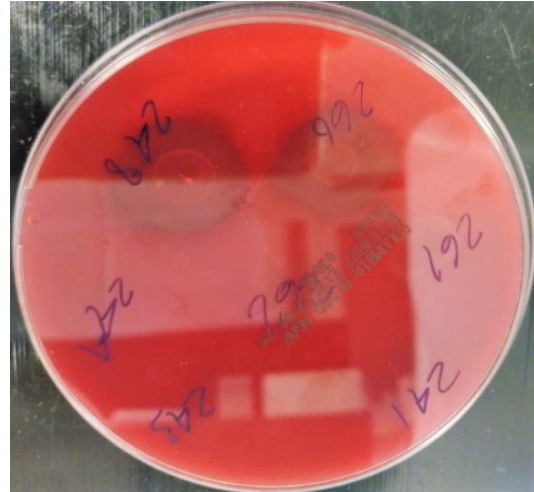
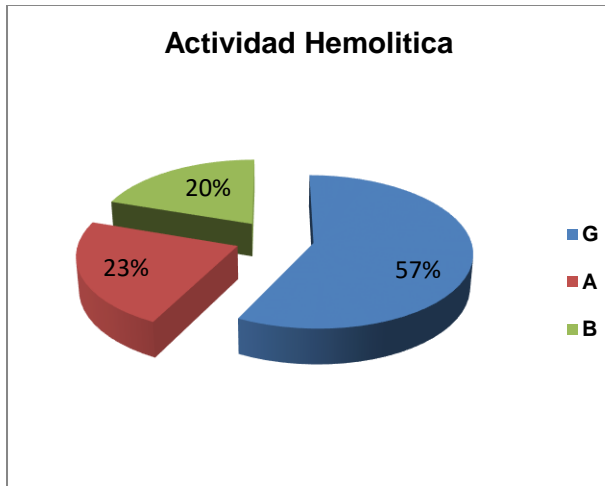
En la prueba para evaluar la capacidad de crecer en presencia de sales biliares e hidrolizar la esculina, el 53% de las cepas lograron crecer en el medio, pero solo el 13% logró hidrolizar la esculina (Gráfica 13). En el caso de las bacterias que eran capaces de hidrolizar estos compuestos se podía observar un viraje en el medio a color marrón (Figura 5).



Gráfica 13: Ensayo con medio de Sales Biliares y Esculina. **Figura 5:** Hidrólisis de la esculina

En los ensayos para determinar la actividad hemolítica, había dos posibles positivas, aquellas que producían un halo verde que asimilaban parcialmente la hemoglobina (a) y las que producían un halo transparente (b), en la figura 6 se muestran los halos en las placas de agar sangre. Alrededor del 43% de las muestras fueron positivas (a ó b), como se muestra en la tabla 4, el 23% de las muestras tuvieron halo tipo a y el otro 20% tipo b (Gráfica 14).

Solo once cepas hidrolizaron el ADN, y cerca del sesenta por ciento de las bacterias mostró actividad proteolítica en agar leche, algunas de ellas con dificultades para crecer. Cuarenta y cinco cepas produjeron exopolisacáridos.



Gráfica 14: % de cepas con actividad hemolítica. **Figura 6:** Ensayo actividad hemolítica.

De igual forma muy pocas cepas, 34, mostraron actividad amilolítica en las placas de agar almidón (Figura 7a). Para que estas cepas se consideraran positivas, por la presencia de enzimas amilasas, al aplicar una sustancia reveladora de yodo y potasio, se podían observar, de forma clara, los halos alrededor de las cepas por la falta de almidón. Y finalmente solo 13 cepas crecieron en el medio MRS-Rafinosa y 14 en MRS-Estaquiosa, (Figura 7b).

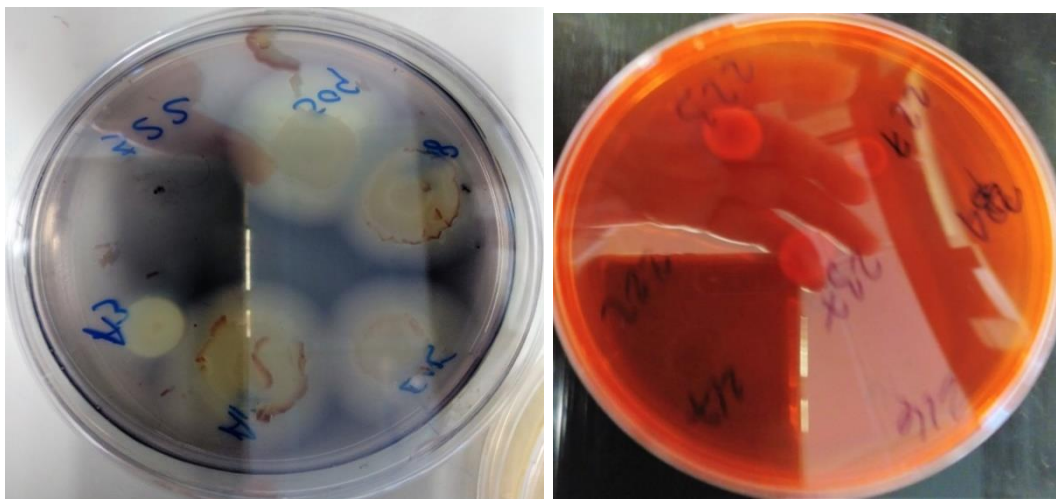


Figura 7: a) Ensayo en Agar-Almidón. b) Ensayo en MRS- Rafinosa/Estaquios

4.4.2 Presencia de genes de resistencia a antimicrobianos

En cuanto a la detección de genes de resistencia a diferentes antibióticos, de todas las cepas identificadas no hay ninguna cepa que tenga resistencia para algún gen de betalactámicos, tetraciclinas de algún grupo de los estudiados y bombas de exporte al mismo tiempo (anexo 10).

Con respecto a los genes de resistencia a antibióticos estudiados, de un total de 101 cepas, 33 de ellas mostraron algún gen de resistencia a betalactámicos, 1 a tetraciclinas, 31 a aminoglucósidos y 11 a bombas de exporte. Representando por tanto el 30% de las muestras, algo que puede considerarse altamente representativo si tenemos en cuenta la procedencia de las muestras ensayadas en este estudio.

De las 31 cepas que mostraron la presencia de genes de resistencia a betalactámicos, *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*, la mitad de ellas presentan ambos genes simultáneamente (Tabla 8). El gen detectado con mayor frecuencia fue *bla_{TEM}* (presente en 20 de las cepas).

Tabla 8: Genes de resistencia a betalactámicos.

BETALACTÁMICOS							Cepa /Identificador	
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{OXA-48 LIKE}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{PSE}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{CTX-M-2}</i>		
		+	+				Arthrobacter koreensis	60
			+				Pseudomonas taiwanensis	154
					+		Paenibacillus polymyxa	180
					+		Staphylococcus epidermidis	187
		+	+				Arthrobacter koreensis	203
			+				Staphylococcus aureus	212
			+				Staphylococcus epidermidis	216
		+	+				Bacillus cereus	217
		+	+				Bacillus cereus	234
		+	+				Staphylococcus warneri	277
			+				Staphylococcus warneri	294

BETALACTÁMICOS							
<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{OXA-48 LIKE}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{PSE}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Cepa /Identificador
			+				Staphylococcus saprophyticus 297
			+				Staphylococcus warneri 311
		+	+				Staphylococcus hominis 312
		+	+				Staphylococcus warneri 370
		+	+				Bacillus paramycoides 372
		+	+				Echerichia coli 431
		+	+				Bacillus cereus 487
			+				Bacillus pacificus 508
			+				Enterobacter cloacae 509
			+				Bacillus cereus a12
		+	+				Bacillus cereus a3
		11	20		2		Total 33

Con respecto a las tetraciclinas, solamente se ha encontrado la presencia de un gen para resistencia a tetraciclinas del grupo I en el caso de una cepa de *Staphylococcus epidermidis* (Tabla 9).

Tabla 9: Genes de resistencia a tetraciclinas.

TETRACICLINAS						Cepa /Identificador
<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)	<i>tet</i> (D)	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (E)	<i>tet</i> (G)	
	+					Staphylococcus epidermidis 74

En cuanto a la resistencia a aminoglucósidos, el gen *aadA1* se detectó en 31 de las cepas (Tabla 10).

Tabla 10: Detección del gen *aadA1* para resistencia a aminoglucósidos.

AMINOGLUCÓSIDOS		
<i>aadA1</i>	Cepa /Identificador	
+	Staphylococcus epidermidis	116
+	Paenibacillus polymyxa	119
+	Pseudomonas taiwanensis	156
+	Enterococcus durans	168
+	Bacillus cereus	175
+	Paenibacillus polymyxa	180
+	Staphylococcus epidermidis	186
+	Staphylococcus epidermidis	188
+	Staphylococcus hominis	191
+	Staphylococcus epidermidis	194
+	Enterococcus faecium	202
+	Arthrobacter koreensis	203
+	Enterobacter cloacae	205
+	Bacillus cereus	209
+	Staphylococcus epidermidis	211
+	Staphylococcus aureus	212
+	Bacillus cereus	214
+	Staphylococcus epidermidis	216
+	Bacillus cereus	217
+	Bacillus cereus	234
+	Bacillus pacificus	244
+	Staphylococcus warneri	250
+	Bacillus paramycoides	261
+	Enterobacter sp.	262
+	Enterobacter cloacae	274
+	Staphylococcus warneri	277
+	Staphylococcus warneri	294
+	Staphylococcus saprophyticus	297
+	Bacillus pacificus	307
+	Staphylococcus aureus	309
+	Staphylococcus warneri	311

En el caso de las bombas de exporte, solo se detectaron 11 cepas positivas para el gen *acrB* (Tabla 11).

Tabla 11: Detección del gen *acrB* para bombas de exporte

BOMBAS DE EXPORTE		
<i>acrB</i>	Cepa /Identificador	
+	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	70
+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	75
+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	116
+	<i>Bacillus sp.</i>	125
+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	142
+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	165
+	<i>Bacillus cereus</i>	204
+	<i>Bacillus cereus</i>	217
+	<i>Enterobacter cloacae</i>	222
+	<i>Enterobacter cloacae</i>	227
+	<i>Bacillus cereus</i>	487

4.5 ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE LA LECHE MATERNA

1 Type of the Paper (Article)

2 Changes in the bacterial diversity of human milk 3 during late lactation period (weeks 21th to 48th)

4 Wendy Marin-Gómez¹, M^a José Grande¹, Rubén Pérez-Pulido¹, Antonio Galvez^{1,*}, and Rosario
5 Lucas¹

6 ¹ Microbiology Division, Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of
7 Jaén, 23071 Jaén, Spain; wendymarin@gmail.com (W.M.-G.); mjgrande@ujaen.es (M.J.G.);
8 rppulido@ujaen.es (R.P.P.); rluca@ujaen.es (R.L).

9 * Correspondence: agalvez@ujaen.es (A.G.); Tel: (+34) 953 212160.

10 Received:(On the review)

11 **Abstract:** Breast milk from a single mother was collected during a 28-weeks lactation period.
12 Bacterial diversity was studied by amplicon sequencing analysis of the V3-V4 variable region of
13 the 16S rRNA gene. *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the main phyla detected in the milk samples,
14 followed by *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The proportion of *Firmicutes* to *Proteobacteria* changed
15 considerably depending on the sampling week. A total of 411 genera or higher taxons were
16 detected in the set of samples, 63 of which had relative abundances of $\geq 1.0\%$ in at least one of the
17 samples. The most important bacterial genera detected were *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Rothia*,
18 *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Cupriavidus* and members
19 of *F. Enterobacteriaceae*. Genus *Streptococcus* was detected in all the samples, at relative abundances
20 between 2.0% and 68.8%, and it was the most abundant group in 14 of the samples. *Carnobacterium*
21 and *Lactobacillus* had low relative abundances. At genus level, bacterial diversity changed
22 considerably at certain weeks within the studied period. The weeks or periods with lowest relative
23 abundance of *Streptococcus* had more diverse bacterial compositions including genera belonging to
24 *Proteobacteria* that were poorly represented in the rest of samples.

25 **Keywords:** breast milk 1; biodiversity; lactic acid bacteria; late lactation; metagenomics

26 1. Introduction

27 Human milk is considered to be an important source of bacteria for the newborn. Many of these
28 bacteria may be human commensals or have potential probiotic effects [1]. Lactic acid bacteria, such
29 as *Lactobacillus fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, isolated from human breast milk, can be regarded
30 as potential probiotic bacteria [2-4]. Previous studies have suggested that commensal
31 coagulase-negative staphylococci and viridans streptococci found in breast milk can reduce the
32 acquisition of undesired pathogens by infants exposed to hospital environments [5]. Also, some of
33 the bacterial strains found in human milk may have a large potential to improve the mother's health
34 [6]. Furthermore, bacteria ingested during breastfeeding contribute to the development of the infant
35 gut microbiome [7]. The benefits of breastfeeding also extend to a reduction of respiratory and
36 gastrointestinal tract infections and to a correct education of the immune system, with a concomitant
37 reduction of the risks to develop several diseases such as obesity, diabetes, or inflammatory bowel
38 diseases [7-9].

39 In addition to classical studies based on isolation and identification of bacteria from human
40 milk [5], culture-independent studies have provided a large amount of information on the human
41 milk microbiota. The culture-independent approaches based on amplification and sequencing of

42 variable regions within the 16S rDNA gene, allow the detection in a single step of both aerobic and
43 anaerobic bacteria as well as bacteria that, in spite of being in a low proportion in the population,
44 may play significant roles. Recent review papers have summarized the major findings of previous
45 studies on the microbiota from human milk samples based on culture-independent approaches [10,
46 11]. Many of the studies have focused on the influence of different factors such as the mother's diet
47 and health status, maternal age, child delivery method, probiotic use, HIV infection, administration
48 of antibiotics or collection/feeding method, and involve samples from several subjects. Such studies
49 led to the proposal of a core microbiota for the human milk or at least a list of the bacterial genera
50 most frequently found [11]. Nevertheless, the influence of the lactation stage has been studied to a
51 much less extent. Cabrera-Rubio et al. [12] analyzed the milk samples from 18 women at three
52 sampling points, e.g., within 2 d after mothers gave birth in the maternity hospital (colostrum) and
53 at 1 and 6 month after delivery at home. The main results obtained after 16S rRNA gene
54 amplification and pyrosequencing indicated that that the human milk microbiome changes over
55 lactation: *Weissella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Lactococcus* were predominant in
56 colostrum samples, whereas in 1- and 6-mo milk samples the typical inhabitants of the oral cavity
57 (e.g., *Veillonella*, *Leptotrichia* and *Prevotella*) increased significantly. Khodayar-Pardo et al. [13]
58 applied quantitative PCR to study the microbial composition of milk samples collected from 322
59 mothers within the first month of exclusive breastfeeding and reported that total bacteria,
60 *Bifidobacterium* and *Enterococcus* spp. counts increased throughout the lactation period. Most of these
61 studies, however, do not report individual variations in the microbiota during the lactation period.
62 Nevertheless, it is suspected that different changes may occur at the individual level due to different
63 factors. The aim of the present study was to investigate the microbiota during the mid-to-late
64 lactation period in breast milk from a single mother and to analyse possible changes in bacterial
65 diversity during the period.

67 2. Materials and Methods

68 2.1. Sample Collection

69 Written informed consent was obtained, in accordance with the Declaration of Helsinki.
70 Samples were taken from a single female donor, suffering from asthma and overweight, during a
71 lactating period between weeks 21 and 48, inclusive, after cesarean delivery. Samples were taken
72 three times in the day, before feeding the baby. The hands of the volunteer were cleaned with soap
73 and covered with sterile gloves. Then, the nipples and surrounding areola were cleaned with cotton
74 soaked with 70% ethanol. The first drops of milk were discarded, and then 5-7 ml of milk was
75 extracted from each breast manually using a sterile manual pump (Philips Avent SCF330/20; Philips
76 Ibérica, Madrid, Spain). The milk was transferred to sterile falcon test tubes, stored at 4 °C and
77 transported on ice to the laboratory within the next 12 h, where it was stored at -20 °C until analysis.

79 2.2. DNA Extraction

80 Thawed milk samples from the same day were mixed thoroughly and centrifuged at 16000 × g
81 for 7 minutes. After removal of the supernatants, total DNA from the remaining pellets was
82 extracted with a QIAamp Stool DNA fast mini kit (Quiagen, Madrid, Spain) following the
83 manufacturer instructions. The quality and quantity of the extracted DNA was determined by

84 QuantiFluor® ONE dsDNA system (Promega, Madison, USA). The DNA was stored at -20°C until
85 analysis

86 2.3. DNA Sequencing and Analysis

87 The 16S rDNA V3-V4 regions were amplified following the Illumina Metagenomics Sequencing
88 Library Preparation protocol (Illumina, Inc., San Diego, CA). Illumina adapter overhang nucleotide
89 sequences were added to the gene-specific sequences. The following 16S rDNA gene amplicon PCR
90 primer sequences were used: forward primer:
91 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; reverse
92 primer: 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
93 [14]. Microbial genomic DNA (5 ng/ μl in 10 mM Tris pH 8.5) was used to initiate the protocol. After
94 16S rDNA gene amplification, the multiplexing step was performed using Nextera XT Index Kit
95 (Illumina). 1 μl of the PCR product was run on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size
96 (expected size ~ 550 bp). After size verification the libraries were sequenced using a 2x300 pb
97 paired-end run on a MiSeq Sequencer according to manufacturer's instructions (Illumina). Quality
98 assessment was performed by the use of prinseq-lite program [15]. The sequence data were analyzed
99 using qiime2 pipeline [16]. Denoising, paired-ends joining, and chimera depletion was performed
100 starting from paired ends data using DADA2 pipeline [17]. Taxonomic affiliations were assigned
101 using the Naive Bayesian classifier integrated in qiime2 plugins and the SILVA_release_132
102 database. Statistical analysis was carried out with SPSS software version 24 (IBM Corp., Foster City,
103 CA).

104 3. Results

105 3.1. Characteristics of Sequence Reads

106 The numbers of reads assigned to operational taxonomic units (OTUs) and the alpha diversity
107 indicators are shown in Table 1. The number of assigned reads ranged from 14 to 1375641. A few
108 samples yielded very low numbers of reads (e.g., samples corresponding to weeks 11, 15, 19 and 26
109 of the sampling period) and also yielded a very low number of observations (between 3 and 9). In
110 addition, these samples showed an abnormal bacterial composition (for example, 47.8% of the OTUs
111 in sample 11 were assigned to genus *Delftia* and 99.94% in sample 26 were assigned to genus
112 *Halomonas*). Therefore, these samples were excluded from the analysis.

113 **Table 1.** N^o of reads and alpha diversity indexes at genus level of breast milk samples at different
114 weeks (W) of the sampling period.

Sample	N ^o reads	N ^o observations	CHAO1	Shannon	Simpson
W1	111968	107	107	2.90	0.89
W2	64302	91	91	3.32	0.94
W3	106190	95	95	1.60	0.52
W4	125198	165	165	3.37	0.93
W5	145841	115	115	1.87	0.70
W6	132594	71	71	2.08	0.83
W7	145004	163	163	2.89	0.84
W8	122052	65	65	1.24	0.47

W9	151193	110	110	2.94	0.89
W10	86107	140	140	3.49	0.94
W11	3245	9	9	1.34	0.66
W12	55527	65	65	2.02	0.78
W13	138427	118	118	2.27	0.81
W14	141003	93	93	1.86	0.65
W15	143	3	3	0.32	0.14
W16	102600	102	102	2.45	0.80
W17	98764	81	81	2.00	0.68
W18	107346	1370	130	3.31	0.92
W19	140	3	3	0.62	0.37
W20	68575	90	90	2.69	0.85
W21	1375641	119	119	1.92	0.68
W22	89705	92	92	1.65	0.58
W23	116236	104	104	1.82	0.62
W24	100113	102	102	2.34	0.76
W25	97925	109	109	2.52	0.86
W26	61413	6	6	0.01	0.00
W27	105221	119	119	2.72	0.87
W28	36336	111	111	2.77	0.81

115

116 3.2. Bacterial Diversity in Breast Milk Samples

117 *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the main phyla detected in the milk samples (Figure 1A). The
 118 proportion of *Firmicutes* to *Proteobacteria* changed considerably depending on the sampling week.
 119 *Firmicutes* was most abundant in samples from weeks 1, 3, 7, 14-17 and 20-28 of the sampling
 120 period. However, *Proteobacteria* were predominant in the rest of the samples. *Actinobacteria* were the
 121 third most important group in most of the samples, followed by *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* had
 122 higher relative abundances than *Actinobacteria* in samples corresponding to weeks 6 and 10-13. The
 123 above-mentioned phyla represented between 98.0 and 99.8% of the OTUs. Other minority phyla
 124 detected were *Acidobacteria*, *Archaeplastida*, *Armatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Deferribacteres*,
 125 *Deinococcus-Thermus*, *Epsilonbacteraeota*, *FBP*, *Gemmatimonadetes*, *Patescibacteria*, *Planctomycetes*,
 126 *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* and *WPS-2*.

127 The 30 families that had relative abundances $\geq 2.5\%$ are shown in Figure 1B. These covered
 128 between 88.1 and 98.2 of OTUs. *Firmicutes* were represented mainly by Fam. *Streptococcaceae*. This
 129 group was found at relative abundances in a range from 2.0% to 68.8%. The following families were
 130 represented in many of the samples: *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae* and *Veillonellaceae*.
 131 Members of O. *Clostridiales* Family XI were detected only in a few of the samples. Unidentified
 132 members of O. *Lactobacillales* and *Carnobacteriaceae* were also relevant in some samples, with relative
 133 abundances ranging from ca. 1.5% to ca. 4.5%. *Enterobacteriaceae* were highly represented in most of
 134 the samples, ranking sometimes in first position in relative abundance. Members of
 135 *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* and *Xanthomonadaceae* were also relevant groups among the
 136 *Proteobacteria*. *Micrococcaceae* and *Weeksellaceae* were the main representatives among *Actinobacteria* and
 137 *Bacteroidetes*, respectively. The following families had relative abundances between 1.0% and 2.5% in
 138 at least one of the samples: *Actinomycetaceae*, *Lactobacillaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*,
 139 *Flavobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Aerococcaceae* and *Aeromonadaceae*. Of them, *Lactobacillaceae* only

140 were represented in two samples with relative abundances between 1.0 and 1.2%. An additional 122
141 families (or higher taxons) also found in the set of samples had relative abundances below 1.0%.
142 Most of them had very low abundances (< 0.1 or <0.01%) and were detected only in one or two
143 samples.

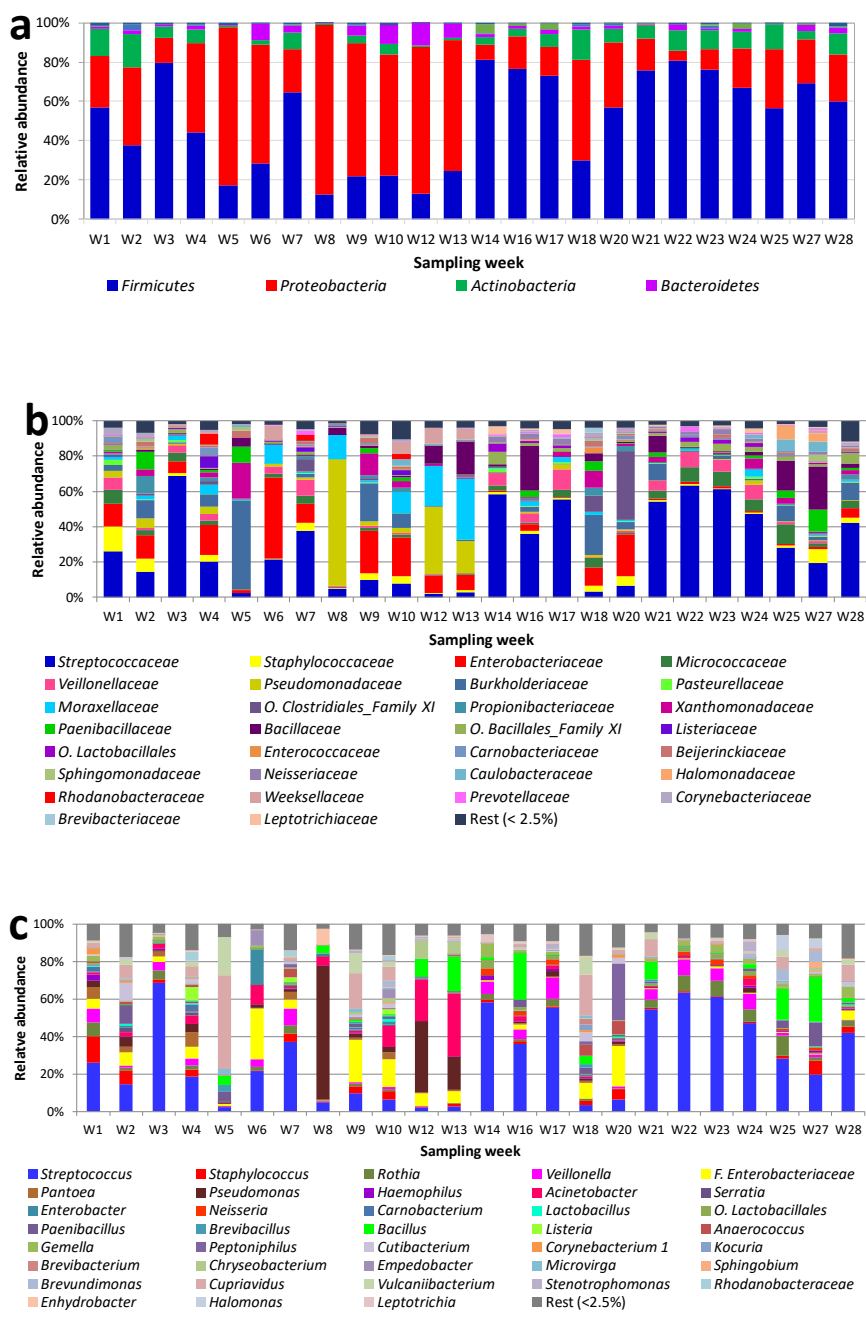
144 The 38 genera with relative abundances $\geq 2.5\%$ (representing between 81.7 and 97.5 of
145 OTUs) are shown in Figure 1C. Genus *Streptococcus* was detected in all the samples (being the most
146 abundant OTU in 14 samples), although there were large differences in its relative abundances
147 between samples. For example, genus *Streptococcus* had relative abundances that were above 50% in
148 samples from weeks 3, 14, 17 and 21-23. By contrast, the lowest relative abundances for this genus
149 were detected in samples from weeks 5, 8-13, 18 and 20. *Staphylococcus* was also detected in all breast
150 milk samples, with relative abundances from 0.3 to 14%. The genera *Carnobacterium* and *Lactobacillus*
151 had very low relative abundances. Aerobic endospore formers (*Paenibacillus*, *Brevibacillus* and
152 *Bacillus*) were detected in many of the samples, in some cases with high relative abundances. *Gemella*
153 was also detected in many samples, and *Listeria* was detected in three samples (reaching 6.8% in one
154 sample).

155 Most of the *Enterobacteriales* belonged to Fam. *Enterobacteriaceae* (Others). Members of the genera
156 *Pantoea*, *Serratia* and *Enterobacter* were also relevant in some samples (Figure 1C). Members of the
157 genera *Acinetobacter*, *Haemophilus* and *Neisseria* were also detected in some samples. *Pseudomonas* had
158 low relative abundances, except for three samples (weeks 8, 12 and 13). Remarkably, *Pseudomonas*
159 reached 71.5% in samples from week 8. Several samples showed high relative abundances of
160 members of family *Burkholderiaceae* (*Cupriavidus*), with remarkably high values at week 5. All
161 samples with a high relative abundance of *Cupriavidus* also had higher relative abundances of
162 *Vulcaniibacterium* (*Xanthomonadaceae*). Among *Actinobacteria*, the main representative was *Rothia*
163 (with relative abundances between 3 and 10% in many samples), followed by *Cutibacterium* and
164 *Corynebacterium*.

165 In addition to the main genera mentioned above, the following genera were also detected
166 (with relative abundances between 1.0% and <2.5%) in at least one of the samples: *Abiotrophia*,
167 *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Alloprevotella*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Delftia*,
168 *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Finegoldia*, *Flavobacterium*, *Granulicatella*, *Lactococcus*, *Lawsonella*,
169 *Massilia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Phenylobacterium*, *Prevotella* 7, *Rahnella*, *Rhodanobacter*,
170 *Ruminococcaceae* UCG-014, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Streptobacillus* and *Tetragenococcus*. Of
171 them, *Lactococcus* was detected at relative abundances above 1% only in two samples (1.3%, 1.6%)
172 and *Enterococcus* in one sample (1.3%). Furthermore, up to 348 additional genera or higher taxons
173 represented at relative abundances < 1.0% was also detected. Most of them had relative abundances
174 < 0.01% and were represented only in one or in a few of the samples.

175 PCoA (Figure 2) revealed a main cluster of samples together (all of them having a mid-to high
176 relative abundance of *Staphylococcus*) with at least two minor clusters (samples W8, W12, W13)
177 characterized by a very low relative abundance of OTUs belonging to genus *Streptococcus* and high
178 relative abundances of *Pseudomonas/Acinetobacter/Bacillus*, and samples W5, W9, W10, W18 (also
179 having very low relative abundances of *Streptococcus* and higher relative abundances of
180 *Cupriavidus/Vulcaniibacterium* together with other bacterial groups).

181



182

183

184

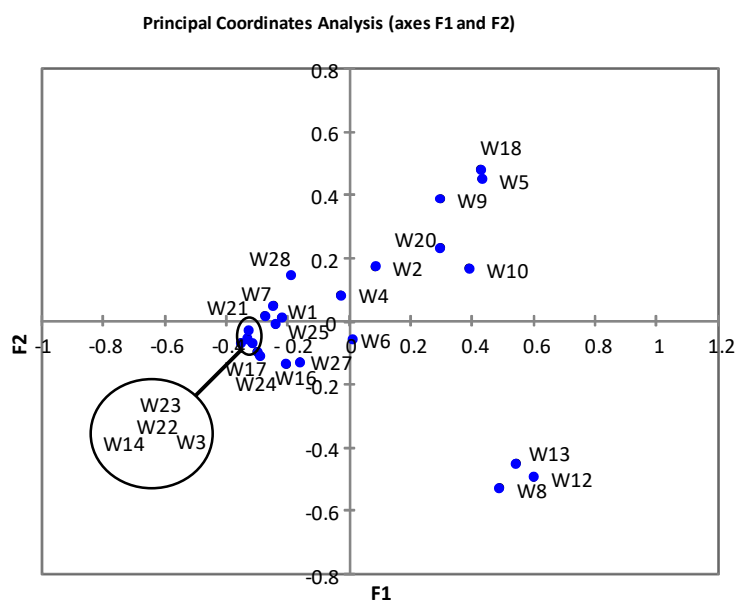
185

186

187

188

Figure 1. Bacterial diversity of breast milk samples at Phylum (a), Family (b) and Genus (c) levels. The different sampling weeks (W) are represented.



189 **Figure 2.** Principal coordinates analysis of breast milk samples taken at different weeks (W) during
 190 the sampling period.

191 4. Discussion

192 Results from the present study provided information on the changes in bacterial diversity in
 193 human milk from a single individual during the late lactating period. Many previous studies have
 194 addressed the microbial composition of human milk, but usually from a compendium of samples
 195 taken from different individuals and taken at early to mid lactating period. In a recent review paper,
 196 Zimmermann and Curtis [11] identified 44 studies investigating 3105 breast milk samples from 2655
 197 women, and reported that the most frequently found genera were *Staphylococcus*, *Streptococcus*,
 198 *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*,
 199 *Cutibacterium*, *Veillonella* and *Bacteroides*. Another review paper reported that *Streptococcus* and
 200 *Staphylococcus* appear to be widely predominant in human milk without regard to differences in
 201 geographic location or analytic methods [10].

202 Results from the present study also identified main genera reported in previous studies
 203 (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium* and *Veillonella*) in
 204 addition with other important genera. Furthermore, the microbial composition of several samples
 205 from the present study resembled in a certain way that of the children salivary microbiome reported
 206 by other authors [18] (with the following common genera: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*,
 207 *Leptotrichia*, *Haemophilus* and *Neisseria*). These results would suggest colonization of mammary
 208 glands by bacteria from the baby's mouth. As a matter of fact, human milk is considered to be
 209 colonized by bacteria from the mother's gut and skin or the infant's mouth [19, 20].

210 *Streptococcus* was the predominant OTU in 14 of the samples. Remarkably, those samples with
 211 lower relative abundances of *Streptococcus* had different microbial compositions
 212 (including *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Peptoniphilus*...). While the
 213 sequence reads obtained in the present study only allowed identification at genus level, a previous
 214 study reported the presence of the following species of *Streptococcus* in human milk: *S. mitis*, *S.*
 215 *infantis*, *S. cristatus*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* and *S. sanguinosus* [21].
 216 Streptococci may produce different types of antimicrobial substances including hydrogen peroxide,

217 organic acids and bacteriocins [22, 23]. The obtained results would suggest an ecological role of
218 *Streptococcus* in the control of microbial populations in breast milk. *Staphylococcus* was also detected
219 in all breast milk samples, with relative abundances reaching up to 14% in one sample. It has been
220 suggested that commensal coagulase-negative staphylococci and viridans streptococci from breast
221 milk could reduce the acquisition of undesired pathogens by infants, especially when exposed to
222 hospital environments [5, 24].

223 Contrary to other studies, *Lactobacillus* had low relative abundance in the studied milk samples,
224 and other related genera (*Enterococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*) represented less than 2%.
225 *Carnobacterium* was represented in two samples (2.1-3.8%). *Carnobacterium* has seldom been reported
226 in human milk. One study reported that the presence of *Carnobacterium* in milk was associated with
227 cesarean delivery [25], which is in agreement with the delivery procedure in the present study.
228 *Carnobacterium* could be a new, largely unexplored candidate for novel probiotic bacteria in human
229 milk.

230 Aerobic endosporeformers of the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* were also important in
231 several milk samples. Remarkably, genus *Bacillus* reached ca. 25% relative abundance in two
232 samples (weeks 16 and 27). Ding et al., [26] reported the presence of *Bacillus* in 87% of the studied
233 breast milk samples while Dahaban et al. [27]. and Boix-Amoros et al. [21] reported the presence of
234 this bacterium in 17% and in 7% of the milk samples, respectively. Cacho et al. [28] reported a
235 relative abundance of < 1% for *Bacillus*. Patel et al. [29] reported both the presence of *Bacillus* and
236 *Paenibacillus* in human milk, but *Bacillus* was associated with subacute or acute mastitis. However,
237 during the sampling period of the present study, the mother did not report any signs of mastitis.

238 At least 8 of the milk samples from the present study showed high relative abundances of
239 *Cupriavidus*. Members of genus *Cupriavidus* have been isolated from multiple ecological niches,
240 including untreated drinking water, urban pond water, agricultural soil, soil contaminated with
241 heavy metals, soil containing natural asphalt, plants, and human clinical samples [30]. In particular,
242 the species *C. gilardii* is gaining increasing attention as an emerging multi-drug resistant pathogen
243 [30]. All the samples with a high relative abundance of *Cupriavidus* also had higher relative
244 abundances of *Vulcaniibacterium*. *Vulcaniibacterium* is a moderately thermophylic bacterium
245 associated with geothermally-heated environments [31]. Recent studies, however, reported that
246 *Vulcaniibacterium* was a member of the bacterial community of human milk [26] and the digestive
247 gland of Pacific oyster [32]. The possible meaning of this bacterium in the human milk samples also
248 having high relative abundances of *Cupriavidus* is unknown. Nevertheless, it has been suggested that
249 the environment, utensils and water could contribute considerably to the microbiota detected in
250 breast milk [6]. It is also worth mentioning that the baby was already in the weaning period. It is
251 tempting to suggest that possible transfer of microbiota from the baby to the mother could also
252 account for some of the changes in the microbiota observed along the studied period.

253 The results from the present study also indicated the presence of representatives from a large
254 number of bacterial genera, although most of them had very low relative abundances and were
255 represented in only a few samples. Tentatively, these results would reflect environmental
256 contaminants. Nevertheless, ingestion of a diverse microbiota during the early months of life could
257 be important for training of the baby's immune system and possibly also for shaping his/her
258 intestinal microbiota.

259

260 5. Conclusions

261 In conclusion, results from the present study reveal major changes in the microbiota of breast milk
262 during breast feeding period. The main changes include a decrease in the relative abundance of
263 *Staphylococcus* and an increase of other microbial groups belonging to phylum *Proteobacteria*. The
264 transient decrease in the ratio *Firmicutes/Proteobacteria* could be considered as an alteration of the
265 normal microbiota of the milk.

266 **Author Contributions:** W.M.-G. Conceptualization, investigation, writing-review & editing. M.J.G.
267 Methodology, supervision, writing-review & editing. R.P.P. Investigation. R.L. Conceptualization, supervision,
268 writing-review & editing. A.G. Conceptualization, funding acquisition, formal analysis, writing—original draft,
269 review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

270 **Funding:** The University of Jaén (grant Estructura AGR-230) provided financial support for this research.
271 Action co-financed by the European Union through the Operational Program of European Regional
272 Development Fund (ERDF) of Valencia Region (Spain) 2014-2020.

273 **Acknowledgments:** Wendy Marin acknowledges the financial support of ISA University and MESCYT for
274 pursuing her Ph.D.

275 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest

276 References

- 277 1. Heikkilä, M.P.; Saris, P.E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J.*
278 *Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 471–478.
- 279 2. Asan-Ozusaglam M.1.; Gunyakti A. *Lactobacillus fermentum* strains from human breast milk with probiotic
280 properties and cholesterol-lowering effects. *Food Sci. Biotechnol.* **2018**, *16*;28(2), 501-509. doi:
281 10.1007/s10068-018-0494-y. eCollection 2019 Apr.
- 282 3. Cabrera-Rubio, R.; Mira-Pascual, L.; Mira, A. Collado, M.C. Impact of mode of delivery on the milk
283 microbiota composition of healthy women. *J. Dev. Orig. Health* **2016**, *7*, 54–60. doi: 10.1017/S2040174415001397.
- 284 4. Jost, T.; Lacroix, C.; Braegger, C.; Chassard, C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on
285 neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.* **2015**, *73*, 426–437. doi: 10.1093/nutrit/nuu016.
- 286 5. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. The human
287 milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*(1), 1-10. doi:
288 10.1016/j.phrs.2012.09.001.
- 289 6. Fernández, L.; Rodríguez, J.M. Human Milk Microbiota: Origin and Potential Uses. *Nestle Nutr. Inst*
290 *.Workshop Ser.* **2020**, *13*;94, 1-11. doi: 10.1159/000505031.
- 291 7. Pannaraj, P.S; Li, F.; Cerini, C.; Bender, J.M.; Yang, S.; Rollie, A.; Adisetiyo, H.; Zabih, S.; Lincez,
292 P.J.; Bittinger, K.; Bailey, A.; Bushman, F.D.; Sleasman, J.W.; Aldrovandi, G.M. Association Between Breast
293 Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut. *JAMA Pediatr.* **2017**, *171*(7),
294 647-654. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378
- 295 8. Bäckhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-Datchary, P.; Li, Y.; Xia, Y.; Xie, H.; Zhong,
296 H.; Khan, M.T.; Zhang, J.; Li, J.; Xiao, L.; Al-Aama, J.; Zhang, D.; Lee, Y.S.; Kotowska, D.; Colding, C.; Tremaroli,
297 V.; Yin, Y.; Bergman, S.; Xu, X.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Dahlgren, J.; Wang, J. Dynamics and stabilization of
298 the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*(5),690-703. doi:
299 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- 300 9. Li, N.; Pang, B.; Liu, G.; Zhao, X.; Xu, X.; Jiang, C.; Yang, B.; Liu, Y.; Shi, J. *Lactobacillus rhamnosus*
301 from human breast milk shows therapeutic function against foodborne infection by multi-drug resistant
302 *Escherichia coli* in mice. *Food Funct.* **2020**, *29*;11(1), 435-447. doi: 10.1039/c9fo01698h.
- 303 10. Fitzstevens, J.L.; Smith, K.C.; Hagadorn, J.I.; Caimano, M.J.; Matson, A.P.; Brownell, E.A. Systematic
304 Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr. Clin. Pract.* **2017**, *32*(3), 354-364. doi: 10.1177/0884533616670150.
- 305 11. Zimmermann, P.; Curtis, N. Breast milk microbiota: A complex microbiome with multiple impacts and
306 conditioning factors. *J Infect.* **2020**, (in press). doi: 10.1016/j.jinf.2020.01.023
- 307 12. Cabrera-Rubio, R.; Collado, M.C.; Laitinen, K.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Mira, A. The human milk
308 microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.*
309 **2012**, *96* (3), 544-551.

- 310 13. Khodayar-Pardo, P.; Mira-Pascual, L.; Collado, M.C.; Martínez-Costa, C. Impact of lactation stage,
311 gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J. Perinatol.* **2014**, *34*(8):599-605.
- 312 14. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, FO. Evaluation of
313 general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity
314 studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*(1), e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- 315 15. Schmieder, R.; Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*
316 **2011**, *27*, 863-864. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026.
- 317 16. Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C. A.; Turnbaugh, P. J.; Fierer, N.
318 Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
319 **2011**, *108*, 4516-4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107.
- 320 17. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2:
321 High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581-583. doi:
322 10.1038/nmeth.3869.
- 323 18. Mashima, I.; Theodorea, C.F.; Thaweboon, B.; Thaweboon, S.; Scannapieco, F.A.; Nakazawa, F. Exploring
324 the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLoS ONE* **2017**, *12* (9): e0185274. doi:
325 10.1371/journal.pone.0185274
- 326 19. Makino, H.; Kushiro, A.; Ishikawa, E.; Kubota, H.; Gawad, A.; Sakai, T.; Oishi, K.; Martin, R.; Ben-Amor,
327 K.; Knol, J.; Tanaka, R.. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the
328 early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS ONE* **2013**, *8*(11): e78331. doi:
329 e78331 10.1371/journal.pone.0078331
- 330 20. Rodríguez, J.M. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during
331 late pregnancy and lactation? *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 779-784. DOI: 10.3945/an.114.007229
- 332 21. Boix-Amoros, A.; Collado, M.C.; Mira, A.; Relationship between milk microbiota, bacterial load,
333 macronutrients, and human cells during lactation. *Front. Microbiol* **2016**, *7*, 492 .
- 334 22. Wescombe, P.A.; Heng N.C; Burton, J.P.; Chilcott, C.N.; Tagg, J.R. Streptococcal bacteriocins and the case
335 for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiol.* **2009**, *4*(7), 819-35. doi: 10.2217/fmb.09.61.
- 336 23. Herrero, E.R.; Slomka, V.; Bernaerts, K.; Boon, N.; Hernandez-Sanabria, E.; Passonial, BB; Quiryryn M,
337 Teughels W. Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors. *J. Dent.*
338 **2016**, *47*, 23-33. doi: 10.1016/j.jdent.2016.02.007.
- 339 24. Park, B.; Iwase, T.; Liu, G.Y. Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by
340 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25880.
- 341 25. Cabrera-Rubio, R.; Collado, M.C.; Laitinen, K.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Mira, A. The human milk
342 microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.*
343 **2012**; *96*, 544-51.
- 344 26. Ding, M.; Qi, C.; Yang, Z.; Jiang, S.; Bi, Y.; Lai, J.; Sun, J. Geographical location specific composition of
345 cultured microbiota and *Lactobacillus* occurrence in human breast milk in China. *Food Funct.* **2019**, *10*, 554-64.
346 doi: 10.1039/C8FO02182A
- 347 27. Dahaban, N.M.; Romli, M.F.; Roslan, N.R.; Kong, S.S.; Cheah, F.C. Bacteria in expressed breastmilk from
348 mothers of premature infants and maternal hygienic status. *Breastfeeding Med.* **2013**, *8*, 422-3 .
- 349 28. Cacho, N.T.; Harrison, N.A.; Parker, L.A.; Padgett, K.A.; Lemas, D.J.; Marcial, G.E.; Li, N.; Carr, L.E.;
350 Neu, J.; Lorca, G.L. Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Front.*
351 *Microbiol* **2017**, *8*, 1470. doi: 10.3389/fmicb.2017.01470
- 352 29. Patel, S.H.; Vaidya, Y.H.; Patel, R.J.; Pandit, R.J.; Joshi, C.G.; Kunjadiya, A.P.; Culture independent
353 assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7804.
- 354 30. Ruiz, C.; McCarley, A.; Espejo, M.L.; Cooper, K.K.; Harmon, D.E. 2019. Comparative genomics reveals a
355 well-conserved intrinsic resistome in the emerging multidrug-resistant pathogen *Cupriavidus gilardii*. *mSphere*
356 **2019**, *4*:e00631-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00631-19>.
- 357 31. Niu, X.K.; Narsing Rao M.P.; Dong, Z.Y.; Kan, Y.; Li, Q.R.; Huang, J.; Zhao, L.; Wang, M.Z.; Shen, Z.P.;
358 Kang, Y.Q.; Li, W.; *Vulcaniibacterium gelatinicum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a
359 hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*(3),1571-1577. doi: 10.1099/ijsem.0.003934
- 360 32. King, W.L.; Siboni, N.; Kahlke, T.; Dove, M.; O'Connor, W.; Mahbub, K.R.; Jenkins, C.; Seymour, J.R.;
361 Labbate M. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial
362 community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2020**, *28*. pii: fiae054. doi: 10.1093/femsec/fiae054.
- 363

364 1. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

365

4.6 ANEXOS

ANEXO 1

Recuento de microorganismos por muestra en los diferentes medios de cultivo

Semana	Muestra	TSA (UFC)	VJ (UFC)	EMB (UFC)	ELLIKER (UFC)	MRS (UFC)
1	1	7.10×10^2	5.60×10^2	1.00×10^2	1.01×10^3	1.38×10^3
	2	1.79×10^3	1.00×10^2	0	1.12×10^3	1.39×10^3
	3	2.99×10^3	2.50×10^2	0	1.51×10^3	9.60×10^2
2	4	1.15×10^3	1.30×10^2	1.00×10^1	9.40×10^2	5.20×10^2
	5	3.90×10^3	5.10×10^2	3.10×10^2	2.39×10^3	1.09×10^3
	6	1.03×10^3	1.10×10^2	3.00×10^1	9.60×10^2	3.20×10^2
3	7	2.56×10^3	7.70×10^2	5.00×10^1	2.23×10^3	5.40×10^2
	8	2.14×10^3	2.40×10^2	0	2.05×10^3	6.60×10^2
	9	1.36×10^3	1.60×10^2	0	3.80×10^2	3.40×10^2
4	10	5.50×10^3	1.20×10^2	4.00×10^1	3.80×10^2	3.60×10^2
	11	5.40×10^3	1.70×10^2	8.00×10^1	4.80×10^2	2.20×10^2
	12	2.53×10^3	1.51×10^3	0	3.90×10^3	2.02×10^3
5	13	2.98×10^3	5.80×10^2	1.60×10^2	1.01×10^3	9.50×10^2
	14	2.20×10^3	5.00×10^1	7.00×10^1	9.00×10^2	3.70×10^2
	15	5.80×10^3	2.40×10^2	2.10×10^2	4.40×10^3	2.78×10^3
6	16	2.76×10^3	6.00×10^1	9.00×10^1	2.65×10^3	1.98×10^3
	17	1.97×10^3	2.00×10^1	4.00×10^1	1.92×10^3	1.70×10^3
	18	2.65×10^3	3.00×10^1	7.00×10^1	2.38×10^3	2.21×10^3
7	19	1.41×10^3	7.00×10^1	1.30×10^2	5.10×10^2	5.50×10^2
	20	1.51×10^3	1.60×10^2	2.00×10^1	5.90×10^2	6.00×10^2
	21	1.14×10^3	8.00×10^1	1.00×10^1	8.60×10^2	3.80×10^2
8	22	1.85×10^3	1.40×10^2	1.00×10^1	1.26×10^3	1.31×10^3
	23	1.52×10^4	1.50×10^2	4.00×10^1	5.20×10^3	2.74×10^3
	24	1.65×10^3	1.90×10^2	2.00×10^1	1.37×10^3	7.90×10^2
9	25	4.20×10^3	1.10×10^2	2.00×10^1	1.19×10^3	2.99×10^3
	26	2.38×10^3	1.20×10^2	1.00×10^1	2.98×10^3	2.97×10^3
	27	1.69×10^3	1.50×10^2	3.00×10^1	1.54×10^3	5.40×10^2
10	28	9.70×10^3	9.0×10^1	4.00×10^1	2.99×10^3	1.67×10^3
	29	2.98×10^3	0	4.00×10^1	1.81×10^3	9.70×10^2
	30	1.93×10^4	1.20×10^2	1.00×10^1	2.98×10^3	3.70×10^3
11	31	2.29×10^3	5.00×10^1	0	1.44×10^3	3.60×10^2
	32	6.10×10^3	8.00×10^1	4.00×10^1	3.10×10^3	3.30×10^3
	33	2.21×10^3	6.00×10^1	2.00×10^1	2.41×10^3	1.04×10^3

Semana	Muestra	TSA (UFC)	VJ (UFC)	EMB (UFC)	ELLIKER (UFC)	MRS (UFC)
12	34	6.30×10^3	8.00×10^1	0	5.80×10^3	2.60×10^3
	35	5.40×10^3	6.00×10^1	6.00×10^1	5.40×10^3	2.40×10^3
	36	1.20×10^3	3.00×10^1	4.00×10^1	1.58×10^3	6.70×10^2
13	37	1.19×10^4	0	9.00×10^1	6.60×10^3	8.80×10^3
	38	1.82×10^4	0	0	4.60×10^3	4.78×10^3
	39	3.20×10^3	0	0	2.99×10^3	3.10×10^3
14	40	5.60×10^3	0	4.00×10^1	7.70×10^3	2.90×10^3
	41	8.20×10^3	0	2.00×10^1	4.90×10^3	9.40×10^2
	42	6.20×10^3	0	0	4.70×10^3	1.00×10^2
15	43	6.30×10^3	8.00×10^1	3.00×10^1	5.80×10^3	2.60×10^3
	44	5.40×10^3	6.00×10^1	6.00×10^1	5.40×10^3	2.40×10^3
	45	1.20×10^3	3.00×10^1	4.00×10^1	1.58×10^3	6.70×10^2
16	46	1.19×10^4	0	9.00×10^1	6.60×10^3	8.00×10^1
	47	1.82×10^4	0	0	4.60×10^3	7.80×10^2
	48	3.20×10^3	0	0	2.99×10^3	1.00×10^2
17	49	5.60×10^3	0	4.00×10^1	7.70×10^3	2.90×10^2
	50	8.20×10^3	0	2.00×10^1	4.90×10^3	9.40×10^2
	51	6.20×10^3	0	0	4.70×10^3	1.00×10^2
18	52	4.7×10^2	0	0	6.50×10^2	4.10×10^2
	53	2.4×10^2	0	0	3.70×10^2	1.90×10^2
	54	3.5×10^2	0	0	4.20×10^2	1.20×10^2
19	55	5.0×10^2	2.00×10^1	0	5.60×10^2	4.70×10^2
	56	4.8×10^2	0	1.00×10^1	4.50×10^2	2.30×10^2
	57	2.1×10^2	0	0	2.20×10^2	8.00×10^1
20	58	8.9×10^2	0	0	7.70×10^2	3.20×10^2
	59	4.5×10^2	5.00×10^1	0	2.10×10^2	8.00×10^1
	60	1.43×10^3	4.00×10^1	0	1.66×10^3	5.40×10^2
21	61	4.90×10^3	4.00×10^1	0	4.70×10^3	2.60×10^3
	62	4.10×10^3	0	0	4.40×10^3	2.60×10^3
	63	7.8×10^2	0	0	1.54×10^3	4.80×10^2
22	64	3.30×10^3	0	0	2.15×10^3	2.45×10^3
	65	4.90×10^3	2.00×10^1	0	1.10×10^3	1.04×10^3
	66	7.20×10^3	9.00×10^1	0	4.10×10^3	3.60×10^3
23	67	4.90×10^3	4.00×10^1	0	4.40×10^3	2.47×10^3
	68	1.36×10^3	5.00×10^1	0	1.19×10^3	7.90×10^2
	69	8.30×10^3	3.00×10^1	0	2.56×10^3	1.73×10^3
24	70	1.46×10^3	0	0	1.34×10^3	1.32×10^3
	71	8.30×10^3	8.00×10^1	0	4.50×10^3	2.50×10^3
	72	9.90×10^3	0	0	4.60×10^3	4.30×10^3

Semana	Muestra	TSA (UFC)	VJ (UFC)	EMB (UFC)	ELLIKER (UFC)	MRS (UFC)
25	73	3.90×10^3	0	0	5.10×10^3	1.83×10^3
	74	9.80×10^3	0	0	6.40×10^3	3.20×10^3
	75	1.16×10^4	0	0	1.05×10^4	3.70×10^3
26	76	2.27×10^3	0	0	1.33×10^3	1.49×10^3
	77	1.63×10^3	1.00×10^2	0	1.32×10^3	1.03×10^3
	78	6.00×10^3	0	0	3.20×10^3	3.10×10^3
27	79	7.4×10^2	0	0	4.60×10^2	5.90×10^2
	80	4.6×10^2	0	0	2.10×10^2	2.90×10^2
	81	1.18×10^3	0	0	1.06×10^3	1.14×10^3
28	82	9.7×10^2	0	0	8.10×10^2	8.50×10^2
	83	1.08×10^3	0	0	8.30×10^2	9.80×10^2
	84	1.16×10^3	0	0	9.60×10^2	1.04×10^3

ANEXO 2

Log (UFC/mL) por semana en los diferentes medios de cultivo

Semana/ Promedio	TSA	VJ	EMB	ELLIKER	MRS
1	1.83E+03	2.73E+02	3.33E+01	1.21E+03	1.24E+03
2	2.03E+03	2.50E+02	1.17E+02	1.43E+03	6.43E+02
3	2.02E+03	3.90E+02	1.67E+01	1.55E+03	5.13E+02
4	1.21E+03	6.00E+02	4.00E+01	1.59E+03	8.67E+02
5	1.10E+04	8.70E+02	4.40E+02	6.31E+03	4.10E+03
6	7.38E+03	1.10E+02	2.00E+02	6.95E+03	5.89E+03
7	1.35E+03	1.03E+02	5.33E+01	6.53E+02	5.10E+02
8	6.23E+03	1.60E+02	2.33E+01	2.61E+03	1.61E+03
9	2.76E+03	1.27E+02	2.00E+01	1.90E+03	2.17E+03
10	1.07E+04	7.00E+01	3.00E+01	4.93E+03	3.45E+03
11	1.02E+04	6.33E+01	2.00E+01	2.65E+03	3.23E+03
12	1.10E+04	5.67E+01	3.33E+01	5.26E+03	2.89E+03
13	1.44E+04	0.00E+00	3.00E+01	4.73E+03	5.56E+03
14	1.00E+04	0.00E+00	2.00E+01	5.77E+03	1.31E+03
15	1.10E+04	5.67E+01	4.33E+01	4.26E+03	2.56E+03
16	1.11E+04	0.00E+00	3.00E+01	4.73E+03	2.32E+03
17	1.00E+04	0.00E+00	2.00E+01	5.77E+03	3.44E+03
18	2.35E+03	0.00E+00	0.00E+00	1.48E+03	1.24E+03
19	1.73E+03	0.00E+00	0.00E+00	1.41E+03	1.29E+03
20	1.92E+03	3.00E+01	0.00E+00	1.55E+03	1.31E+03
21	3.26E+03	1.33E+01	0.00E+00	3.55E+03	2.23E+03
22	5.13E+03	3.67E+01	0.00E+00	2.45E+03	2.36E+03
23	4.85E+03	4.00E+01	0.00E+00	2.72E+03	2.00E+03
24	6.55E+03	2.67E+01	0.00E+00	3.48E+03	2.71E+03
25	8.43E+03	0.00E+00	0.00E+00	7.33E+03	2.91E+03
26	3.30E+03	3.33E+01	0.00E+00	1.95E+03	1.87E+03
27	4.85E+03	4.00E+01	0.00E+00	2.72E+03	2.00E+03
28	6.55E+03	2.67E+01	0.00E+00	3.48E+03	2.71E+03

ANEXO 3

Análisis de varianza, resultados obtenidos en TSA, MRS y ELLIKER

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
TSA	28	173060	6180.71429	15578988.8
MRS	28	64936.6667	2319.16667	1800606.28
ELLIKER	28	94410	3371.78571	3673165.01

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	223156608	2	111578304	15.8998113	1.4969E-06	3.10931055
Dentro de los grupos	568424521	81	7017586.68			
Total	791581130	83				

Prueba HSD Tukey

HSD[.05]=1754.93;
 HSD[.01]=2204.76
 M1 vs M2 P<.05
 M1 vs M3 P<.01
 M2 vs M3 no-significativo

M1 = promedio de muestra 1
 M2 = promedio de muestra 2
 and so forth.

HSD = diferencia absoluta entre los promedios de cualquiera de las muestras requerida para obtener una diferencia significativa en algún nivel. HSD[.05] para un nivel de .05. HSD[.01] para un nivel de .01.

ANEXO 4

Identificación bacteriana a nivel morfológico

Muestra Leche Materna	Cepas Aisladas Gram Positivas	Cepas Aisladas Gram Negativas
1	7	2
2	9	0
3	8	1
4	12	0
5	13	0
6	8	0
7	9	0
8	8	0
9	7	0
10	6	0
11	9	1
12	8	0
13	8	1
14	6	1
15	12	0
16	9	0
17	8	1
18	7	0
19	11	0
20	11	0
21	9	0
22	9	0
23	4	0
24	9	0
25	6	1
26	5	0
27	5	0
28	6	0
29	4	0
30	8	0
31	5	0

Muestra Leche Materna	Cepas Aisladas Gram Positivas	Cepas Aisladas Gram Negativas
32	11	0
33	7	1
34	10	0
35	8	0
36	10	0
37	5	1
38	5	0
39	7	0
40	7	0
41	8	0
42	5	1
43	7	0
44	8	0
45	11	0
46	5	0
47	5	0
48	5	0
49	6	0
50	6	0
51	6	0
52	4	0
53	4	0
54	4	0
55	4	0
56	2	0
57	4	0
58	2	0
59	4	0
60	4	0
61	4	0
62	4	0
63	4	0
64	4	0
65	4	0
66	7	0
67	2	0

Muestra Leche Materna	Cepas Aisladas Gram Positivas	Cepas Aisladas Gram Negativas
68	3	0
69	4	0
70	2	0
71	4	1
72	7	0
73	5	1
74	8	0
75	8	0
76	9	0
77	4	0
78	8	0
79	7	2
80	8	1
81	10	0
82	9	1
83	8	0
84	7	1

Semana	Cepas Aisladas Gram Positivas	Cepas Aisladas Gram Negativas
1	24	3
2	33	0
3	24	0
4	23	1
5	26	2
6	24	1
7	31	0
8	22	0
9	16	1
10	18	0
11	23	1
12	28	0
13	17	1
14	20	1
15	26	0

Semana	Cepas Aisladas Gram Positivas	Cepas Aisladas Gram Negativas
16	15	0
17	18	0
18	12	0
19	10	0
20	10	0
21	12	0
22	15	0
23	9	0
24	13	1
25	21	1
26	21	0
27	25	3
28	24	2

ANEXO 5

Identificación morfológica por semana

Semana	Coco	Bacilo	Levadura
1	25	2	0
2	32	1	0
3	24	0	0
4	18	6	0
5	19	9	0
6	18	6	1
7	24	7	0
8	15	7	0
9	14	3	0
10	17	1	0
11	12	12	0
12	13	15	0
13	12	6	1
14	19	2	0
15	24	2	0
16	7	8	0
17	10	8	0
18	10	2	0
19	7	3	0
20	8	2	1
21	10	4	0
22	12	3	0
23	6	3	0
24	5	9	0
25	7	15	0
26	14	7	0
27	19	8	1
28	19	7	0

ANEXO 6

Ensayo en gota de producción de sustancias con actividad antibacteriana

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	-	+	+	-
4	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	-
6	+	+	+	-	+
7a	-	-	+	-	-
7b	+	+	+	-	+
8	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+
10	-	-	+	-	-
11	+	+	-	-	+
12	-	-	+	+	-
13	+	+	+	-	+
14	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+
16	-	-	+	-	-
17	+	+	+	+	+
18	-	-	+	+	-
19	+	+	+	-	+
20	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+
22	-	-	+	+	-
23	+	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-
25	+	+	+	-	+
26	-	-	+	+	-
27	+	+	+	-	+
28	-	-	+	+	-
29	+	+	+	-	+
30	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	+
32	-	-	+	-	-
33	+	+	+	+	+
34	-	-	+	+	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
35	+	+	+	-	+
36	-	-	-	+	+
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	+
39	-	-	-	+	-
40	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-
42	-	+	+	-	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+
45	-	-	-	-	+
46	-	-	-	-	-
47	-	+	-	-	+
48	-	-	-	-	-
50	-	+	-	-	+
51	-	-	-	+	+
52	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-
54	-	+	-	+	-
55	-	-	-	+	-
56	-	-	-	+	+
57	+	+	+	-	+
58	-	+	+	+	+
59	-	+	-	-	-
60	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+
62	+	+	-	-	+
63	-	+	+	-	+
64	-	-	-	-	-
65	+	-	-	-	-
66	+	+	+	-	+
67	-	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-
69	-	+	+	-	+
70	-	+	-	-	+
71	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-
73	-	+	-	-	+
74	-	+	+	+	+
75	-	+	+	-	+
76	-	+	-	+	+
77	-	-	-	-	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
78	-	-	+	-	-
79	-	-	-	-	-
80	+	+	+	+	+
81	+	+	+	+	+
16b	+	-	-	-	+
17b	+	+	-	-	+
18b	-	+	-	-	+
19b	+	+	+	-	-
20b	+	+	-	+	-
21b	-	+	+	+	+
82	-	+	-	+	-
83	-	-	-	-	-
85	-	-	+	-	-
86	+	+	+	+	+
87	-	-	-	-	-
88	+	-	-	+	-
89	-	-	-	+	-
90	-	-	-	-	-
91	-	+	-	-	-
92	+	+	-	+	+
93	-	-	-	-	-
94	-	+	-	-	-
95	+	+	-	+	+
96	-	+	+	+	+
97	+	-	+	-	-
98	-	-	+	+	-
99	-	+	+	+	+
100	-	+	+	+	+
101	-	-	+	-	-
102	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-
104	-	-	+	-	-
105	-	-	-	-	+
a1	-	-	-	-	+
a2	-	+	-	-	+
a3	+	+	+	-	+
a4	-	-	-	-	-
a5	+	-	+	-	+
a6	+	+	+	-	+
a7	-	-	-	-	-
a8	+	-	-	-	-
a9	-	+	+	-	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
a10	-	+	+	+	+
a11	-	-	-	-	-
a12	+	+	+	+	+
a13	-	-	-	-	-
a14	-	-	-	-	-
106	+	-	+	+	+
107	+	+	-	+	+
108	+	+	+	-	+
109	+	+	+	-	+
110	-	-	-	-	-
111	+	+	+	+	+
112	+	+	+	+	+
113	-	+	+	-	+
114	+	+	-	-	+
115	-	+	-	-	+
116	-	+	+	+	+
117	-	-	+	-	+
118	-	+	+	+	+
119	+	-	+	+	+
120	+	+	+	+	+
121	+	+	+	+	-
122	+	+	+	-	+
123	+	+	+	-	+
124	-	-	-	-	-
125	+	+	+	+	-
126	-	+	-	+	+
127	+	+	-	+	+
128	-	-	-	-	-
129	-	-	+	-	+
130	+	-	-	+	-
131	+	-	+	-	+
132	+	+	-	-	+
133	-	+	+	+	+
134	+	-	+	+	+
135	+	+	-	+	-
136	+	+	-	+	+
137	+	+	-	+	+
138	-	+	-	-	-
139	-	-	-	+	-
140	-	-	-	-	-
141	-	+	-	+	-
142	+	-	-	-	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
143	-	+	-	-	-
144	-	-	-	-	-
145	-	-	-	-	-
146	-	-	-	-	-
147	-	+	-	-	+
148	-	-	-	-	+
149	+	+	-	+	+
150	-	+	-	+	+
151	-	-	-	-	+
152	-	-	-	-	+
153	-	+	-	+	-
154	-	+	-	+	+
155	+	+	-	+	+
156	+	+	-	+	+
157	+	+	-	+	+
158	-	+	+	+	+
159	-	-	-	+	+
160	+	+	+	+	+
161	-	-	+	+	+
162	-	-	+	-	+
163	+	-	+	-	+
164	-	+	-	+	+
165	-	-	+	+	+
166	+	+	-	+	+
167	+	+	+	+	+
168	+	+	-	+	+
169	+	+	-	+	+
170	+	+	-	+	+
171	-	-	+	+	+
172	-	+	-	+	+
173	-	-	-	-	-
174	-	+	-	+	+
175	-	-	-	-	+
176	-	-	-	-	-
177	+	+	+	-	+
178	-	+	+	+	+
179	+	+	-	+	+
180	+	+	-	+	+
181	-	+	+	+	+
182	-	-	-	+	+
183	-	-	-	-	-
184	-	-	-	-	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
185	-	-	-	-	-
186	-	+	-	+	+
187	+	+	+	+	+
188	-	+	+	+	+
189	+	+	-	+	+
190	-	-	+	+	-
191	-	+	-	+	+
192	-	-	-	-	-
193	+	+	-	+	+
194	-	+	+	+	+
195	-	-	-	-	-
196	-	+	+	-	-
197	-	+	-	+	+
198	+	+	+	+	+
199	+	-	-	+	+
200	-	-	+	+	+
201	-	+	-	-	+
202	-	+	+	+	+
203	-	+	-	+	+
204	-	+	+	+	+
205	-	-	-	+	+
206	-	+	-	-	+
207	-	+	-	-	+
208	-	-	-	+	+
209	+	-	-	-	+
210	-	-	-	-	-
211	-	+	-	-	+
212	+	-	+	-	-
213	+	-	-	+	-
214	+	+	+	+	+
215	-	-	-	-	-
216	-	+	-	-	+
217	-	-	+	+	+
218	-	-	-	-	-
219	-	-	-	+	-
220	-	-	-	+	-
221	-	+	-	+	+
222	+	+	+	+	+
223	+	+	-	-	+
224	+	-	-	-	+
225	-	-	-	-	-
226	-	-	-	-	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
227	+	+	-	+	+
228	+	-	-	-	-
229	-	-	-	-	-
230	-	-	-	+	-
231	+	+	-	-	+
232	-	-	-	-	-
233	-	-	-	-	-
234	+	+	+	-	+
235	-	-	-	-	-
236	+	-	-	-	-
237	+	+	-	+	+
238	-	-	-	-	-
239	+	+	-	+	+
240	-	-	-	-	-
241	+	+	-	-	+
242	-	-	-	-	+
243	+	+	-	+	-
244	+	+	-	+	+
245	+	-	+	-	-
246	+	-	-	-	-
247	-	-	-	-	-
248	-	-	-	+	-
249	-	-	-	-	-
250	+	-	+	+	-
251	+	-	-	+	+
252	-	-	-	+	+
253	-	+	-	-	+
254	+	+	+	+	-
255	+	+	-	+	-
256	-	-	-	-	+
257	-	-	-	-	+
258	+	+	+	+	+
259	+	-	+	-	-
260	+	-	-	-	+
261	+	+	+	+	+
262	+	+	-	+	+
263	+	+	+	-	+
264	-	-	-	-	-
265	+	-	+	+	+
266	+	+	+	+	+
267	+	-	-	-	-
268	+	-	-	-	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
269	-	-	-	-	-
270	+	+	+	+	+
271	-	-	-	+	-
272	+	-	-	-	-
273	+	+	+	-	+
274	-	+	-	-	+
275	+	+	+	+	+
276	+	+	+	+	+
277	+	+	+	-	+
278	+	-	-	-	-
279	-	-	+	-	-
280	+	+	+	+	-
281	+	-	-	-	-
282	-	+	-	+	+
283	-	+	-	-	+
284	-	-	+	-	-
285	-	-	+	-	-
286	-	+	+	+	+
287	-	+	+	-	+
288	+	-	-	-	-
289	-	-	-	-	+
290	-	-	-	-	-
291	-	+	+	+	+
292	-	-	-	-	-
293	-	-	-	+	-
294	-	-	-	+	-
295	-	-	-	+	-
296	-	-	-	+	-
297	-	-	-	+	-
298	-	-	-	+	-
299	-	-	-	+	-
300	-	-	-	+	-
301	-	-	-	+	-
302	-	-	-	+	-
303	-	-	-	+	-
304	-	-	-	+	-
305	-	-	-	+	-
306	-	-	-	+	+
307	-	-	-	+	-
308	+	-	-	+	+
309	-	-	-	+	-
310	+	-	-	+	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
311	-	-	-	+	-
312	+	-	-	+	+
313	-	-	-	+	-
314	+	-	-	+	+
315	-	-	-	+	-
316	+	-	-	+	+
317	-	-	-	+	-
318	+	-	-	+	+
319	-	-	-	+	-
320	+	-	-	+	+
321	-	-	-	+	-
322	+	-	-	+	+
323	+	-	+	+	-
324	+	-	-	-	-
325	+	-	+	+	-
326	-	-	-	-	-
327	-	-	+	+	-
328	-	-	-	-	-
329	-	-	+	-	-
330	-	-	-	-	-
331	-	-	+	-	-
332	-	+	+	-	-
333	-	-	+	-	-
334	-	+	+	-	-
335	-	-	+	-	-
336	-	+	-	-	-
337	-	-	-	+	-
338	-	+	-	+	-
339	-	-	-	+	-
340	-	+	-	+	-
341	-	-	-	+	+
342	-	+	-	+	-
343	-	-	-	+	+
344	-	+	-	+	-
345	-	-	-	+	-
346	-	+	-	+	-
347	-	-	-		+
348	-	+	-		-
349	+	-	-	-	+
350	-	+	-	-	-
351	+	-	-	+	+
352	-	+	-	+	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
353	+	+	-	+	+
354	-	-	-	-	+
355	+	+	+	-	+
356	-	-	+	+	+
357	+	+	+	-	+
358	-	-	-	+	+
359	+	+	-	-	+
360	-	-	+	-	+
361	+	+	-	+	+
362	-	-	+	-	+
363	+	+	-	+	+
364	-	-	-	+	+
365	+	+	+	-	-
366	-	-	-	+	-
367	-	+	+	-	-
368	-	-	+	-	-
369	-	+	-	+	-
370	-	-	+	-	+
371	+	-	-	-	+
372	+	+	-	-	+
373	-	-	+	-	+
374	+	-	-	-	-
375	-	+	-	-	-
376	+	+	-	+	+
377	-	-	-	+	-
378	+	+	-	+	+
379	-	-	-	-	+
380	+	+	+	-	+
381	-	-	+	+	+
382	+	+	+	-	-
383	-	-	-	+	-
384	+	+	-	-	+
385	-	-	+	-	-
386	+	+	-	+	+
387	-	-	+	-	+
388	+	+	-	+	+
389	-	-	-	+	+
390	+	+	+	-	-
391	-	-	-	+	-
392	-	+	+	-	+
393	-	-	+	-	-
394	-	+	-	+	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
395	-	-	+	-	+
396	+	-	-	-	+
397	+	-	-	-	+
398	-	-	+	-	-
399	+	-	-	-	-
400	-	+	-	-	+
401	+	+	-	+	-
402	-	-	-	+	+
403	+	+	-	+	+
404	-	-	-	-	+
405	+	+	+	-	+
406	-	-	+	+	-
407	+	+	+	-	-
408	-	-	-	+	+
409	+	+	-	-	-
410	-	-	+	-	+
411	+	+	-	+	+
412	-	-	+	-	+
413	+	+	-	+	+
414	-	-	-	+	-
415	+	+	+	-	-
416	-	-	-	+	+
417	-	+	+	-	-
418	-	-	+	-	+
419	-	+	-	+	+
420	-	-	+	-	+
421	+	-	-	-	+
422	+	-	-	-	-
423	-	-	+	-	-
424	-	-	-	-	+
425	-	+	-	-	-
426	-	-	-	+	-
427	-	-	-	+	-
428	-	-	-	+	-
429	-	-	-	-	+
430	-	-	-	-	+
431	-	-	-	-	+
432	-	+	-	-	+
433	-	-	-	-	-
434	-	+	-	-	-
435	-	-	-	+	-
436	-	-	-	+	-

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
437	-	-	-	+	-
438	-	-	-	-	+
439	-	-	-	-	+
440	-	-	-	-	+
441	-	-	-	+	+
442	-	-	-	-	-
443	-	+	-	+	-
444	-	+	-	-	-
445	+	-	-	-	-
446	+	-	-	-	-
447	-	-	-	-	+
448	-	-	-	+	-
449	-	-	-	+	-
450	+	-	-	-	-
451	-	-	-	+	-
452	-	-	-	-	+
453	-	-	-	+	-
454	-	-	-	-	+
455	-	-	-	+	-
456	-	-	-	+	-
457	-	-	-	-	+
458	-	+	-	-	-
459	-	-	-	+	-
460	-	-	-	+	-
461	-	-	-	-	+
462	-	-	-	-	+
463	-	-	-	-	+
464	-	-	-	-	+
465	-	+	-	-	-
466	+	-	-	-	-
467	-	+	-	-	-
468	-	-	-	+	+
469	+	-	+	-	-
470	-	-	+	-	-
471	-	-	+	-	+
472	-	+	-	-	-
473	-	+	-	-	-
474	-	-	-	+	-
475	-	-	-	+	-
476	-	-	-	-	+
477	-	+	-	-	+
478	-	+	-	-	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
479	-	-	-	+	-
480	-	-	-	+	-
481	-	-	-	+	-
482	-	-	-	+	-
483	-	+	+	-	-
484	-	+	-	+	-
485	-	-	-	-	+
486	-	+	-	-	-
487	-	+	-	+	-
488	-	-	-	+	-
489	-	+	-	+	-
490	-	+	-	-	-
491	-	-	-	-	+
492	-	-	-	+	-
493	-	-	-	-	+
494	-	-	-	-	+
495	-	-	-	+	-
496	-	-	-	+	-
497	-	-	-	-	+
498	-	-	+	-	+
499	-	-	+	-	+
500	-	-	-	+	-
501	-	-	-	+	-
502	+	-	-	-	-
503	-	-	-	-	+
504	-	+	-	-	-
505	-	-	+	-	+
506	-	-	-	+	-
507	-	-	+	-	-
508	-	-	+	-	-
509	-	-	+	+	-
510	-	-	-	+	-
511	-	-	-	-	+
512	-	-	-	-	+
513	-	+	+	-	+
514	-	-	-	+	-
515	+	-	-	+	-
516	-	-	-	+	-
517	-	-	-	+	-
518	+	-	-	-	-
519	-	-	-	-	+
520	-	-	-	-	+

Aislado	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
521	-	-	+	-	-
522	-	-	+	+	-
523	-	-	+	+	-
524	-	+	-	-	-
525	-	-	-	-	+
526	-	-	-	-	+
527	+	-	-	-	+
528	-	-	-	-	+
529	-	-	-	+	+
530	-	-	-	+	+
531	-	-	+	+	-
532	-	-	-	+	-
533	-	+	+	-	-
534	+	-	-	-	-
535	-	-	-	+	-
536	-	-	-	+	-
537	-	-	-	-	+
538	-	-	-	-	+
539	-	+	-	-	-
540	+	-	-	+	-
541	-	-	-	-	+
542	-	-	+	-	-
543	-	-	-	+	-
544	+	-	-	+	-
545	-	-	-	+	-
546	-	+	-	-	-
547	-	-	-	-	+
548	+	-	-	-	-
549	-	-	-	+	-
550	-	+	-	-	-
551	+	-	-	+	-
552	-	-	-	+	+
553	-	+	-	-	-
554	-	-	+	-	-
555	-	-	-	+	-
556	-	-	-	-	-
557	-	-	-	+	-
558	-	-	-	-	+
559	-	-	-	+	-

ANEXO 7

Ensayo en pocillos de producción de sustancias con actividad antibacteriana (cepas con algún halo ≥ 12 mm). Muestras señaladas en azul claro: actividad sensible a proteasa.

Muestras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
47		14	14		9
54		12	12	9	9
60	9	10	10	14	11
61	9	10	10	14	11
62	9				16
66	9	17	9		13
68					14
69					12
70					17
73					17
74				20	
75		10	12		
76				12	
79			16		
80	17	9	15	17	9
81	12	9	13	14	15
16 b	10				15
82		9			12
85	13	9		17	9
97	9		18		
98			15	15	
99			15	17	
100			12	12	
101			14		
104			17		
a3	10	9	10		13
a5	10		8		12
a6	16	9	15		9
a9		9	13		9
a12	12	9	12		15
108	12	9	10		9
109	13	8.5			11

Muestras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
111		10		12	9
112	13			24	10
116			17	12	
118			20	14	
119			23	12	
120			15	15	
121				18	
122			20		
125	15			18	
130				17	
133				12	
134				15	
136				16	
137	21				10
142					15
143					15
148					15
151					14
154					22
155	12				15
156					23
157					16
158			15		16
159					14
160		12		12	20
161				12	17
162					14
163	14				20
164				20	15
165				18	15
166					22
167			15		17
168				10	24
169		9		10	15
170					20
171			20	10	20
172				25	15
174				25	16
175					16
177			22		15
178			25	16	
180				24	

Muestras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
181				25	22
182				14	12
186				24	16
187				24	
188				22	12
189				22	12
190				25	
191				12	14
193	23			16	
194			20	14	
196			22		
197				16	12
198			14	18	12
199				25	12
200			12	22	12
202	10		14	14	
203				23	12
204			12	25	12
205				12	25
206		12			
207		10			12
208				15	14
209	23				
211					23
212	14		15		
214			9	12	14
216		9			18
217		9	9	15	20
221		12		9	18
222	15		20		14
223	11				17
224	12				25
227				12	14
231	12				22
234					24
237				10	23
239	12			16	21
241	18				9
242					12
243	15	9			
244		9		12	
248				15	

Muestras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
250		9	16	15	
251		10		14	18
252					14
256					20
261					13
262					13
263					12
264					14
266					14
274					16
275					13
277					15
282					12
286					14
287					15
289					16
294				14	
295				12	
296				13	
297				13	
298				14	
299				12	
300				12	
301				12	
302				12	
303				12	
304				12	
306				14	
307				15	
308				15	
309				14	
311				14	
312				15	
313				17	
370					14
372		16			
431					14
470			14		
471			15		
473		12			
478		15			
484		16		14	

Muestras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
487		15		15	
489		12			
499			12		
505			18		11
505b			20		
508			18		
509			15		
522			16		

ANEXO 8

Identificación de las cepas productoras de actividad antibacteriana sensible a proteasa

Muestras	Identificación	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
60	<i>Arthrobacter koreensis</i>	9	10	10	14	11
120	<i>Arthrobacter koreensis</i>			15	15	
203	<i>Arthrobacter koreensis</i>				23	12
a3	<i>Bacillus cereus</i>	10	9	10		13
a12	<i>Bacillus cereus</i>	12	9	12		15
175	<i>Bacillus cereus</i>					16
178	<i>Bacillus cereus</i>			25	16	
181	<i>Bacillus cereus</i>				25	22
182	<i>Bacillus cereus</i>				14	12
196	<i>Bacillus cereus</i>			22		
204	<i>Bacillus cereus</i>			12	25	12
209	<i>Bacillus cereus</i>	23				
214	<i>Bacillus cereus</i>			9	12	14
217	<i>Bacillus cereus</i>		9	9	15	20
234	<i>Bacillus cereus</i>					24
471	<i>Bacillus cereus</i>			15		
487	<i>Bacillus cereus</i>		15		15	
505	<i>Bacillus cereus</i>			18		12
241	<i>Bacillus pacificus</i>	18				9
244	<i>Bacillus pacificus</i>		9		12	
307	<i>Bacillus pacificus</i>				15	
508	<i>Bacillus pacificus</i>			18		
261	<i>Bacillus paramycoides</i>					13
372	<i>Bacillus paramycoides</i>		16			
125	<i>Bacillus sp.</i>	15			18	
431	<i>Echerichia coli</i>					14
205	<i>Enterobacter cloacae</i>				12	25
222	<i>Enterobacter cloacae</i>	15		20		14
227	<i>Enterobacter cloacae</i>				12	14
237	<i>Enterobacter cloacae</i>				10	23
274	<i>Enterobacter cloacae</i>					16
313	<i>Enterobacter cloacae</i>				17	

Muestras	Identificación	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
509	<i>Enterobacter cloacae</i>			15		
522	<i>Enterobacter hormaechei</i>			16		
262	<i>Enterobacter sp.</i>					13
264	<i>Enterobacter tabaci</i>					14
168	<i>Enterococcus durans</i>				10	24
172	<i>Enterococcus faecium</i>				25	15
174	<i>Enterococcus faecium</i>				25	16
202	<i>Enterococcus faecium</i>	10		14	14	
a9	<i>Enterococcus thailandicus</i>		9	13		9
248	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				15	
470	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			14		
484	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		16		14	
489	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		12			
505b	<i>Listeria grayi</i>			20		11
119	<i>Paenibacillus polymyxa</i>			23	12	
121	<i>Paenibacillus polymyxa</i>				18	
180	<i>Paenibacillus polymyxa</i>				24	
137	<i>Pseudomonas fulva</i>	21				10
154	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>					22
156	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>					23
212	<i>Staphylococcus aureus</i>	14		15		
309	<i>Staphylococcus aureus</i>				14	
73	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					17
74	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				20	
75	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		10	12		
79	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			16		
81	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	9	13	14	15
112	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13			24	10
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			17	12	
118	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			20	14	
133	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				12	
136	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				16	
142	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					15
163	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14				20
165	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				18	15
166	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					22
167	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			15		17
186	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				24	16
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				24	
188	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				22	12

Muestras	Identificación	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
189	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				22	12
193	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23			16	
194	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			20	14	
200	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			12	22	12
211	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					23
216	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		9			18
478	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		15			
61	<i>Staphylococcus hominis</i>	9	10	10	14	11
155	<i>Staphylococcus hominis</i>	12				15
191	<i>Staphylococcus hominis</i>				12	14
312	<i>Staphylococcus hominis</i>				15	
a6	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	16	9	15		9
70	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>					17
80	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	17	9	15	17	9
122	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>			20		
130	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>				17	
160	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		12		12	20
208	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>				15	14
66	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	9	17	9		13
297	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>				13	
197	<i>Staphylococcus</i> sp.				16	12
250	<i>Staphylococcus warneri</i>		9	16	15	
266	<i>Staphylococcus warneri</i>					14
277	<i>Staphylococcus warneri</i>					15
294	<i>Staphylococcus warneri</i>				14	
311	<i>Staphylococcus warneri</i>				14	
370	<i>Staphylococcus warneri</i>					14
170	<i>Streptococcus mitis</i>					20
a5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	10		8		12

ANEXO 9

Caracterización bioquímica de las 101 cepas presuntamente productoras de bacteriocinas (positivas en prueba proteasa)

BE: Crecimiento en sales biliares (2), hidrólisis esculina (1), no crece (0); **EPO:** Producción exopolisacáridos

		CARACTERIZACION BIOQUIMICA												
		Metabolización							Producción	Crecimiento				
ID	Especie	BE	Estaquiosa	Rafinosa	ADNasa	Hemolisis	Proteasa	Amilasa	EPO	NaCl 4%	NaCl 6.5%	pH 8	pH 9.5	pH 4.5
60	<i>Arthrobacter koreensis</i>	0	0	0	0	g	0	0	0	0	0	0	0	1
61	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	0	0	0	g	1	0	0	0	0	0	0	0
66	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0	0	0	0	g	0	0	0	1	1	0	0	1
70	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0	1	A	0	0	0	1	1	0	0	0
73	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	0	0	0	1	1	0	0	0
74	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	B	0	0	0	1	0	0	0	0
75	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	A	0	0	0	1	1	0	0	0
79	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	1	A	1	0	1	1	0	0	0	0
80	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	0	0	0	B	0	0	0	1	0	0	0	0
81	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	0	0	0	0	0	0	0	0
120	<i>Arthrobacter koreensis</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
112	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	B	0	0	0	0	0	0	0	0
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	0
118	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	A	1	1	0	1	0	0	0	0
119	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	1
121	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	0	0	G	1	1	0	1	0	0	0	1
122	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	0
125	<i>Bacillus</i> sp.	0	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	1
130	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	A	0	0	0	1	1	0	0	0

ID		BE	Estaquirosa	Rafinosa	ADNasa	Hemolisis	Proteasa	Aamilasa	EPO	NaCl 4%	NaCl 6.5%	pH 8	pH 9.5	pH 4.5
133	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1	1	1	G	0	1	0	1	1	0	0	0
137	<i>Pseudomonas fulva</i>	0	0	0	0	g	0	0	0	1	0	0	0	0
136	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	g	0	0	0	1	0	0	0	0
142	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1	1	0	A	1	1	0	1	1	1	0	0
154	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0	0	0	0	g	0	0	0	0	0	0	0	0
155	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	0	0	0	g	0	0	0	0	0	0	0	0
156	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0	0	0	0	g	0	0	1	0	0	0	0	0
160	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	0	0	0	g	0	1	0	0	0	1	0	0
163	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	B	1	0	1	1	1	0		
165	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	0
166	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	B	0	1	1	1	1	1	0	0
167	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	0	1	1	0	0	0
168	<i>Enterococcus durans</i>	1	0	0	0	A	1	1	1	1	1	0	0	0
170	<i>Streptococcus mitis</i>	0	0	0	0	G	0	1	1	0	0	0	0	0
172	<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	0	0	G	0	0	1	0	0	0	0	0
174	<i>Enterococcus faecium</i>	1	0	0	0	g	1	0	1	0	0	0	0	0
175	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	g	0	0	1	1	1	1	0	0
178	<i>Bacillus cereus</i>	0	1	1	1	B	0	0	1	1	1	1	0	1
180	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	0	0	g	0	0	1	1	1	1	0	1
181	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	1	A	0	1	1	1	1	1	1	1
182	<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0	1	A	0	1	1	1	1	1	1	1
186	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	1	1	1	1	0	0
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	1	1	1	1	0	0
188	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	0	0	1	1	0	1	0	0
189	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	0	1	0	1	0	0
191	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
193	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	A	1	0	1	1	1	0	0	0
194	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	1	0	0	0	0	0	0	0

ID		BE	Estaquiosa	Rafinosa	ADNasa	Hemolisis	Proteasa	Amilasa	EPO	NaCl 4%	NaCl 6.5%	pH 8	pH 9.5	pH 4.5
196	<i>Bacillus cereus</i>		0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
197	<i>Staphylococcus</i> sp.	0	0	0	0	G	1	0	0	0	0	0	0	1
200	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	A	1	0	1	1	1	1	1	0
202	<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	0	0	G	0	0	1	1	0	1	0	0
203	<i>Arthrobacter koreensis</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
204	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
205	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
208	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1	1	0	B	1	1	0	1	1	1	1	1
209	<i>Bacillus cereus</i>	0	1	1	0	A	1	1	1	1	1	0	0	1
211	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	0	B	1	1	0	1	1	0	0	1
212	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	A	1	0	1	1	1	0	0	1
214	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	0	1	0	0	0	0
216	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	0	A	1	0	1	1	1	0	0	1
217	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	0	1	1	0	0	0
222	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	G	0	0	1	1	1	0	0	1
227	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1	1	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
234	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	0	1	1	0	0	0
237	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1	1	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
241	<i>Bacillus pacificus</i>	0	1	1	0	A	1	1	1	1	1	0	0	1
244	<i>Bacillus pacificus</i>	0	1	1	0	G	1	1	0	1	1	0	0	1
248	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	0	0	1	B	1	1	0	1	1	0	0	1
250	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	1	B	1	1	0	1	1	0	0	1
261	<i>Bacillus paramycoides</i>	0	0	0	0	B	1	0	0	1	1	0	0	1
262	<i>Enterobacter</i> sp.	2	0	0	0	G	1	0	0	1	0	0	0	1
264	<i>Enterobacter tabaci</i>	2	0	0	0	G	1	0	0	1	0	0	0	0
266	<i>Staphylococcus warneri</i>	2	0	1	1	A	0	0	0	1	1	0	0	1
274	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	1
277	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0	0	0	G	0	0	0	1	1	0	0	1

ID		BE	Estaquiosa	Rafinosa	ADNasa	Hemolisis	Proteas a	Amilasa	EPO	NaCl 4%	NaCl 6.5%	pH 8	pH 9.5	pH 4.5
294	<i>Staphylococcus warneri</i>	2	0	0	0	G	0	0	0	0	0	0	0	1
297	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	0	0	0	A	1	1	0	1	1	0	0	1
307	<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	0	0	1
309	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	0	0	B	1	1	1	1	1	0	0	1
311	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0	0	0	B	1	1	1	1	1	0	0	1
312	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	0	0	1	B	1	0	0	1	1	0	0	1
313	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	G	1	0	0	1	1	0	0	1
370	<i>Staphylococcus warneri</i>	2	0	0	0	G	1	1	0	1	1	0	0	1
372	<i>Bacillus paramycoides</i>	2	0	0	0	G	1	1	0	0	0	0	0	1
431	<i>Echerichia coli</i>	2	0	0	0	B	0	1	0	1	1	0	0	1
470	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	0	0	0	G	0	0	0	0	0	0	0	1
471	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	1	1	1	1	1
478	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	0	0	G	0	0	1	0	0	1	0	1
484	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	1	0	0	G	0	0	1	1	1	0	0	1
487	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	1	0	1	0	0	1	1	1
489	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	0	0	0	G	0	1	1	0	0	1	0	1
505 b	<i>Listeria grayi</i>	1	1	1	0	B	1	1	0	1	1	0	0	1
505	<i>Bacillus cereus</i>	2	0	0	0	G	1	1	1	1	1	1	0	1
508	<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	0	B	0	1	0	1	1	0	0	0
509	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0	B	1	1	0	1	1	0	0	0
522	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2	0	0	0	G	0	0	0	0	0	0	0	0
A6	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	2	1	1	0	B	1	1	1	1	1	1	0	0
A12	<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0	0	A	0	0	1	0	0	0	1	0
A3	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	G	0	0	0	0	0	0	0	0
A5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	0	0	1	G	0	0	0	0	0	0		0
a9	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2	1	1	0	B	1	0	1	1	1	1	0	0

ANEXO 10

Resultados de PCR para genes de resistencia a antimicrobianos.

Se obtuvieron resultados negativos para los siguientes genes: *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48 LIKE}, *bla*_{PSE}, *bla*_{CTX-M-2}, *tet*(B), *tet*(D), *tet*(A), *tet*(E) y *tet*(G)

ID cepa	Especie	Beta-lactámicos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Bombas exporte
		<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>tet</i> (C)	<i>aadA1</i>	<i>acrB</i>
60	<i>Arthrobacter koreensis</i>	1	1	0	0	0	0
61	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0	0	0	0	0
66	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0	0	0	0	0	0
70	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	1
73	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
74	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	1	0	0
75	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	1
79	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
80	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0
81	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
120	<i>Arthrobacter koreensis</i>	0	0	0	0	0	0
112	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	1	1
118	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
119	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	0	0	1	0

ID cepa	Especie	Beta-lactámicos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Bombas exporte
		<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>tet</i> (C)	<i>aadA1</i>	<i>acrB</i>
121	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	0	0	0	0
122	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0
125	<i>Bacillus</i> sp.	0	0	0	0	0	1
130	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0
137	<i>Pseudomonas fulva</i>	0	0	0	0	0	0
136	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
142	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	1
154	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0	1	0	0	0	0
155	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0	0	0	0	0
156	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0	0	0	0	1	0
160	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0
163	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
133	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
165	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	1
166	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
167	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
168	<i>Enterococcus durans</i>	0	0	0	0	1	0
170	<i>Streptococcus mitis</i>	0	0	0	0	0	0
172	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	0
174	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	0
175	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	1	0
178	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
180	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	1	0	1	0
181	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
182	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
186	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	1	0
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	1	0	0	0

ID cepa	Especie	Beta-lactámicos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Bombas exporte
		<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>tet</i> (C)	<i>aadA1</i>	<i>acrB</i>
188	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	1	0
189	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
191	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0	0	0	1	0
193	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
194	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	1	0
196	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
197	<i>Staphylococcus sp.</i>	0	0	0	0	0	0
200	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
202	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	1	0
203	<i>Arthrobacter koreensis</i>	1	1	0	0	1	0
204	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	1
205	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	1	0
208	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0		0
209	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	1	0
211	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	1	0
212	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1	0	0	1	0
214	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	1	0
216	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1	0	0	1	0
217	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	0	0	1	1
222	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	1
227	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	1
234	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	0	0	1	0
237	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0
241	<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	0	0	0
244	<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	0	1	0
248	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0
250	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	0	1	0

ID cepa	Especie	Beta-lactámicos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Bombas exporte
		<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>tet</i> (C)	<i>aadA1</i>	<i>acrB</i>
261	<i>Bacillus paramycooides</i>	0	0	0	0	1	0
262	<i>Enterobacter</i> sp.	0	0	0	0	1	0
264	<i>Enterobacter tabaci</i>	0	0	0	0	0	0
266	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	0	0	0
274	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	1	0
277	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	1	0	0	1	0
294	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	1	0	0	1	0
297	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	1	0	0	1	0
307	<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	0	1	0
309	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	1	0
311	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	1	0	0	1	0
312	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1	0	0	0	0
313	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0
370	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	1	0	0	0	0
372	<i>Bacillus paramycooides</i>	1	1	0	0	0	0
431	<i>Echerichia coli</i>	1	1	0	0	0	0
470	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0
471	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
478	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
484	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0
487	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	0	0	0	1
489	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0
505	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0
505b	<i>Listeria grayi</i>	0	0	0	0	0	0
508	<i>Bacillus pacificus</i>	0	1	0	0	0	0
509	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1	0	0	0	0
522	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	0	0	0	0	0

ID cepa	Especie	Beta-lactámicos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Bombas exporte
		<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>tet</i> (C)	<i>aadA1</i>	<i>acrB</i>
a12	<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0	0	0	0
a3	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	0	0	0	0
a5	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0	0	0	0	0	0
a6	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	0	0	0	0	0	0
a9	<i>Enterococcus thailandicus</i>	0	0	0	0	0	0

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio proporcionan información sobre la leche materna del periodo de lactancia tardío, de la semana 21 a la 48. Estas semanas corresponde a lo que se conoce como los periodos de balbuceo, comida sólida y gateo de los niños. Múltiples factores externos pueden cambiar la configuración de la leche materna durante este periodo ya que el niño se ve expuesto a nuevos alimentos y comienza a explorar su medio, por todo esto se considera que una de las formas de inoculación de la leche materna viene dada por el lactante al amamantarse (Fernández y Rodríguez, 2020; Li et al., 2020; Pannaraj et al., 2017; Bäckhed et al., 2015; Fernández et al., 2013). Existen estudios previos que han abordado la composición microbiana de la leche humana y su valor probiótico basados generalmente en un compendio de muestras tomadas de diferentes individuos y tomadas en el período de lactancia temprano a medio. En el presente estudio se han tomado 3 muestras diarias durante 28 semanas de leche materna de un mismo individuo durante un periodo más extenso, llegando hasta alcanzar el niño casi un año de vida. Estas muestras se congelaron a -20°C , para luego desarrollar una serie de experimentos. Se considera que el congelado de las bacterias no afecta a la carga microbiana de las muestras de leche como demostraron Agel et al. (1981) donde la congelación, rápida o lenta, no afectaba al total de UFC, por lo que consideramos que la carga microbiológica de las muestras se mantiene durante el almacenamiento.

Durante la primera parte del experimento se evaluó la calidad microbiana de la leche mediante recuentos en placa en medio selectivo para detectar *Staphylococcus* y *Enterobacterias*, bacterias ácido lácticas (BAL) y recuentos de aerobios mesófilos totales (AMT). La leche materna obtenida estaba dentro de las medias de múltiples estudios. Estas muestras mantuvieron una carga de AMT de 3 a 4 logaritmos de UFC/mL durante todo el periodo, la leche materna de una mujer sana suele tener una carga microbiana entre 2 y 8 log dependiendo de la etapa, de media se obtienen valores de 10^3 a 10^4 , teniendo esta una distribución normal. En varios estudios, se ha publicado que por lo general la mayoría de las muestras tienen de 3 a 4 log. (Duran et al., 2008; Chaco y Nicole, 2017; Rodríguez et al., 2008).

La carga de bacterias ácido lácticas (BAL) también se mantuvo en torno a 3 logaritmos y con una clara correlación a los mesófilos totales (de 0.74 al menos). En el estudio realizado por Tusar et al. (2014) en muestras de leche de 47 mujeres lactantes se obtuvieron recuentos en placas en medios para detectar AMT de 4 logaritmos, los recuentos de BAL fueron en torno a 3 logaritmos, así como los de *Staphylococcus* que también llegaron a 3 logaritmos en las placas ensayadas. Todos estos resultados son parecidos a los obtenidos en este estudio y a los referidos por otros autores (Duran et al., 2008; Rodríguez et al., 2008; Solís et al., 2010; La Tuga et al., 2014; Martin et al., 2014; Chaco y Nicole, 2017). Otros estudios reflejan que entre el 30 y el 50% de las bacterias aisladas son *Staphylococcus* y en aproximadamente un 35% de las muestras ensayadas se logra detectar bacterias gram negativas (Keim et al., 2013; Tusar et al., 2014). En el presente estudio se han aislado 582 cepas de las diferentes muestras de leche, de las cuáles al realizarles la tinción de Gram, se observaron 578 bacterias, 18 de ellas gram negativas.

Una de las propiedades beneficiosas de las bacterias es su capacidad de producir sustancias antibacterianas para competir por la adhesión a la mucosa intestinal o para modular la respuesta inmunológica. A estas 578 cepas bacterianas aisladas se les realizó un ensayo de producción sustancias antibacterianas mediante la prueba en gota y en pocillo. Todas las cepas aisladas se ensayaron frente a cinco cepas indicadoras para evaluar así su capacidad para producir sustancias antimicrobianas. Se obtuvieron 101 cepas positivas productoras de bacteriocinas. Es sabido que una de las funciones principales de la leche materna es poblar el intestino de los neonatos y ayudar así a desarrollar el sistema metabólico de estos (Gómez Gallego et al., 2009) por lo que esta debe de ser una fuente de gran cantidad de bacterias productoras de sustancias antimicrobianas, lo que concuerda con la colección cepas posibles productoras de bacteriocinas obtenidas de forma aleatoria y completamente al azar, de las muestras de leche materna tomadas en nuestro estudio. En estudios in vitro realizados con 4 cepas aisladas de leche materna se demostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* y *Clostridium* así como de interferir en la

adhesión de patógenos intestinales (Olivares et al., 2006a). Por otro lado, se demostró cómo los sobrenadantes de ciertos cultivos de probióticos que pertenecían a *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 eran capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella enterica* 1344, observándose una reducción en el crecimiento del patógeno en condiciones de anaerobiosis (Keersmacker et al., 2006; Martinelli et al., 2010).

En las últimas décadas diversos trabajos han señalado las principales características que deben tener las cepas que están directamente relacionadas con una actividad beneficiosa y que deberían de valorarse a la hora de determinar el potencial probiótico de una determinada cepa (Collins et al., 1998; Holzapfel et al., 1998; Mattila- Sandholm et al., 1999; Ouwehand et al., 1999; Tuomola et al., 2001). Para poder considerar una cepa como probiótica debe cumplir la premisa de alcanzar viva la mucosa intestinal. Aunque ya existen datos que demuestran que ciertas bacterias inactivadas pueden poseer efectos beneficiosos (He et al., 2002, 2005; Murosaki et al., 1998) se considera aún un criterio de selección el hecho de que la cepa sea capaz de resistir la digestión y colonizar el intestino para lo cual es fundamental que se adhiera al epitelio intestinal. Las cepas aisladas en este estudio y que fueron productoras de bacteriocinas se evaluaron, para ver su idoneidad y así poder ser estudiadas como posibles probióticas. Todas ellas fueron sometidas a una serie de pruebas para evaluar su resistencia a ambientes adversos, como los que se pueden producir en el tracto intestinal, y así también estudiar algunas de las características que se requieren para poder determinar una bacteria cómo probiótico. El 78% de las cepas evaluadas resistieron a altas concentraciones de sal (4%) y crecieron sin problema. Se evaluó si las cepas podían crecer en un pH 4,5, lo cual fue cierto para la mitad de las cepas, aunque sería interesante saber también por cuánto tiempo las cepas pueden resistir pH extremadamente bajos como los del estómago. La resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares es una de las características principales a la hora considerar una cepa como probiótico ya que son condiciones de estrés que constituyen una barrera limitante para su supervivencia en el entorno. Para poder demostrar si una cepa es capaz de aguantar estas condiciones, se han realizado múltiples estudios in

vitro que simulan las condiciones de acidez producidas por las secreciones gastrointestinales en individuos sanos (Charteris et al., 1998; Dunne et al., 2001; Fernández et al., 2003; Martins et al., 2009), o se han usado modelos que simulan procesos in vivo (Marteu et al., 1997). En humanos numerosos estudios demuestran que ciertas especies de lactobacilos y bifidobacterias son capaces de resistir las condiciones del proceso digestivo recuperándose vivas en las heces (Jiménez et al., 2008; Olivares et al., 2007).

Debido a que en algunos casos, las actividades realizadas por la microbiota pueden ser perjudiciales, como puede ser una excesiva deconjugación de sales biliares, degradación de mucinas, producción de amonio o resistencia a antibióticos, el análisis de estas actividades metabólicas es necesario para poder evaluar la seguridad de las bacterias que se consideren como probióticos (Backed et al., 2006). Otra característica interesante para poder pasar por el tracto intestinal es el poder soportar las sales biliares y la esculina, en este caso 52 cepas lograron crecer en el medio de bilis/esculina y 13 lograron crecer e hidrolizar la esculina. Para que una bacteria sea probiótico no debe presentar actividad hemolítica ni hidrolizar el ADN, por claras razones de seguridad. Es preferible que hidrolice estaquiosa, ni rafinosa, que son un tetrasacárido y un disacárido, respectivamente, no digeribles por el ser humano pero si por las bacterias estomacales llegando a provocar flatulencia. En los ensayos para determinar la actividad hemolítica, alrededor del 43% de las muestras fueron positivas. Solo ocho cepas hidrolizaron el ADN, y finalmente solo 13 y 14 cepas crecieron en el medio MRS-Rafinosa/ Estaquiosa, respectivamente.

Bajo estos parámetros se seleccionaron 24 cepas con las características buscadas. Al confrontar esta lista con los resultados de la identificación de las cepas por 16S notamos que entre las bacterias se encontraban 6 gram negativas que excluiríamos de la selección final (4 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter* spp. y 1 *Enterobacter tabaci*).

A las 101 cepas también se le realizaron pruebas de PCR para determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos y la presencia de bombas de exporte. 52 de las 101 presentaron algún gen de resistencia a antibióticos y/o genes de bombas de exporte. Al cruzar referencias con las 18 cepas preseleccionadas, observamos que 4 de las 6 cepas gram negativas, ya eliminadas, contaban con algunos de estos genes. Además de estas, otras 5 cepas fueron eliminadas dejándonos con una selección de 13 posibles cepas probióticas aisladas de la leche materna para poder ser estudiadas en futuras investigaciones (Tabla 11). En total se tratan de 4 *Leuconostoc*, 5 *Staphylococcus epidermidis*, 1 *Enterococcus thailandicus*, 2 *Streptococcus mitis* y *thermophilus* y 1 *Bacillus cereus*.

Código Origen	Especie	ID	Actividad antimicrobiana frente a:
VJ 22'0-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	248	<i>E. faecalis</i>
ELL 48'0-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	470	<i>Listeria innocua</i>
ELL 52'0-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	484	<i>Salmonella</i> + <i>E. faecalis</i>
ELL 74'1-A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	489	<i>Salmonella</i>
ELL A1'0-E	<i>Streptococcus thermophilus</i>	a5	<i>S. aureus</i>
ELL 26'4	<i>Streptococcus mitis</i>	170	<i>S. aureus</i>
VJ 9'0-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	73	<i>S. aureus</i>
VJ 25'1-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	118	<i>Listeria innocua</i> + <i>E. faecalis</i>
MRS 12'0-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	136	<i>E. faecalis</i>
ELL 22'2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	167	<i>Listeria innocua</i> + <i>S. aureus</i>
ELL 49'0-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	478	<i>Salmonella spp.</i>
ELL A1'1-B	<i>Enterococcus thailandicus</i>	a9	<i>Listeria innocua</i>
MRS 70'0-1	<i>Bacillus cereus</i>	505	<i>Listeria innocua</i> + <i>S. aureus</i>

Leuconostoc mesenteroides es considerada una BAL probiótica y múltiples estudios hablan de sus virtudes. Es parte de las bacterias fermentadoras en quesos,

algunas bebidas fermentadas y el Kimchi Coreano, (fermentado de repollo chino) entre otros alimentos fermentados asiáticos. En Corea se ha aislado como uno de los 220 microorganismos que forman parte de la fermentación del kimchi y se le ha estudiado por su capacidad probiótica antiviral en pollos de forma positiva (Sea et al., 2012). De igual forma en Malasia Allameh et al. (2012) estudiaron cepas de *L. mesenteroides* extraídas de los intestinos de peces, y concluyeron que tenían un gran potencial como probiótico ya que inhibían los patógenos de los peces, y mostraban alta resistencia a las sales biliares, pH bajo (pH 3) y resistencia de hasta dos horas en pH de 1.5. De igual forma aislaron cepas de *L. mesenteroides* de queso mozzarella de búfala y demostraron no solo su resistencia a sales biliares, sino su resistencia general a medios salinos dependiente de la temperatura (De Paula et al., 2014). En el caso de El Jenin et al. (2016), de Túnez, además de confirmar la resistencia a sales biliares y bajo pH, confirmaron la falta de actividad hemolítica, su sensibilidad a agentes antimicrobianos y su resistencia a pancreatina y pepsinas. En México, Castro-Rodríguez et al. (2015) aislaron también *Leuconostoc* del aguamiel de agave. Estas cepas como en los estudios anteriores fueron resistentes a pH bajo, hasta 3 horas a pH 2, y a altas concentraciones de sales biliares, además de presentar una alta adhesión a mucina.

Durante nuestra investigación observamos también la capacidad antimicrobiana de las cepas de *L. mesenteroides* frente *L. innocua*, *Salmonella* y *E. faecalis*, bacterias frente a las que el comportamiento probiótico y antimicrobiano de esta cepa está documentado, con estudios como los resumidos a continuación. En México Giles-Gómez et al. (2016) aislaron cepas de *L. mesenteroides* de la bebida Pulque, que además de presentar características óptimas para ser un probiótico, presentó actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica serovar Thyphi* y *S. entérica serovar Typhomurium*. En Japón se aislaron también cepas de *L. mesenteroides* de narezuchi, un plato típico de arroz y pescado fermentado, y comprobaron su capacidad antimicrobiana frente a *Listeria* tanto en células como en ratones susceptibles inoculados con *Listeria* (Nakurama et al., 2012). Se conoce que algunas subespecies de *L. mesenteroides* que producen mesentericina

Y105 y mesentericina UL5, polipéptidos capaces de atacar específicamente a *Listeria* spp. pero no a otras BAL. Otra bacteriocina producida por *L. mesenteroides* es la mesenterocina 52 que inhibe a otros *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Listeria* (Trias et al., 2008; Fremaux et al., 1995; Mathieu et al., 1993; Héchard et al., 1992; Pandia et al., 1991).

Todorov y Dicks (2004) descubrieron que la mesentericina ST₉₉ de *L. mesenteroide* subsp. *dextranicum* lograba inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, varios *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus thermophilus*. No inhibían a *Clostridium* spp., *Carnobacterium* spp., *L. mesenteroides*, y bacterias Gram negativas. Todos estos resultados se pueden comparar en parte a los obtenidos en nuestro estudio.

En India producen una bebida, Ragi, de mijo fermentado por *L. mesenteroides* y *Bacillus subtilis*, al evaluar individualmente ambas especies mostraron características antimicrobianas contra *Vibrio cholerae* y la capacidad para formar biofilms, su comportamiento en conjunto fue sinérgico, logrando mejores resultados de inhibición y control frente a *Vibrio cholerae* (VidyaLaxme, 2014). Lo que nos hace pensar que podrían ser buenos aliados, aunque en otro estudio se evaluó su comportamiento con *Streptococcus thermophilus*, y no existió un aumento de producción de citoquinas al combinar las bacterias. La producción de citoquinas es considerada el mecanismo por el cual los probióticos afectan el sistema inmune innato y adaptativo, en este estudio de Finlandia ambas por separado aumentaron la producción de citoquina de tipo Th1, IL-12 e IFN- γ (Kekkona et al., 2008).

En este estudio se ha identificado también dos cepas de estreptococos, *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus mitis*, ambas mostraron actividad frente a *S. aureus*. Está descrito que los estreptococos pueden producir diferentes tipos de sustancias antimicrobianas, incluyendo las bacteriocinas. Entre las bacteriocinas ya identificadas producidas por diferentes subespecies de *Streptococcus thermophilus*

están: Thermophilin 347, Thermophilin A, Thermophilin 110, Thermophilin 1277, Thermophilin ST-1 (Villani et al., 1995; Ward y Somkuti, 1995; Gilbreth y Somkuti, 2005; Kabuki et al., 2007; Aktypis y Kalantzoulou, 2011) Las diferentes bacteriocinas tienen un amplio poder antimicrobiano sobre una larga lista de patógenos alimentarios entre estos: De Thermophilin 347 se ha evaluado su capacidad frente a *Listeria*, Thermophilin 110 se sabe que inhibe a múltiples bacterias ácido lácticas, de Thermophilin A se comprobó su acción contra *Clostridium sporogenes* y *C. tyrobutyricum* y T Thermophilin ST-1 contra *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia rubrifasciens*. Otras bacteriocinas no identificadas se han considerado como inhibidoras moderadas de *Staphylococcus aureus*, y otras como inhibidoras de *Bacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica* (Villani et al., 1995; Ivanova et al., 1998; Aktypis et al., 2002; Gilbreth y Somkuti, 2005; Aktypis y Kalantzoulou, 2011; Rossi et al., 2013).

A partir de *Streptococcus mitis* también se ha aislado la bacteriocina viridin B que entre otras bacterias es activa frente a *S. aureus* (Dajani et al., 1978) Cuando se estudió en matrices alimentarias como el yogur inoculado con 10^3 UFC de *L. monocytogenes* y 10^6 de *S. aureus*, mostró mayores efectos contra la listeria (Benkerroum et al., 2002), en el actual experimento solo obtuvimos efecto de nuestras cepas frente a *S. aureus*. Se ha sugerido que los *Streptococcus viridans* y los estafilococos coagulasa negativos de la leche materna podrían reducir la adquisición de patógenos no deseados por los lactantes, especialmente cuando están expuestos a ambientes hospitalarios (Park et al., 2011; Fernández et al., 2013).

La mayor parte de los productores de actividad antimicrobiana identificados en el presente estudio pertenecían a especies coagulasa-negativas del género *Staphylococcus*. Dentro de este género se han descrito numerosas cepas productoras de bacteriocinas, pero su potencial aplicación, salvo excepciones (Fagundes et al., 2016), ha quedado relegada debido a la patogenicidad de *S. aureus* y a la producción

de diferentes toxinas. En 1972 se identificó, aisló, produjo y purificó la estafilococcina 1580; esta bacteriocina se produce en muy baja cantidad por esta bacteria (Jetten et al., 1972). Durante su caracterización se determinó que su mecanismo de acción es simultáneamente inhibir la síntesis de ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico y proteína, es una bacteriocina que soporta pH desde 3.5 a 8.5, y que primordialmente afecta a bacterias gram positivas (Jetten y Vogel, 1972a, 1972 b). En 2012 se identificó una nueva bacteriocina de cepas de *S. epidermidis*, la epidermicina NI01, que afecta en especial a bacterias gram positivas como *S. aureus* resistente a meticilina, enterobacteriocinas y cepas de *S. epidermidis* productoras de biofilm, su actividad antimicrobiana se mantiene en un intervalo de pH de 2 a 10 (Sandiford y Upton, 2012).

Recientemente ha surgido un interés creciente por las bacteriocinas de las cepas de *Staphylococcus* comensales aisladas de piel y mucosas, ya que estas podrían servir precisamente para evitar la colonización por cepas patógenas. *S. epidermidis* y otros estafilococos comensales, junto con especies de estreptococos, son los principales componentes del microbioma de la leche materna (Sakwinska y Bosco, 2019). Se ha propuesto que los estafilococos comensales podrían jugar un papel importante desplazando a los estreptococos (Sakwinska y Bosco, 2019) así como a *S. aureus* (O'Sullivan et al., 2019). *S. epidermidis* produce diversas bacteriocinas, como el lantibiótico epidermina (Götz et al., 2014). Otros estafilococos coagulasa-negativos comensales también producen lantibióticos como la gallidermina y la hominicina. Recientemente se ha descrito en *S. epidermidis* la producción de péptidos citoplásmicos que muestran actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (incluyendo cepas resistentes a meticilina), pero no a otras cepas de *S. epidermidis*, *E. coli* o *Salmonella*, y se ha resaltado la importancia de estos péptidos como inhibidores específicos frente a cepas MRSA (Jang et al., 2020). También se han aislado cepas coagulasa-negativas productoras de bacteriocinas a partir de otras fuentes como leche de vaca (Carson et al., 2017), cabra y oveja (Hernández-Saldaña et al., 2016; Rahmdel et al., 2019) o calostro humano (Obermajer et al., 2015). Entre las diferentes especies de estafilococos coagulasa-negativos productores de sustancias de tipo bacteriocina detectados en este estudio merecen una especial atención las cepas de *S.*

lugdunensis. Aunque esta bacteria es poco conocida en cuanto a su potencial bacteriocinogénico, un estudio previo demostró que las cepas de *S. lugdunensis* aisladas de las fosas nasales producen lugdunina, e impiden la colonización por *S. aureus* (Zipperer et al., 2016). La lugdunina es un nuevo tipo de péptido antimicrobiano cíclico de síntesis no ribosómica que contiene tiazolidina. La lugdunina es bactericida en diversos modelos animales, y no genera resistencias en *S. aureus*. Estos antecedentes son alentadores para continuar con el estudio de las cepas bacteriocinogénicas de *S. lugdunensis* aisladas en el presente estudio a partir de leche humana.

Gran parte de los aislados en este estudio productores de presuntas bacteriocinas pertenecían a bacterias formadoras de endosporas, principalmente del género *Bacillus* y también de *Paenibacillus*. Estos géneros bacterianos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (suelo, cereales, y otros alimentos). Algunos tienen la capacidad de utilizar diferentes nutrientes presentes en la leche, por lo que pueden crecer en ella provocando alteraciones como agriado plano. También tienen muchas de ellas la capacidad para producir diferentes tipos de toxinas, como es el caso de *Bacillus cereus*, provocando intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. Por tanto, la presencia de cepas de *Bacillus* (sobre todo de *B. cereus*) en la leche materna debería ser considerada como un factor de riesgo, y su potencial productor de toxinas debería ser estudiado. *B. cereus* produce diferentes tipos de bacteriocinas, denominadas en general cereinas. Hay diferentes bacteriocinas del grupo cereina: cereina, cereina 8a, cereina 7, o cereina MRX1, entre otras. Las cereinas son bacteriocinas con resistencia moderada al calor y tolerancia a un amplio rango de pHs. Han sido probadas frente a otros *Bacillus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella enteritidis* con resultados satisfactorios (Naclerio et al., 1993; Oscáriz et al., 1999a; Oscáriz et al., 1999b; Oscáriz y Pisabarro, 2000; Bizani et al., 2005; Zendo et al., 2007). Muchas de las cepas encontradas en este estudio destacan por su actividad frente a *S. aureus* y/o *Listeria*, y algunas también por su actividad frente a gram negativas. Dentro del grupo de *Bacillus* (sensu lato) se han descrito numerosas sustancias antimicrobianas, tanto de síntesis no ribosómica (muchas de ellas con un espectro de

acción amplio) como ribosómica, y se han realizado también algunos estudios sobre sus posibles aplicaciones (Ben Lagha et al., 2017; Pletzer et al., 2016; Rai et al., 2016). No obstante, no se han encontrado referencias sobre producción de sustancias antimicrobianas en algunas de las especies encontradas en este estudio como *B. pacificus* o *B. paramycoides*, por lo que estas cepas también son candidatas potenciales para la identificación de nuevas sustancias antimicrobianas.

Entre las cepas productoras de presuntas bacteriocinas seleccionadas en este estudio se encontraron representantes de tres especies de *Enterococcus*. Existen numerosos estudios que indican que los enterococos son muy buenos productores de bacteriocinas, muchas de ellas (como la enterocina AS-48) han despertado gran interés para la conservación de alimentos (Grande Burgos et al., 2014). La mayoría de las cepas productoras mostraron actividad frente a la bacteria indicadora *E. faecalis*. Esto concuerda con la definición de bacteriocinas como sustancias antimicrobianas que generalmente son activas frente a cepas de su misma especie o de especies relacionadas. Cuatro de las cepas son interesantes además por su actividad frente a *S. aureus*, lo que sugiere que estas bacterias podrían jugar un papel en el control de posibles estafilococos patógenos en la leche materna. Sin embargo, solo dos de ellas mostraron actividad frente a *Listeria*. Dado que la mayoría de las bacteriocinas descritas en enterococos son activas frente a *Listeria*, los resultados de este estudio hacen pensar que podría tratarse de nuevas bacteriocinas. Finalmente, cabe destacar que dos de las cepas mostraron actividad frente a alguna de las gram negativas ensayadas. De todas ellas, la más interesante es *Enterococcus thailandicus*. Esta es una especie relativamente nueva, aislada por primera vez en 2008 en salchichas tradicionales tailandesas (Tanasupawat et al., 2008). En 2013, Laukova et al. identificaron un compuesto producido por esta bacteria con un comportamiento muy similar al de una bacteriocina, pero son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. De forma tal que esta especie ofrece una amplia gama de posibilidades para su estudio y análisis.

Se puede concluir que existe base científica para pensar que las 13 cepas seleccionadas pueden ser buenas productoras de bacteriocinas y que podrían representar una interesante línea de investigación en el futuro. Para aislar las bacteriocinas producidas, purificarlas, caracterizarlas e identificarlas y ver sus posibles usos.

También merece la pena destacar la detección de posibles bacteriocinas en otras especies no seleccionadas entre las 13 anteriormente descritas. La producción de sustancias antibacterianas tipo bacteriocina está ampliamente distribuida entre los diferentes grupos bacterianos conocidos. Los resultados de este estudio así lo corroboran, con el aislamiento de cepas productoras pertenecientes a 10 familias bacterianas diferentes. En *Actinobacteria*, destaca el aislamiento de tres cepas productoras pertenecientes al género *Arthrobacter*. Existen muy pocos estudios previos sobre producción de sustancias antimicrobianas en este género, especialmente las de tipo bacteriocina. Kamigiri et al. (1996) describieron que un aislado de *Arthrobacter* de suelo de Indonesia producía una sustancia antimicrobiana, pero se trataba de un antibiótico del grupo de las quinolonas. Hentschel et al. (2001) también aislaron cepas de este género productoras de antimicrobianos a partir de esponjas del Mediterráneo. O'Brien et al. (2004) describió un aislado de la Antártida productor de una sustancia antimicrobiana de naturaleza proteica, posiblemente una bacteriocina. Y Carnio et al. (1999), en un estudio sobre bacterias de quesos de maduración superficial franceses y alemanes aislaron una cepa de *Arthrobacter* productora de actividad antilisteria. En comparación con las bacterias del ácido láctico, en las que existen numerosos estudios sobre aplicación de bacteriocinas para combatir la proliferación de patógenos y alterantes en alimentos, no se han encontrado referencias sobre *Arthrobacter* aparte del estudio de Carnio et al. (1999). Las cepas aisladas en el presente trabajo podrían ser interesantes para su aplicación en el control de patógenos en leche y derivados lácteos. Cabe destacar que las tres cepas aisladas presentaron espectros antimicrobianos diferentes, lo que hace suponer que producen diferentes tipos de sustancias antibacterianas. Una de ellas además mostró actividad frente a todas las indicadoras ensayadas, tanto gram positivas como gram negativas. Esto resulta de un

especial interés ya que la mayoría de las bacteriocinas producidas solo son activas frente a un tipo de bacterias, pero no es común que presenten un espectro de acción amplio.

Entre las bacterias gram negativas, se detectaron cepas productoras pertenecientes a *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. Dentro de *Enterobacteriaceae*, se encontraron 10 cepas productoras pertenecientes al género *Enterobacter* y una a *Escherichia*. En el género *Enterobacter* hay muy pocas referencias sobre producción de bacteriocinas. Un primer estudio indicaba una incidencia elevada (27%) de producción de bacteriocinas en *E. cloacae* (Hamon y Pron, 1963). Así mismo, Smarda et al. (2007) encontraron 2 cepas de *Enterobacter* productoras de bacteriocinas de alto peso molecular (o corpusculares según los autores), y una productora de una bacteriocina de bajo peso molecular. Además, encontraron 12 cepas productoras de sideróforos (siendo este otro de los mecanismos conocidos de competencia entre bacterias). Con posterioridad, los estudios genómicos han puesto de manifiesto la presencia de genes para producción de colicina V y genes relacionados con la entericidina A/B y la piocina de tipo S, así como genes para la resistencia a colicina E2 (Liu et al., 2013). A diferencia de *Enterobacter*, la producción de bacteriocinas en *E. coli* ha sido ampliamente estudiada, y se conoce que este género produce al menos dos tipos de bacteriocinas según su tamaño (Budič et al., 2011): las denominadas colicinas (25-80 kDa) y las microcinas (< 10 kDa). Estas últimas son bastante más estables y se les ha atribuido un papel importante en las relaciones de amensalismo a nivel del intestino (Baquero et al., 2019). Cabría por tanto pensar que la capacidad de producción de bacteriocinas por aislados de leche materna pertenecientes a *Enterobacteriaceae* podría ser importante en la maduración de la microbiota intestinal del lactante.

En cuanto a *Pseudomonadaceae*, dos de las cepas de *Pseudomonas* productoras de presuntas bacteriocinas pertenecían a *Pseudomonas taiwanensis*, una bacteria descrita en suelo. Sin embargo, la tercera fue identificada como *P. fulva*, una bacteria originalmente aislada de ambientes naturales (como arroz, campos de petróleo

o branquias de molusco) pero también reconocida como patógeno oportunista para humanos (casos de meningitis, sepsis, o infecciones de tejidos blandos) (Cobo et al., 2016). Las dos cepas de *P. taiwanensis* podrían ser interesantes como fuente de nuevos antimicrobianos por su elevada actividad específica frente a *S. aureus*. Hasta el momento, se ha descrito la producción de diferentes tipos de bacteriocinas: tailocinas (similares a colas de fagos), bacteriocinas modulares, microcinas de tipo B, y bacteriocinas de tipo lectina (Ghequire y De Mot, 2014; Ghequire et al., 2018). Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre posibles aplicaciones de las bacteriocinas producidas por especies de *Pseudomonas* se han centrado en el control biológico de plagas (Parretet al., 2005), si bien los resultados del presente estudio podrían abrir nuevas aplicaciones (como por ejemplo en el control de mastitis provocadas por *S. aureus*).

Los resultados de esta tesis nos han proporcionado también información relevante sobre los cambios en la diversidad bacteriana de la leche humana de un solo individuo durante el período de lactancia tardía. Muchos estudios previos han abordado la composición microbiana de la leche humana, pero generalmente en una colección de muestras tomadas de diferentes individuos y tomadas fases tempranas de la lactancia. En un artículo de revisión reciente, Zimmermann y Curtis (2020) identificaron 44 estudios donde se investigaron 3105 muestras de leche materna procedente de 2655 mujeres, que informaron que los géneros encontrados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Veillonella* y *Bacteroides*. Otro artículo de revisión mostró que *Streptococcus* y *Staphylococcus* parecen ser ampliamente predominantes en la leche humana sin tener en cuenta las diferencias en la ubicación geográfica o los métodos analíticos (Fitzstevens et al., 2017).

Los resultados del presente estudio también identificaron los principales géneros encontrados en estudios anteriores (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium* y *Veillonella*), además de otros géneros

importantes. Además, la composición microbiana de varias muestras del presente estudio se parecía en cierto modo a la del microbioma salival de los niños descrita por otros autores (Mashima et al., 2017) (con los siguientes géneros comunes: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Leptotrichia*, *Haemophilus* y *Neisseria*). Estos resultados sugerirían la colonización de las glándulas mamarias por bacterias de la boca del bebé. De hecho, se considera que la leche humana está colonizada por bacterias del intestino y la piel de la madre o de la boca del bebé (Makino et al., 2013; Rodríguez 2014).

Streptococcus fue la unidad taxonómica predominante en 14 de las muestras analizadas. Cabe destacar que las muestras con menor abundancia relativa de *Streptococcus* tenían diferentes composiciones microbianas (incluidas *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Peptoniphilus* ...). Si bien las lecturas de secuencia obtenidas en el presente estudio solo permitieron la identificación a nivel de género, un estudio anterior informó de la presencia de las siguientes especies de *Streptococcus* en la leche humana: *S. mitis*, *S. infantis*, *S. cristatus*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. sanguinosus* (Boix-Amoros et al., 2016). Los estreptococos pueden producir diferentes tipos de sustancias antimicrobianas, incluyendo peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y bacteriocinas (Wescombe et al., 2009; Herrero et al., 2016) Los resultados obtenidos sugerirían un papel ecológico de los *Streptococcus* en el control de poblaciones microbianas en la leche materna. También se detectó *Staphylococcus* en todas las muestras de leche materna, con abundancias relativas que alcanzaron hasta el 14% en una muestra. Se ha sugerido que los estafilococos coagulasa negativos y los *estreptococos viridans* de la leche materna podrían reducir la adquisición de patógenos no deseados por los lactantes, especialmente cuando están expuestos a ambientes hospitalarios (Fernández et al., 2013; Park et al., 2011).

Al contrario de otros estudios, los *Lactobacillus* tuvieron una abundancia relativa baja en las muestras de leche estudiadas, y otros géneros relacionados (*Enterococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*) representaron menos del 2%. *Carnobacterium* estuvo

representado en dos muestras (2.1-3.8%). *Carnobacterium* rara vez se ha descrito en la leche humana. Un estudio mostró que la presencia de *Carnobacterium* en la leche se asociaba con un parto por cesárea (Cabrera-Rubio et al., 2012), lo cual está de acuerdo con el procedimiento de parto en el presente estudio. *Carnobacterium* podría ser un nuevo candidato, en gran parte inexplorado, para nuevas bacterias probióticas en la leche humana.

Los formadores de endosporas aerobias de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* también fueron importantes en varias muestras de leche. Sorprendentemente, el género *Bacillus* alcanzó una abundancia relativa del 25% en dos muestras (semanas 16 y 27). Ding et al. (2013) publicaron la presencia de *Bacillus* en el 87% de las muestras de leche materna estudiadas, mientras que Dahaban et al. (2017) y Boix-Amoros et al. (2011) describieron la presencia de esta bacteria en el 17% y en el 7% de las muestras de leche, respectivamente. Cacho et al. (2017) informaron una abundancia relativa de <1% para *Bacillus*. Patel et al. (2017) informaron además de la presencia de *Bacillus* y *Paenibacillus* en la leche humana, pero *Bacillus* se asociaba con mastitis subaguda o aguda. Sin embargo, durante el período de muestreo del presente estudio, la madre no informó ningún signo de mastitis.

Al menos 8 de las muestras de leche del presente estudio mostraron altas abundancias relativas de *Cupriavidus*. Los miembros del género *Cupriavidus* han sido aislados de múltiples nichos ecológicos, incluyendo agua potable no tratada, agua de estanques urbanos, suelo agrícola, suelo contaminado con metales pesados, suelo que contiene asfalto natural, plantas y muestras clínicas humanas (Ruiz et al., 2019). En particular, la especie *C. gilardii* está ganando cada vez más atención como un patógeno emergente resistente a múltiples fármacos (Ruiz et al., 2019). Todas las muestras con una alta abundancia relativa de *Cupriavidus* también tuvieron una mayor abundancia relativa de *Vulcaniibacterium*. *Vulcaniibacterium* es una bacteria moderadamente termófila asociada con ambientes calentados geotérmicamente (Niu et al., 2020). Sin embargo, estudios recientes informaron que *Vulcaniibacterium* forma parte de la comunidad bacteriana de la leche humana (Ding et al., 2019) y la glándula

digestiva de la ostra del Pacífico (King et al., 2020) Se desconoce el posible significado de esta bacteria en las muestras de leche humana que también tienen altas abundancias relativas de *Cupriavidus*. Sin embargo, se ha sugerido que tanto el medio ambiente, como los utensilios y el agua podrían contribuir considerablemente a la microbiota detectada en la leche materna (Fernández et al., 2020). También vale la pena mencionar que el bebé ya estaba en el período de destete. Es tentador sugerir que la posible transferencia de microbiota del bebé a la madre también podría explicar algunos de los cambios en la microbiota observados durante el período estudiado.

Los resultados del presente estudio también indicaron la presencia de representantes de un gran número de géneros bacterianos, aunque la mayoría de ellos tenían abundancias relativas muy bajas y estaban representados en solo unas pocas muestras. Tentativamente, estos resultados reflejarían contaminantes ambientales. Sin embargo, la ingestión de una microbiota diversa durante los primeros meses de vida podría ser importante para el entrenamiento del sistema inmunitario del bebé y posiblemente también para moldear su microbiota intestinal.

CONCLUSIONES

1. A partir de las 84 muestras de leche materna obtenidas de una madre durante 28 semanas de lactancia se ha obtenido una colección de 578 cepas bacterianas aisladas de diferentes medios de cultivo, con unos recuentos dentro de los normales para la leche materna.
2. La producción de sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina estaba ampliamente extendida entre los aislados, seleccionándose un total de 101 cepas que fueron identificadas como pertenecientes a 3 linajes, 10 familias y 11 géneros diferentes. Los 5 géneros más abundante fueron *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Enterococcus* y *Leuconostoc*.
3. La mayoría de las cepas bacteriocinogénicas eran capaces de crecer a concentraciones moderadas o elevadas de sal. Poco más de la mitad crecieron a pH 4,5 y el 36% crecía en presencia de sales biliares e hidrolizaba la esculina. Un porcentaje bajo tenía actividad ADNasa y era capaz de crecer en medios con refinosa o estaquirosa.
4. Se detectó una baja incidencia de genes para resistencia a antimicrobianos entre las cepas bacteriocinogénicas, si bien 33 de las cepas mostraron algún gen de resistencia a betalactámicos, 1 a tetraciclinas, 31 a aminoglucósidos y 11 a bombas de exporte.
5. El análisis global de la producción de bacteriocinas, seguridad, y características fisiológicas y funcionales de las cepas estudiadas nos permitió seleccionar 13 posibles cepas probióticas para futuros estudios: 4 *Leuconostoc mesenteroides*, 5 *Staphylococcus epidermidis*, 1 *Enterococcus thailandicus*, 1 *Streptococcus mitis*, 1 *Streptococcus thermophilus* y 1 *Bacillus cereus*.

6. Los resultados del estudio de biodiversidad bacteriana indicaron que la proporción de los principales filos encontrados (*Firmicutes* y *Proteobacteria*) cambia a lo largo del tiempo de lactancia. La disminución transitoria en la relación *Firmicutes/Proteobacteria* puede considerarse como una alteración de la microbiota normal de la leche.
7. Los índices de biodiversidad bacteriana fueron muy elevados, pero cambiantes entre semanas, detectándose más de 400 grupos bacterianos diferentes.
8. *Streptococcus* fue la unidad taxonómica más relevante detectada, pero con grandes oscilaciones en abundancia relativa entre muestras (del 2 al 68,8%).
9. *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Rothia* y *Veillonella* también se consideraron grupos importantes por su distribución y abundancias relativas en las muestras de leche.
10. Los resultados del estudio de biodiversidad sugieren un origen complejo de la microbiota de la leche materna que incluiría factores relacionados con el lactante, la madre y el ambiente, lo que explicaría las grandes diferencias encontradas entre muestras.

CONCLUDING REMARKS

1. Analysis of 84 human milk samples collected from a single mother during a 28-weeks lactation period indicated viable cell counts considered to be within normal values for human milk, and allowed the isolation of 578 strains from the different plating media used.
2. Production of bacteriocin-like substances was widespread among isolates. Identification of the 101 strains selected according to their bacteriocin production capacity revealed bacterial representatives of 3 phyla, 10 families and 11 genera. The five most-abundant genera were *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Enterococcus* y *Leuconostoc*.
3. Most of the bacteriocin-producing strains were able to grow at moderate to high salt concentrations. About half of them grew at pH 4.5 and 36% grew in the presence of bile salts and hydrolised aesculin. Only a low percentage showed DNase activity or were able to grow in media with raffinose or stachyose sugars.
4. There was a low prevalence of the antimicrobial resistance genes investigated among the bacteriocin-producing strains, although a few genes involved in resistance to beta-lactams (36 strains), tetracyclines (1 strain), aminoglycosides (31 strains) or efflux pump mechanisms (11 strains) were detected.
5. The comparative analysis of bacteriocin production capacity, safety, physiological and functional traits allowed us to select 13 strains as possible probiotic candidates for future studies: 4 *Leuconostoc mesenteroides*, 5 *Staphylococcus epidermidis*, 1 *Enterococcus thailandicus*, 1 *Streptococcus mitis*, 1 *Streptococcus thermophilus* and 1 *Bacillus cereus*.

6. The results obtained on bacterial diversity analysis indicated that the proportions of the main phyla detected (*Firmicutes* and *Proteobacteria*) changed during the lactation period. The transient decreases observed in the *Firmicutes/Proteobacteria* ratios suggested alterations of the normal microbiota of the milk.
7. Biodiversity indexes were high and different between sampling weeks, with over 400 bacterial groups detected.
8. *Streptococcus* was the most relevant taxonomic unit in the milk samples, although it showed large variations in relative abundance (from 2 to 68.8%) between samples.
9. The following bacterial groups were also considered to be relevant according to their relative abundances and distribution: *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Rothia* and *Veillonella*.
10. Results from the bacterial biodiversity analysis suggest a complex origin for the milk microbiota, including factors related to the baby, the mother and the environment that would explain the large differences found between samples.

BIBLIOGRAFÍA

Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185. doi: 10.1016/0168-1605(95)00055-0

Acuña, L., Corbalan, N.S., Fernandez-No, I.C., Morero, R.D., Barros-Velazquez, J., Bellomio, A. (2015). Inhibitory effect of the hybrid bacteriocin Ent35-MccV on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in model and food systems. *Food Bioproc. Technol.* 8, 1063-1075. doi: 10.1007/s11947-015-1469-0

Agel, E.N., Friend, B.A., Long, C.A., Shahani, K.M. (1982) Bacterial Content of Raw and Processed Human Milk. *J. Food Prot.* 45, 533-536. doi:10.4315/0362-028X-45.6.533.

Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 1-11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016

Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis in't Veld J.H.J., ten Brink B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, *J. Appl. Microbiol.* 84, 568-576.

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G. (2003). Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Le Lait*, INRA Editions. 83, 365-378. doi:10.1051/lait:2003024.

Aktypis, A., Tychowski, M., Kalantzopoulos, G. Aggelis, G. (2007). Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwen.* 92, 207-220. doi.org/10.1007/s10482-007-9148-4

Allameh, S.K., Daud, H.H., Yusoff, F.M., Saad, C.R., Ideris, A. (2012). Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *Afr. J. Biotechnol.* 11, 16. doi:10.5897/AJB11.1871

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu,D., Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939-2951. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9

Alves, F.C.B., Barbosa, L.N., Andrade, B., Albano, M., Furtado, F.B., Pereira, A. F. M., et al. (2016). Short communication: inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *J. Dairy Sci.* 99, 1831-1836. doi: 10.3168/jds.2015-10025

Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergård, T., Svanborg-Edén, C. (1986). Inhibition of Attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by Human Milk and Receptor Oligosaccharides, *Int. J. Infect. Dis.* 153, 232–237. doi.org/10.1093/infdis/153.2.232

Andreas, N.J., Kampmann, B., Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early Hum. Dev.* 91, 629–635. doi: 10.1016/J.EARLHUMDEV.2015.08.013

Andreas, N.J., Hyde, M.J., Gomez-Romero, M., Lopez-Gonzalvez, M.A., Villasenor, A., Wijeyesekera, A, et al. (2015). Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. *Electrophoresis.* 36(18), 2269-2285. DOI: 10.1002/elps.201500011

Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., et al. (2009). Effects of gasserins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *J. Dairy Sci.* 92, 2365-2372. doi: 10.3168/jds.2008-1240

Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernandez, A., et al. (2012) Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol.* 79(3):763-772. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108-160. doi: 10.1039/c2np20085f

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control* 22, 457-461. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.027

Bäckhed F, Roswall J, Feng, Q.P., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 17, 690-703. doi:10.1016/j.chom.2015.04.004

Bäckhed, F., Fraser, C., Ringel, Y., Sanders, M., Sartor, R., Sherman, P., et al. (2012). Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications *Cell Host and Microbe*. 12, 611-622 /doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012

Ballard O, Morrow A.L. (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North. Am.* 60, 49-74.

Baquero, F., Lanza, V.F., Baquero, M-R., del Campo, R., Bravo-Vázquez, D.A. (2019). Microcins in *Enterobacteriaceae*: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front. Microbiol.* 10, 2261. doi: 10.3389/fmicb.2019.02261

Beijerinck, M.W. (1901). Ueber Oligonitrophile Mikroben. *Zentral-blatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* 7, 561-582.

Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M., Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet. Res.* 48(1), 22. doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6

Benkerroum, N., Oubel, H., Ben Mimoun, L. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Yogurt Fermented with a Bacteriocin-Producing Thermophilic Starter. *J. Food Prot.* 65(5), 799-805. doi: 10.4315/0362-028X-65.5.799.

Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckaert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Butaye, P. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 44(8), 2897-2903. DOI: 10.1128/JCM.02549-05

Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe.* 17(6), 478-482. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009

Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur G., Vij, S., Kumar R. (2010). Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 156-164. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.001

Biagi, E., Aceti, A.R., Quercia, S., Beghetti, I., Rampelli, S., Turrone, S., et al. (2018). Microbial Community Dynamics in Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants. *Front. Microbiol.* 9, 2512. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02512

Bizani, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A., Terra, R.M., Souto, A.A., Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *Int. J. Microbiol.* 8(2), 125-31.

Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology.* 22(9), 1147-1162. doi:10.1093/glycob/cws074.

Boix-Amoros, A., Collado, M.C., Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front. Microbiol.* 7, 492. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492

Bokaeian M, Zahedani S, Bajgiran, S., Moghaddam, A. (2014). Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M Genes in Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Extended Spectrum β -Lactamases. *Jundishapur J. Microbiol.* 8, e13783. doi: 10.5812/jjm.13783. eCollection 2015.

Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou M.C. (1999). Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. Author links open overlay panel. *Meat Sci.* 51, 305-311 doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00120-X

Brenna, J.T., Varamini, B., Jensen, R.G., Diersen-Schade, D.A. Boettcher JA, Arterburn LM. (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(6), 1457-64. doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1457

Breukink, E., Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 321-323. doi: 10.1038/nrd2004

Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž., Žgur-Bertok, D. (2011). *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE* 6(12), e28769. doi:10.1371/journal.pone.0028769.

Butte, N.F., Garza, C., Stuff, J.E., Smith, E.O., Nichols, B.L. (1984) Effect of maternal diet and body composition on lactational performance. *Am. J. Clin. Nutr.* 39(2), 296-306.

Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 96(3), 544-551. doi:10.3945/ajcn.112.037382

Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 544-51. doi.org/10.3945/ajcn.112.037382

Cacho, N.T., Lawrence R.M. (2017). Innate Immunity and Breast Milk. *Front Immunol.* 29, 584. doi: 10.3389/fimmu.2017.00584.

Cacho, N.T., Harrison, N.A., Parker, L.A., Padgett, K.A., Lemas, D.J., Marcial, G.E., et al. (2017). Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Front. Microbiol.* 8, 1470. doi: 10.3389/fmicb.2017.01470.

Cahn, A. (1901). Ueber die nach Gram fiirbbaren Bacillen des Sauglingsstuhle. Cent. F. Bakt. 30, 721-726.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Carnio, M.C., Eppert, I., Scherer, S. (1999). Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. Int. J. Food Microbiol. 47, 89-97.

Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol. 145, 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. (2011). Fierer, Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 4516-4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107

Carson, D.A., Barkema, H.W., Naushad, S., De Buck, J. (2017). Bacteriocins of Non-aureus Staphylococci Isolated from Bovine Milk. Appl. Environ. Microbiol. 83, e01015-17. doi: 10.1128/AEM.01015-17.

Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., Perez-Cano, F.J., Castell, M., Moretones, M.G., et al. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. J. Nutr. 141, 1181-7. doi.org/10.3945/jn.110.133652

Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., Yáñez-Fernández, J. (2015) Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. Prob. Antimicrob. 7, 107-117. doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., Collins, K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganism in functional dairy foods. Int. J. Dairy Technol. 51, 123-136.

Chen C, Yin Q, Wu H, Cheng L, Kwon JI, Jin J, et al. (2020). Different Effects of Premature Infant Formula and Breast Milk on Intestinal Microecological Development in Premature Infants. *Front. Microbiol.* 10, 3020. doi:10.3389/fmicb.2019.03020. ISSN=1664-302X.

Chen, H., Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 82-100. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x

Chien-Wei, W., Li-Jung, Y., Shann-Tzong, J. (2004). Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus*. *ACCEL J. Agric. Food Chem.* 52, 5, 1146–1151 doi.org/10.1021/jf035100d

Chiu, C.-H., Su, L.-H., Chu, C.-H., Wang, M.-H., Yeh, C.-M., Weill, F.-X., Chu, C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44(7), 2354-2358. DOI: 10.1128/JCM.00171-06

Chu, D., Ma, J., Prince, A., Antony, K., Seferovic, M., Aagaard, K. (2017) Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat. Med.* 23, 314–326 <https://doi.org/10.1038/nm.4272>

Cintas, L., Casaus, P., Fernández, M., Hernández, P. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15, 289-298. doi: 10.1006/fmic.1997.0160

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8

Cobo, F., Jiménez, G., Rodríguez-Granger, J., Sampedro, A. (2016). Posttraumatic Skin and Soft-Tissue Infection due to *Pseudomonas fulva*. *Case Rep. Infect. Dis.* 2016, 8716068. doi: 10.1155/2016/8716068.

Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy Journal.* 8, 487-490.

Cong, X., Judge, M., Xu, W., Diallo, A., Janton, S., Brownell, E.A., et al. (2017). Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants. *Nursing research*, 66(2), 123–133. <https://doi.org/10.1097/NNR.000000000000208>

Coppa, G.V., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., Giorgi, P.L. (1993). Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*. 91(3), 637-641.

Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., Gabrielli, O. (1999) Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl*. 88(430), 89-94.

Coton, E., Rollan, G.C., Lonvaud-Funel, A. (1998). Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the hdc gene. *J. Appl. Microbiol.* 84, 143–151. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00271.x

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777-788. doi: 10.1038/nrmicro1273

Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95-105. doi: 10.1038/nrmicro2937

Cravioto, A., Tello, A., Villafán, H., Ruiz, J., del Vedovo S., Neeser J.R. (1991). Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect. Dis.*163(6), 1247-1255. doi:10.1093/infdis/163.6.1247

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., De Souza Oliveira, R.P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 64, 527-536. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.041

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J., Simard, R.E., Huang, J., Lacroix, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12), 3450-3455. doi:10.1128/aem.57.12.3450-3455.1991.

Dahaban, N.M., Romli, M.F., Roslan, N.R., Kong, S.S., Cheah, F.C. (2013). Bacteria in expressed breastmilk from mothers of premature infants and maternal hygienic status. *Breastfeeding Med.* 8, 422-3.

Dajani, A.S., Veres, C.M., Law, D.J. (1978). Substances that interfere with action of viridin B, a *Streptococcus mitis* bacteriocin. *Infec. Inmun.* 20, 20–24.

Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 58-65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016

de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., Penna, T.C.V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 146-154. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.056

De las Rivas, B., Marcobal, A., Muñoz, R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines *FEMS Microbiol. Letters.* 244 (2). doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.012

De Paula, A.T., Jeronymo-Ceneviva, A.B., Silva, L.F., Dimitrov, S., Mello Franco, B., Barreto Penna, A. (2015). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiol.* 65(2), 899-910. doi: 10.1007/s12602-014-9163-5.

de Souza Barbosa, M., Todorov, S.D., Ivanova, I., Chobert, J.M., Haertlé, T., De Melo Franco, B.D.G. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiol.* 46, 254-262. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.004

De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194-199. doi: 10.1159/000104752

Dewey, K.G., Strode, M.A., Lonnerdal, B. (1986) Human lactation II maternal and environmental factors. New York: Plenum Press. Dewey KG FD, Strode MA, Lonnerdal B. Human lactation II maternal and environmental factors. New York: Plenum Press.

Ding, M., Qi, C., Yang, Z., Jiang, S., Bi, Y., Lai, J., Sun, J. (2019). Geographical location specific composition of cultured microbiota and *Lactobacillus* occurrence in human breast milk in China. *Food Funct.* 10, 554-64. doi: 10.1039/C8FO02182A

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 107(26), 11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107.

Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabol.* 13(5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>.

Douglas, C.A., Ivey, K.L., Papanicolas, L.E. Best, K., Muhlhausler, B., Rogers, et al. (2020). DNA extraction approaches substantially influence the assessment of the human breast milk microbiome. *Sci. Rep.* 10, 123. doi.org/10.1038/s41598-019-55568-y

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin.* 73(2 Suppl), 386S-392S.

Durán, Z., Guevara, A.R., Rodríguez, C., Carmona, L.C., Alcoba, V.L. (2008). Calidad microbiológica de la leche humana procesada en el Banco de Leche Materna. Hospital Ruiz y Páez. Ciudad Bolívar.

Eaton, T.J., Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628-1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001

EFSA (2007). Scientific committee. introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA1. Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2005-293. *EFSA J.* 587, 1-16.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2019). Update of the list of QPS recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019 EFSA J. 17(7), 5753 doi: 10.2903/j.efsa.2019.5753

Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? Front. Microbiol. 7, 461. doi: 10.3389/fmicb.2016.00461

Eijsink, V.G., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. (1998). Comparative studies of class Ila bacteriocins of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3275-3281.

Eiwegger T., Stahl B., Haidl P., Schmitt, J., Boehm, G., Dehlink, E., et al. (2010). Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. Pediatr Allergy Immunol. 21(8), 1179-1188. doi:10.1111/j.1399-3038.2010.01062.x

El-Jeni, R., El Bour, M., Calo-Mata, P., Böhme, K., Fernández-No, I.C., Barros-Velázquez, J., Bouhaouala-Zahar, B. (2016). In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. Can. J. Microbiol. 62, 60-71. doi:10.1139/cjm-2015-0481.

Fagundes, P.C., De Farias, F.M., Da Silva Santos, O.C., Da Paz, J.A.S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D.S., et al. (2016). The four-component aureocin A70 as a promising agent for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. 237, 39-46. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.017

Fagundes, P.C., Farias, F.M., Santos, O.C., de Oliveira, N.E., da Paz, J.A., Ceotto-Vigoder, H., et al. (2016). The antimicrobial peptide aureocin A53 as an alternative agent for biopreservation of dairy products. J. Appl. Microbiol. 121(2), 435-44. doi: 10.1111/jam.13189.

FAO and WHO (2006). Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Rome: FAO.

Favaro, L., Penna, A.L.B., Todorov, S.D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses—application in biopreservation? *Trends Food Sci. Technol.* 41, 37-48. doi: 10.1016/j.tifs.2014.09.001

Feng, P., Gao, M., Burgher, A., Hui Zhou, T., Pramuk, K. (2016). A nine-country study of the protein content and amino acid composition of mature human milk. *Food Nutr. Res.* 60:31042. doi: 10.3402/fnr.v60.31042.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J.M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* 69(1), 1-10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., et al. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* 69, 1-10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001.

Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2020). Human Milk Microbiota: Origin and Potential Uses. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* 94, 1-11. doi: 10.1159/000505031.

Fernández, L., Ruiz, L., Jara, J., Orgaz, B., Rodríguez, J.M. (2018). Strategies for the Preservation, Restoration and Modulation of the Human Milk Microbiota. Implications for Human Milk Banks and Neonatal Intensive Care Units. *Front. Microbiol.* 9, 2676. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02676>

Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94(3), 449-55. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x|

Fitzstevens, J.L., Smith, K.C., Hagadorn, J.I., Caimano, M.J., Matson, A.P., Brownell, E.A. (2017). Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr. Clin. Pract.* 32(3), 354-364. doi: 10.1177/0884533616670150.

Flidel-Rimon, O., Roth, P. (1997). Effects of milk-borne colony stimulating factor-1 on circulating growth factor levels in the newborn infant. *J. Pediatr.* 131(5):748-50.

Ford, A.C., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., et al. (2014). Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome

and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1547-61. doi: 10.1038/ajg.2014.202.

Fremaux, C., Héchard, Y., Cenatiempo, Y. (1995). Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiol.* 141(7), 1637-45. doi:10.1099/13500872-141-7-1637.

Fujita, M., Roth, E., Lo, Y.J., Hurst, C., Vollner, J., Kendell, A. (2012) In poor families, mothers' milk is richer for daughters than sons: a test of Trivers-Willard hypothesis in agropastoral settlements in Northern Kenya. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 149(1), 52-59. DOI: 10.1002/ajpa.22092.

Gálvez, A. (1984). Producción de sustancias antibacterianas por estreptococos del grupo D. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.

Galvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 125-152. doi: 10.1080/07388550802107202

Garsa, A.K., Kumariya, R., Kumar, A., Lather, P., Kapila, S., Sood, S. (2014). Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. *LWT Food Sci. Technol.* 59, 656-665. doi: 10.1016/j.lwt.2014.07.008

Gautam, N., Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.* 49, 204-211. doi.org/10.1007/s12088-009-0048-3

German, J.B., Freeman, S.L., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. (2008). Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutrition workshop series. Paediatric Prog.*, 62, 205–222. <https://doi.org/10.1159/000146322>

Guerra, B., Soto, S. M., Argüelles, J.M., Mendoza, M.C. (2001). Multidrug Resistance Is Mediated by Large Plasmids Carrying a Class 1 Integron in the Emergent *Salmonella enterica* Serotype [4,5,12:i:-] *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1305-8 DOI: 10.1128/AAC.45.4.1305–1308.2001

Ghequire M.G., De Mot, R. (2014). Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. FEMS Microbiol. Rev. 38(4), 523-68. doi: 10.1111/1574-6976.12079.

Ghequire, MGK., Öztürk, B., De Mot, R. (2018). Lectin-Like Bacteriocins. Front. Microbiol. 9, 2706. doi: 10.3389/fmicb.2018.02706.

Gilbreth, S.E., Somkuti, G.A. (2005). Thermophilin 110: A Bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. Curr. Microbiol. 51, 175-182. doi: 10.1007/s00284-005-4540-7

Giles-Gómez, M., Sandoval-García, J.G., Matus, V., Campos-Quintana, I., Bolívar, F. Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from *pulque*, a Mexican traditional alcoholic beverage. Springerplus. 5, 708.

Gilliland, S.E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 175-188

Gómez Gallego, C., Pérez Conesa, D., Bernal Cava, M.J., Periago Castón, M.J., Ros Berruezo, G. (2009) Compuestos funcionales de la leche materna. Enferm. glob. [Internet]. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412009000200020&lng=es.

Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., Collado, M.C. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. Semin. Fetal Neonatal Med. 21, 400–405. doi: 10.1016/j.siny.2016.05.003

Götz, F., Perconti, S., Popella, P., Werner, R., Schlag, M. (2014). Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics. Int. J. Med. Microbiol. 304(1), 63-71. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.08.012

Grande, M.J., Pulido, R.P., Aguayo, M.C.L., Gálvez, A., Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. Int. J. Mol. Sci. 15, 22706-22727. doi: 10.3390/ijms151222706

Gray, M.A., Greenwell, J.R. Argent, B.E. (1988) Secretin-regulated chloride channel on the apical plasma membrane of pancreatic duct cells. *J. Membr. Biol.* 105, 131–142 <https://doi.org/10.1007/BF02009166>

Gregory, K.E., Samuel, B.S., Houghteling, P., Shan, G., Ausubel, F.M., Sadreyev, R.I., Walker, A. (2016) Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome.* 4(1):68. doi:10.1186/s40168-016-0214-x

Grier, A., Qiu, X., Bandyopadhyay, S., Holden Wiltse, J., Kessler, H., Gill, A., et al. (2017). Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and preterm infant growth. *Microbiome* 5, 158 <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0377-0>

Guillilan, S.E., Speak, M.L. (1977). Antagonistic action of *L. acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* 40(11), 820-823

Gutiérrez-Castrellón, P., Mora-Magaña, I., Díaz-García, L., Jiménez-Gutiérrez, C., Ramirez-Mayans, J., Solomon-Santibáñez, G. (2007). Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: Systematic review and meta-analysis. *British J. Nutr.* 98(S1), S64-S67. doi:10.1017/S000711450783296X

Hamon, Y., Pron, Y. (1963). Etude de pouvoir bactériocinogène dans le genre *Cloaca* [Study of the bacteriocinogenic ability in the genus *Cloaca*]. *Ann. Inst. Pasteur* 104, 127-131

Hanson, L.A., Korotkova, M., Håversen, L., Mattsby Baltzer, I., Zoric, M., Silfverdal, S., et al. (2002) Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Int.* 44(4), 347-352.

Hécharde, Y., Berjeaud, J.M., Cenatiempo, Y. (1999). Characterization of the mes B gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Curr. Microbiol.* 39(5), 265-269. doi:10.1007/s002849900457.

Heikkilä, M.P., Saris, P.E. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl Microbiol.* 95(3), 471-478. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C. Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. FEMS Microbiol. Ecol. 35, 305-312. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00816.x

Hernández-Saldaña, O.F., Valencia-Posadas, M., de la Fuente-Salcido, N.M., Bideshi, D.K., Barboza-Corona, J.E. (2016). Bacteriocinogenic Bacteria Isolated from Raw Goat Milk and Goat Cheese Produced in the Center of México. Indian J. Microbiol. 56(3), 301-308. doi: 10.1007/s12088-016-0587-3.

Herrero, E.R., Slomka, V., Bernaerts, K., Boon, N., Hernandez-Sanabria, E., Passonial, BB., et al. (2016). Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors. J. Dent. 47, 23-33. doi: 10.1016/j.jdent.2016.02.007.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis In't Veld, J.H. (1998) Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41, 85-101.

Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. PLoS One 6:e21313. doi: 10.1371/journal.pone.0021313.

Hyttén, F.E. (1954) Clinical and chemical studies in human lactation. Br Med J. 1(4855):175-82.

Ibarguren, C., Céliz, G., Díaz, A.S., Bertuzzi, M.A., Daz, M., Audisio, M.C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 28, 66-72. doi: 10.1016/j.ifset.2015.01.007

Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D. B. (1987). High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* stains associated with human parenteral infections. J. Clin. Microbiol. 25: 1524-1528.

Ingolf, F.N., Yoon, S., Dzung, B.D. (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. Food SCI Biotechnol. 16, 675 - 690

Innis, S.M. (1992) Human milk and formula fatty acids. *J Pediatr.* 120(4 Pt 2), S56-61

Insull, W., Hirsch, J., James, T., Ahrens, E.H. (1959). The fatty acids of human milk. II. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. *The J. Clin. Invest.* 38(2), 443-50.

Isaacs, C.E., Litov, R.E., Thormar, H. (1995) Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *J. Nutr. Biochem.* 6(7), 362-366. doi:10.1016/0955-2863(95)80003-u

Ivanova, I., Mitevab, A.V., Stefanovac, T.S., Panteval, A., Budakovb, S., Danovaa, S., et al. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.* 42(3), 147-158. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00067

Jamuna, M., Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 433-439. doi: 10.1007/s00253-004-1576-8

Jang, I.T., Yang, M., Kim, H.J., Park, J.K. (2020). Novel Cytoplasmic Bacteriocin Compounds Derived from *Staphylococcus epidermidis* Selectively Kill *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pathogens.* 9(2). doi: 10.3390/pathogens9020087.

Jenness R. (1979) The composition of human milk. *Semin. Perinatal* 3: 229-239

Jensen, R.G. (1989) The lipids in human milk. CRC press, Boca Raton FL.

Jensen, R. (1995). *Handbook of Milk Composition*. San Diego: Academic Press, Inc.

Jetten, M., Vogels G.D. (1972). Nature and Properties of a *Staphylococcus epidermidis* Bacteriocin. *J. Bacteriol. Res.* 112 (1), 243-250. <https://j.b.asm.org/content/jb/112/1/243>.

Jetten, M., Vogels G.D., de Windt, F. (1972). Production and Purification of a *Staphylococcus epidermidis* Bacteriocin. J. Bacteriol. Res. 112(1), 235-242. doi: 10.1128/JB.112.1.243-250.1972

Jetten, M., Vogels, G.D. (1972). Mode of Action of a *Staphylococcus epidermidis* Bacteriocin. Antimicrob Agents Chemother. 2 (6), 456-463. doi: 10.1128/AAC.2.6.456.

Jeurink, P.V., Bergenhenegouwen, J.V., Jiménez, E., Knippels, L.M., Fernández, L., Garssen, J. et al. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. Benef. Microbes, 4 (1), 17-30 . doi.org/10.3920/BM2012.0040

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2008). Oral Administration of *Lactobacillus* Strains Isolated from Breast Milk as an Alternative for the Treatment of Infectious Mastitis during Lactation Appl. Environ Microbiol. 74, 4650-4655. doi: 10.1128/AEM.02599-07

Johansson, M.-L., Molin, G., Jeppson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. Appl. Environ. Microbiol. 59, 15-20.

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. Brit. J. Nutr. 110(7), 1253-1262. doi:10.1017/S0007114513000597.

Kabuki, H., Uenishi, M., Watanabe, Y., Seto, H., Nakajima, H. (2007) Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277 T. J. Appl. Microbiol. 102(4), 971-80. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03159.x

Kader, M.M., Bahgat, R., Aziz, M.T., Hefnawi, F., Badraoui, M.H., Younis, N., et al. (1972) Lactation patterns in Egyptian women. II. Chemical composition of milk during the first year of lactation. J. Biosoc. Sci. 4(4), 403-9

Kamigiri, K., Tokunaga, T., Shibasaki, M., Setiawan, B., Rantiatmodjo, R.M., Morioka, M. Suzuki, K-I. (1996). YM-30059, a novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp. J. Antibiot. 49, 823-825.

Keim, S.A., Hogan, J.S., McNamara, K.A., Gudimetla, V., Dillon, C.E., Kwiek, J. J., Geraghty, S.R. (2013). Microbial contamination of human milk purchased via the Internet. *Pediatrics*, 132(5), e1227–e1235. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1687>

Kekkonen, R.A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R., Julkunen, I. (2008). Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN-gamma production. *World J. Gastroentero.* 14(8), 1192-1203. doi: 10.3748/wjg.14.1192.

Khan, I., Oh, D. -H. (2016). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 34, 376-384. doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.013

King, W.L., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K.R., et al. (2020). Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28. doi: 10.1093/femsec/fiaa054.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-85. doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x

Kobata, A. (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys. Biol. Sci.* 86(7), 731-747. doi:10.2183/pjab.86.731

Koletzko, B., Mrotzek, M., Bremer, H.J. (1988) Fatty acid composition of mature human milk in Germany, *Am. J. Clin. Nutr.* 47(6), 954–959. doi.org/10.1093/ajcn/47.6.954

Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R., Sauerwald, T. (2001) Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum. Dev.* 65(S3-S18). doi: 10.1016/s0378-3782(01)00204-3

Koletzko, B., Thiel, I., Abiodun, P.O. (1992). The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. *J. Pediatr.* 120(4 Pt 2), S62-70.

Kramer, M.S., Guo, T., Platt, R.W., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Collet, J.P., et. al. (2003) Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding, *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (2), 291–295, <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.2.291>

Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. (2009). Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br. J. Nutr.* 101(9):1306-15. doi.org/10.1017/S0007114508079622

Kykkidou, S., Pournis, N., Kostoula, O. K., Savvaidis, I.N. (2007). Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4 C. *Int. Dairy J.* 17, 1254-1258. [doi: 10.1016/j.idairyj.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.006)

Lackey, K.A., Williams, J.E., Meehan, C.L., Zacek, J.A., Benda, E.D., Price, W.J., et. al. (2019) What's Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. *Front. Nutr.* 6, 45. [doi=10.3389/fnut.2019.00045](https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00045), ISSN=2296-861X.

Ladomenou, F., Moschandreas, J., Kafatos, A., Tselentis, Y., Galanakis, E. (2010). Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. *Arch. Dis. Child.* 95(12), 1004-1008. [doi:10.1136/adc.2009.169912](https://doi.org/10.1136/adc.2009.169912)

Laryea, M.D., Leichsenring, M., Mrotzek, M., El-Amin, E.O., El-Kharib, A.O., Ahmed, H.M., Bremer, H.J. (1995) Fatty acid composition of the milk of well-nourished Sudanese women, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 46(3), 205-214, [doi: 10.3109/09637489509012550](https://doi.org/10.3109/09637489509012550)

Latuga, M.S., Stuebe, A.M., Seed, P.C. (2014). A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Seminars Rep. Med.* 32, 68-73 . [doi:10.1055/s-0033-1361824](https://doi.org/10.1055/s-0033-1361824).

Lauková, A., Czikková, S. (1999). The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 182-182. [doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00810.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00810.x)

Lauková, A., Vlaemynck, G., Czikkova, S. (2001). Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. *Folia Microbiol.* 46, 157-160. doi: 10.1007/BF02873596

Lawrence RA LR. (2005). *Breastfeeding A Guide for the Medical Profession.* 6 ed2005. Elsevier.

Lawrence, R.M., Lawrence, R.A. (2004) Breast milk and infection. *Clin. Perinatol.* 31(3):501-28. doi: 10.1016/j.clp.2004.03.019

Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J., Courvalin, P. (1989). Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 33, 10-15

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67-78. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.004

Leroy, F., De Vuyst, L. (2010). Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* 65, 143-149.

Lewis, Z.T., Totten, S.M., Smilowitz, J.T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D.G., et al. (2015). Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome.* 3, 13. doi.org/10.1186/s40168-015-0071-z

Li, N., Shi, J. (2020). *Lactobacillus rhamnosus* from human breast milk shows therapeutic function against foodborne infection by multi-drug resistant *Escherichia coli* in mice. *Food Funct.* 29;11(1), 435-447. doi: 10.1039/c9fo01698h.

Liu, W-Y., Wong, C-F., Chung, KM-K., Jiang, J-W., Leung, FC-C. (2013) Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE* 8(9), e74487. doi:10.1371/journal.pone.0074487

Lönnerdal, B., (2003) Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(6), 1537S-1543S. doi:10.1093/ajcn/77.6.1537S.

Lonnerdal, B., Forsum, E., Gebre-Medhin, M., Hambraeus, L. (1976) Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. II. Lactose, nitrogen, and protein contents. *Am. J. Clin. Nutr.* 29(10), 1134-41.

Lopez, C., Ménard, O. (2011) Human milk fat globules: polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 83(1), 29-41. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.039

Lucas, R., Grande, M.J., Abriouel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., Valdivia, E., et al. (2006). Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1774-1781. doi: 10.1016/j.fct.2006.05.019

Machaidze, G., Seelig, J. (2003). Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments. *Biochemistry* 42, 12570-12576. doi: 10.1021/bi035225b

Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., et. al. (2013). Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS ONE*, 8(11), e78331. doi: e78331 10.1371/journal.pone.0078331.

Marianelli, C., Cifani, N., Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res. Microbiol.* 161(8), 673-80. doi.org/10.1016/j.resmic.2010.06.007

Mario, O., Vidal, L.K., Rey-Nores, J.E., Arias, M., Vita, N. Morgan, B.P., et. al. (2000) Innate Recognition of Bacteria in Human Milk Is Mediated by a Milk-Derived Highly Expressed Pattern Recognition Receptor, Soluble Cd14. *J. Exp. Med.* 191 (10), 1807–1812. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.191.10.1807>

Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80(6), 1031-7.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Langa, S. Reviriego, C., Jiménez, E., et. al. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143(6), 754-758. doi:10.1016/j.jpeds.2003.09.028

Martin, R.M., Gunnell, D., Owen, C.G., Smith, G.D., (2005) Breast-feeding and childhood cancer: A systematic review with metaanalysis. *Int. J. Cancer* 117(6), 1020-1031. doi:10.1002/ijc.21274

Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R.D., Fernández, L., et. al. (2012). Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *J. Hum. Lact.* 28, 36-44. doi:10.1177/0890334411424729.

Martínez-Bueno, M. (1986). Inducción y curación de la producción de sustancias antimicrobianas por *Streptococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48. Memoria de Licenciatura, Universidad de Granada.

Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., Peláez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *Int. Dairy J.* 20, 18-24. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.07.005

Martins, F.S., Silva, A.A., Vieira, A.T., Barbosa, F.H., Arantes, R.M., Teixeira, M.M., et. al. (2009). Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch. Microbiol.* 191(8), 623-30. doi.org/10.1007/s00203-009-0491-x

Mashima, I., Theodorea, C.F., Thaweboon, B., Thaweboon, S., Scannapieco, F.A., Nakazawa, F. (2017). Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLoS ONE*, 12 (9), e0185274. doi: 10.1371/journal.pone.0185274.

Mathieu, F., Sudirman-Suwandhi, I., Rekhif, N., Millière, J.B., Lefebvre. G. (1993). Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J. Appl. Microbiol.* 74(4), 372-9. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb05141.

Mattila-Sandholm, T., Matto, J., Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy. J.* 9, 25-37.

McAuliffe, O., Ryan, M.P., Ross, R.P., Hill, C., Breeuwer, P., Abee, T. (1998). Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 439-445.

McFarland, L.V. (2014). Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. *BMJ Open.* 4(8): e005047. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005047

McGuire, M.K., McGuire, M.A., (2015) Human milk: mother nature's prototypical probiotic food?. *Adv. Nutr.* 6(1):112-123. Published 2015 Jan 15. doi:10.3945/an.114.007435

Mélanie, L.B., Anhe, F., Varin, T., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, et. al. (2015). Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders Diabetes *Metab. J.* 2015 39, 291-303 doi.org/10.4093/dmj.2015.39.4.291

Melo, J., Andrew, P., and Faleiro, M. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. *Food Res. Int.* 67, 75-90. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.031

Metchnikoff, E. (1908). *The Prolongation of Life.* Translated by P. C. Mitchell, New York.

Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., et al. (2006). Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C. *J. Biol. Chem.* 281, 18033-18042. doi: 10.1074/jbc.M513174200

Michaelsen, K.F., (1997) Nutrition and growth during infancy. The Copenhagen Cohort Study. *Acta Paediatr Suppl.* 420, 1-36

Michaelsen, K.F., Skafté, L., Badsberg, J.H., Jørgensen, M. (1990). Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk

banking. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 11(2), 229-239. doi:10.1097/00005176-199008000-00013

Michalski, M.C., Briard, V., Michel, F., Tasson, F., Poulain, P. (2005) Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. J. Dairy Sci. 88(6), 1927-1940. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72868-X

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, Turroni, C., Mahony, J., et. al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 81(4), e00036-17. doi:10.1128/MMBR.00036-17

Mills, S., Serrano, L., Griffin, C., O'connor, P. M., Schaad, G., Bruining, C., et al. (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. Microbial Cell Factories 10, S7. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S7

Mira, A., Rodríguez, J.M. (2017). Chapter 13: Origen of the human milk. pp. 349-360. Prebiotics and Probiotics in Human Milk. Acad. Press. doi:10.1016/B978-0-12-802725-7.00013-0

Mitra, S., Mukhopadhyay, B. C., Biswas, S. R. (2011). Potential application of the nisin Z preparation of *Lactococcus lactis* W8 in preservation of milk. Lett. Appl. Microbiol. 53, 98-105. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03075.x

Molinari, C.E., Casadio, Y.S., Hartmann, B.T., Livk, A., Bringans, S., Arthur, P.G., Hartmann, P.E. (2012). Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. J. Proteome Res. 11(3), 1696-1714. doi:10.1021/pr2008797

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol. 106, 1-24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026

Morgan, S., Galvin, M., Ross, R., and Hill, C. (2001). Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. Lett. Appl. Microbiol. 33, 387-391. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.01016.x

- Moro, E. (1900). Ueber den *Bacillus acidophilus*. Jahrb. F. Kinderh. 52, 38-55.
- Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M.L., Meinen-Derr, J.K., et al. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. J. Pediatr. 145(3), 297-303. doi:10.1016/j.jpeds.2004.04.054
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., et al. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: bactericidal synergism with heat. Int. Dairy J. 17, 760-769. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.09.006
- Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., Yoshikai, Y. (1998). Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. J. Allergy Clin. Immunol. 102(1), 57-64.
- Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M., De Felice, M. (1993). Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 59 (12), 4313-4316.
- Nakamura, S., Kuda, T., An, C., Kanno, T., Takahashi, H., Kimura, B. (2012) Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. Anaerobe. 18(1), 19-24. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.11.006.
- Narsaiah, K., Wilson, R. A., Gokul, K., Mandge, H., Jha, S., Bhadwal, S., et al. (2015). Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). Postharvest Biol. Technol. 100, 212-218. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.10.003
- Neville, M. (1983). Handbook of Milk Composition. American press, San Diego, Ca.
- Newburg, D.S., (2005). Innate immunity and human milk. J. Nutr. 135(5), 1308-1312. doi:10.1093/jn/135.5.1308.

Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molec. Cell. Probes*, 15(4), 209-215. doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363

Nikaido, E., Shirotsuka, I., Yamaguchi, A., Nishino, K. (2011). Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. *Microbiol.* 157, 648–655. doi.org/10.1099/mic.0.045757-0

Niu, X.K., Narsing Rao, M.P., Dong, Z.Y., Kan, Y., Li, Q.R., Huang, J., et. al. (2020). *Vulcaniibacterium gelatinicum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70(3),1571-1577. doi: 10.1099/ijsem.0.003934

Noble, W.G., Virani, Z., Cree, R.G.A. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 195-198

O'Sullivan, J.N., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Hill, C., Ross, R.P. (2019). Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95(2). doi: 10.1093/femsec/fiy241

O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N.J., Roller, S. (2004). Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 157-167. doi.org/10.1016/j.femsec.2004.01.001

O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 51-57. doi: 10.1016/j.cofs.2015.01.004

O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C., Fitzgerald, G. F. (2001). The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 90, 106-114. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01222.x

O'Sullivan, L., Ryan, M.P., Ross, R.P., Hill, C. (2003). Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3681-3685. doi: 10.1128/AEM.69.6.3681-3685.2003

Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Tompa, G., Treven, P., Lorbeg, P.M., Matijašič, B.B., Rogelj, I. (2015). Colostrum of healthy Slovenian mothers: microbiota composition and bacteriocin gene prevalence. *PLoS One*. 10(4), e0123324. doi: 10.1371/journal.pone.0123324. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One*. (2015). 10(6), e0132201. doi: 10.1371/journal.pone.0132201.

Okada, M., Ohmura, E., Kamiya, Y., Murakami, H., Onoda, N., Iwashita, M., et al. (1991). Transforming growth factor (TGF)-alpha in human milk. *Life Sci*. 48(12), 1151-6.

Olivares, M., Albrecht, S., De Palma, G., Ferrer, M.D., Castillejo, G. et al. (2012). Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur. J. Nutr*. 54, 119–128 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0692-1>

Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J. (2006a). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol*. 101(1),72-9. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x|

Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M., et.al. (2007). Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*. 23(3), 254-60. doi.org/10.1016/j.nut.2007.01.004

Olivares, M., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Boza, J., et al. (2007). Efectos beneficiosos de los probióticos de la leche materna. *Acta Pediatr. Esp*. 66: 183-188.

Oscáriz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A.G. (1999). Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett*. 178(2), 337-41. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08696.x

Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G. (2000). Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *J. Appl. Microbiol*. 89(2), 361-369. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01123.x

Oshima, S., Hirano, A., Kamikado, H., Nishimura, J., Kawai, Y., Saito, T. (2014). Nisin A extends the shelf life of high-fat chilled dairy dessert, a milk-based pudding. *J. Appl. Microbiol*. 116, 1218-1228. doi: 10.1111/jam.12454

Oumer, A., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (2001). The effects of cultivating lactic starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 64, 81-86. doi: 10.4315/0362-028X-64.1.81

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., Salminen, S. (1999). Probiotics mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9, 43-52.

Pannaraj, P.S., Li, F., Cerini, C. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut. *JAMA Pediatr.* 171(7), 647-654. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378

Pannaraj, P.S., Li, F., Cerini, C., Meehan, C.L., Lackey, K.A., Hagen, E.H., et al. (2017). Social networks, cooperative breeding, and the human milk microbiome. *Am. J. Hum. Biol.* 2018; 30:e23131. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23131>. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr.* 171(7), 647–654. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378

Park, B., Iwase, T., Liu, G.Y. (2011). Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS ONE.* 6, e25880. doi.org/10.1371/journal.pone.0025880

Parks, W.M., Bottrill, A.R., Pierrat, O.A., Durrant, M.C., Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie* 89, 500-507. doi: 10.1016/j.biochi.2006.12.005

Parret, A.H., Temmerman, K., De Mot, R. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. (2005). *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9), 5197-207. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5197-5207.2005

Patel, S.H., Vaidya, Y.H., Patel, R.J., Pandit, R.J., Joshi, C.G., Kunjadiya, A.P. (2017). Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. *Sci. Rep.* 7, 7804. doi.org/10.1038/s41598-017-08451-7

Penders, J., Thijs, C., Vink, C. et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118(2), 511-521. doi:10.1542/peds.2005-2824

Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., Stobberingh, E.E. (2005). Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 243(1), 141-147. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.052

Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et. al. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?. Pediatrics 119(3), e724-e732. doi:10.1542/peds.2006-1649

Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microb. Cell Fact. 13, S3. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Piard, J.C., Muriana, P., Desmazeaud, M., Klaenhammer, T. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 58, 279-284.

Pimentel-Filho, N.D.J., Mantovani, H.C., Carvalho, A.F., Dias, R.S., Vanetti, M. C.D. (2014). Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. Int. J. Food Sci. Technol. 49, 416-422. doi: 10.1111/ijfs.12316

Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 70:119 –123. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Pletzer, D., Coleman, S.R., Hancock, R.E. (2016). Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. Curr. Opin. Microbiol. 33, 35-40. doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016

Prentice, A., Jarjou, L.M., Drury, P.J., Dewit, O., Crawford, M.A. (1989). Breast-milk fatty acids of rural Gambian mothers: effects of diet and maternal parity. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 8, 486-490

Pritchard, D.G., Gray, B.M., Egan, M.L. (1992). Murine monoclonal antibodies to type Ib polysaccharide of group B streptococci bind to human milk oligosaccharides. *Infect. Immun.* 60(4), 1598-1602.

Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S., Vandenberg, P.A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2349-2353.

Rahmdel, S., Shekarforoush, S.S., Hosseinzadeh, S., Torriani, S., Gatto, V. (2019). Antimicrobial spectrum activity of bacteriocinogenic *Staphylococcus* strains isolated from goat and sheep milk. *J Dairy Sci.* 102(4), 2928-2940. doi: 10.3168/jds.2018-15414.

Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *J. Food Sci. Technol.* 53(9), 3381-3394. doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5

Ramsay, D.T., Kent, J.C., Hartmann, R.A. and Hartmann, P.E. (2005), Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *J. Anatomy* 206, 525-534. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00417.x

Ramu, R., Shirahatti, P.S., Devi, A.T., Prasad, A. (2015). Bacteriocins and their applications in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi: 10.1080/10408398.2015.1020918

Rautava, S., Kainonen, E., Salminen, S., Isolauri, E. (2012). Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130(6):1355-1360. doi:10.1016/j.jaci.2012.09.003

Ribeiro, S.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C. (2016). An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *Int. Dairy J.* 63, 18-28. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.07.017

Ribeiro, S.C., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *J. Food Prot.* 80, 1303-1316. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-031

Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2003) Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet. Microbiol.* 97, 55– 61. doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00183-4

Rodríguez-Aviles, D.A., Barrera-Rivera M.K., Tibanquiza-Arreaga L.P., Montenegro-Villavicencio, A.F. (2020) Beneficios Inmunológicos de la leche materna RECIAMUC. 93-104 doi: 10.26820/reciamuc/4.(1).

Rodríguez, J.M., Jiménez, E., Merino, V., Maldonado, A., Marín, M.L., Fernández, L. (2008). Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas / Microbiota of human milk in physiological conditions. *Acta Ped. Esp.* 66(2), 77-82.

Rodriguez, J.M. (2014). The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Adv. Nutr.* 5(6), 779-784. doi: 10.3945/an.114.007229

Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3-16. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00174-5.

Rossi, F., Marzotto, M., Cremonese, S., Rizzotti, L., Torrian, S. (2013) Diversity of *Streptococcus* genes *thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin. *Food Microbiol.* 35(1), 27-33. doi: 10.1016/j.fm.2013.02.006.

Ruiz, C., McCarley, A., Espejo, M.L., Cooper, K.K., Harmon, D.E. (2019). Comparative genomics reveals a well-conserved intrinsic resistome in the emerging multidrug-resistant pathogen *Cupriavidus gilardii*. *mSphere.* 4:e00631-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00631-19>.

Ruiz, L., Espinosa-Martos, I., García-Carral, C., Manzano, S., McGuire, M. K., Meehan, C. L., et al. (2017). What's normal? Immune profiling of human milk from healthy women living in different geographical and socioeconomic settings. *Front. Immunol.* 8, 696. doi: 10.3389/fimmu.2017.00696.

Ruiz, L., García-Carral, C., Rodríguez, J.M. (2019) Unfolding the Human Milk Microbiome Landscape in the Omics Era. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1378. doi: 10.3389/fmicb.01378.

Sabrina, D., Gabriele, A.L., Mancabelli, L., Armanini, F., Turrone, F., Kieran J. et al. (2017). Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome*. 5, 66. doi.org/10.1186/s40168-017-0282-6

Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996–4001 DOI: 10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004

Saint, L., Smith, M., Hartmann, P.E. (1984). The yield and nutrient content of colostrum and milk of women from giving birth to 1 month post-partum. *Br. J. Nutr.* 52(1), 87-95.

Saito, S., Yoshida, M., Ichijo, M., Ishizaka, S, Tsujii, T. (1999). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin. Exp. Immunol.* 94(1), 220-4.

Sakwinska, O., Bosco, N. (2019). Host Microbe Interactions in the Lactating Mammary Gland. *Front. Microbiol.* 10:1863. doi: 10.3389/fmicb.2019.01863.

Salamanca-Grosso, G., Osorio-Tangarife, M.P., Romero-Acosta, K.F. (2019). Calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche materna de madres donantes colombianas. *Rev. Chilena Nut.* 46(4), 409-419. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000400409>

Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Curr. Opin. Food Sci.* 5, 86-92. doi: 10.1016/j.cofs.2015.09.004

Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocoll.* 33, 92-98. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.02.011

Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2845-2857. doi: 10.1007/s00018-011-0724-4

Sandiford, E., Upton, M. (2012). Identification, Characterization, and Recombinant Expression of Epidermicin NI01, a Novel Unmodified Bacteriocin Produced by *Staphylococcus epidermidis* That Displays Potent Activity against *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (3) 1539-1547. doi: 10.1128/AAC.05397-11

Schmieder, R., Edwards, R., (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026.

Sebei, S¹., Zendo, T., Boudabous, A., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2007). Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *J. Appl. Microbiol.* 103(5), 1621-31. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03395.x

Seo, B.J., Rather, I.A., Kumar, V.J., Choi, U.H., Moon, M.R., Lim, J.H., et. al. (2012). Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a probiotic against low-pathogenic avian influenza (H9N2) virus in chickens. *J. Appl. Microbiol.* ISSN 1364-5072. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05326.

Shi, F., Wang, Y. W., Li, Y. F., Wang, X. Y. (2016). Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. *Biotechnol. Lett.* 38, 1551-1557. doi: 10.1007/s10529-016-2127-y

Shortt, C. (1999). The probiotic century: historical and current perspectives *Trends Food Sci Technol.* 10, 411-417.

Silva, C.G., Silva, S., Ribeiro, S. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.* 9:594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>

Simha, B.V., Sood, S., Kumariya, R., Garsa, A.K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol. Res.* 167, 544-549. doi: 10.1016/j.micres.2012.01.001

Singhal, A., Macfarlane, G., Macfarlane, S., Lanigan, J., Kennedy, K., Elias-Jones, A., Stephenson, S., Dudek, P., Lucas, A. (2008) Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(6), 1785-1792. doi:10.1093/ajcn/87.6.1785

Smarda, J., Smajs, D., Lhotov, H., Dedicov, D. (2007). Occurrence of Strains Producing Specific Antibacterial Inhibitory Agents in Five Genera of *Enterobacteriaceae*. *Curr. Microbiol.* 54, 113-118. doi: 10.1007/s00284-006-0196-1

Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* 18, 329-343. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.009

Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C.G., Fernández, N., Margolles, A., Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe.* 16, 307-310. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.02.004.

Stiemsma, L.T., Michels, K.B. (2018) The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics.* 141(4), e20172437. doi:10.1542/peds.2017-2437

Suda, S., Cotter, P.D, Hill, C., Paul Ross, R. (2012). Lacticin 3147-biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 193-204. doi: 10.2174/138920312800785021

Swick, M.C., Morgan-Linnell, S.K., Carlson, K.M., Zechiedrich, L. (2011). Expression of Multidrug Efflux Pump Genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance Antimicrob. Agents Chemother. 55(2), 921-4. doi: 10.1128/AAC.00996-10.

Tagg, J.R., Macgiver, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21, 934.

Tanaka, K., Hosozawa, M., Kudo, N., Yoshikawa, N., Hisata, H., Shoji, K., et al. (2013). The pilot study: sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. *Brain Dev.* 35(1):45-52. doi:10.1016/j.braindev.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S., Lee, J.S. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(Pt 7) 1630-1634. doi:10.1099/ijs.0.65535-0. PMID: 18599707.

Therdatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., Nitisinprasert, S. (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling SpringerPlus. 5, 1060. doi.org/10.1186/s40064-016-2693-4

Timmerman, H.M., Rutten, N.B.M.M., Boekhorst, J. et al. (2017). Intestinal colonisation patterns in breastfed and formula-fed infants during the first 12 weeks of life reveal sequential microbiota signatures. *Sci. Rep.* 7, 8327. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08268-4>

Tissier, H. (1906). Treatment of intestinal infections by the commensal flora method. *CR Soc. Biol.* 60, 359-361.

Todorov, S.D., Dicks, L.M. (2004) Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* ST99 isolated from boza. *J. Ind. Microbiol. biot.* 31 (7), 323-329. doi: 10. 1007/ s10295-004-0153-6.

Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., Bañeras, L. (2008). Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 127(1-2), 91-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.011.

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2 Suppl), 393S-398S. doi.org/10.1093/ajcn/73.2.393s

Tušar, T., Žerdoner, K., Matijašić, B.B., Paveljšek, D., Benedik, E., Bratanič, B., et al. (2014). Cultivable Bacteria from Milk from Slovenian Breastfeeding Mothers. *Human Milk Microbiota, Food Technol. Biotechnol.* 52 (2), 242-247.

Uauy, R., Quan, R., Gil, A. (1994) Role of Nucleotides in Intestinal Development and Repair: Implications for Infant Nutrition. *J. Nutr.* 124 (8), 1436S–1441S, https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_8.1436S

Vaibhav, B., Vaidya, Y., Prashant K., Kunjadia, P., Nagee, A., Patel, R. (2012). Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. *Int. J. Pharm. Sci. Health.* 2, Vol 3

Vaibhav, V.D., Vaidya, Y.H., Kunjadia, P.D., Kunjadia, A.P. (2012). Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. *Int. J. Pharm. Sci. Health Care* 3, 62-70.

Vaughan, E.E., De Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben Amor, K., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. (2002). The intestinal LABs. *Anton. Leeuw.* 82, 341-352.

Verma, S.K., Sood, S.K., Saini, R.K., Saini, N. (2017). Pediocin PA-1 containing fermented cheese whey reduces total viable count of raw buffalo (*Bubalis bubalus*) milk. *LWT Food Sci. Technol.* 83, 193-200. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.031

VidyaLaxme, B., Rovetto, A., Grau, R., Agrawal, R. (2014). Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholera* and other beneficial properties. *J. Food Sci. Technol.* 51, 3072–3082. doi: 10.1007/s13197-012-0834-5.

Villani, F., Pepe, O., Mauriello, G., Salzano, G., Moschetti, G., Coppola, S. (1995). Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophiles*. *Int. J. Food Microbiol.* 25(2), 179-190

Vincent, P.A., Morero, R.D. (2009). The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Curr. Med. Chem.* 16, 538-549. doi: 10.2174/092986709787458461

Viswanathan, S., Lau, C., Akbari, H. et al. (2016). Survey and evidence based review of probiotics used in very low birth weight preterm infants within the United States. *J. Perinatol.* 36, 1106-1111. doi.org/10.1038/jp.2016.144

Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Emilie, E.L., Muller, L., Narayanasamy, S., et al. (2017). Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life. *Front. Microbiol.* 8,738. doi:10.3389/fmicb.2017.00738

Wang, M., Li, M., Wu, S., Lebrilla, C.B., Chapkin, R.S., Ivanov, I. et al. (2015). Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.* 60(6), 825–833. doi.org/10.1097/MPG.0000000000000752

Ward, D.J., Somkuti, G.A. (1995). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 330-335. doi: 10.1007/BF00172834.

Waterland, R.A., Michels, K.B. (2007). Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 363-388. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705.

Wescombe, P.A., Heng N.C., Burton, J.P., Chilcott, C.N., Tagg, J.R. (2009). Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiol.* 4(7), 819-35. doi: 10.2217/fmb.09.61.

World Health Organization (2003). *Global Strategy for Infant and Young Child Feeding*. Geneva: WHO.

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G, J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., et al. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1151–1161. DOI: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

Yildirim, Z., Öncül, N., Yildirim, M., and Karabiyikli, Ş. (2016). Application of lactococcin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents. *Acta Aliment.* 45, 486-492. doi: 10.1556/066.2016.45.4.4

Zacharof, M., Lovitt, R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia* 2, 50-56. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010

Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., Lu, X.Y. (2014). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Ann. Microbiol.* 64, 413-420. doi: 10.1007/s13213-013-0679-9

Zou, X.Q., Guo, Z., Huang, J.H., Jin, Q.Z., Cheong, L.Z., Wang, X.G., et al. (2012). Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization. *J. Agric. Food Chem.* 60(29), 7158-67. doi.org/10.1021/jf3013597

Zimmermann, P., Curtis, N. (2020). Breast milk microbiota: A complex microbiome with multiple impacts and conditioning factors. *J. Infect.* (in press). doi: 10.1016/j.jinf.2020.01.023

Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C. et al. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature.* 535, 511–516. doi: 10.1038/nature18634.

