

Artículo recibido 4 de julio de 2025.

Artículo aceptado 15 de septiembre de 2025.

Artículo publicado 5 de octubre de 2025.

Estudio de bacterias lácticas nativas, evaluación de combinación de nisina y antibióticos contra patógenos resistentes

Rivas, Franco P.^{1,2}; Aguzín Ferreyra, Mauricio E.¹; Garro, Marisa S.³; Garro, Oscar A.^{1,2}

¹Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS). Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina

²Instituto de Investigaciones en Procesos Tecnológicos Avanzados (INIPTA)-CONICET/UNCAUS. Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina

³Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET-FML-FECIC. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

rivas@uncaus.edu.ar;

mau.aguzin@gmail.com;

msgarro2002@yahoo.com.ar;

garro@uncaus.edu.ar

ORCID Franco Paolo, Rivas 0000-0003-4332-5975

ORCID Mauricio Emanuel, Aguzín Ferreyra, 0009-0009-5927-9919

ORCID Marisa Selva, Garro 0000-0003-4496-4584

ORCID Oscar Alfredo, Garro 0000-0003-4106-2315

Resumen

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha impulsado la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de bacteriocinas y sus combinaciones con antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos. Bacterias lácticas (BL) aisladas a partir de frutos nativos de la provincia del Chaco (Argentina): Algarrobo blanco (*Neltuma alba*), Chañar (*Geoffroea decorticans*), Tutuía (*Solanum sisymbriifolium*) y Tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), fueron ensayadas por su producción de bacteriocinas. Ninguna BL fue productora de bacteriocina. La eficacia de

nisina y sus combinaciones con 4 antibióticos comerciales fue analizada frente a patógenos clínicos resistentes aislados en nosocomios de Sáenz Peña (Chaco). Se encontraron 3 combinaciones de nisina y oxacilina que exhibieron interacción sinérgica contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y 1 combinación que desarrolló efecto aditivo. No se encontró interacción positiva frente a las bacterias Gram-negativas evaluadas. Estos hallazgos sugieren que la nisina, si bien es efectiva contra ciertos patógenos Gram-positivos, no presenta ventajas adicionales contra Gram-negativas al combinarse con antibióticos. Resaltando la necesidad de continuar aislando y caracterizando nuevas BL productoras de bacteriocinas efectivas contra una gama más amplia de patógenos, especialmente Gram-negativos.

Palabras clave: bacterias resistentes, bacteriocinas, nisina

Abstract

Study of the use of bacteriocin and its combinations with commercial antibiotics against resistant bacteria

The increase in bacterial resistance to antibiotics has driven the urgent need to develop new therapeutic strategies. The objective of this study was to evaluate the potential of bacteriocins and their combinations with commercial antibiotics to inhibit the growth of antibiotic-resistant bacteria. Lactic acid bacteria (LAB) isolated from native fruits of Chaco Province (Argentina): white carob (*Neltuma alba*), Chañar (*Geoffroea decorticans*), Tutiá (*Solanum sisymbriifolium*), and prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), were tested for their bacteriocin production. No LAB produced bacteriocins. The efficacy of nisin and its combinations with four commercial antibiotics was analyzed against resistant clinical pathogens isolated in hospitals in Sáenz Peña (Chaco). Three combinations of nisin and oxacillin were found to exhibit synergistic interaction against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, and one combination developed an additive effect. No positive interaction was found against the Gram-negative bacteria tested. These findings suggest that nisin, although effective against certain Gram-positive pathogens, does not offer additional advantages against

Gram-negative bacteria when combined with antibiotics. This highlights the need to continue isolating and characterizing new LAB that produce bacteriocins effective against a wider range of pathogens, especially Gram-negative.

Keywords: resistant bacteria, bacteriocins, nisin

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BL) son un conjunto amplio y diverso de bacterias pertenecientes al orden *Lactobacillales*. A pesar de tal diversidad, las BL poseen ciertas características en común las cuales permiten agruparlas y diferenciarlas de otros tipos de bacterias, como lo son el ser bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, desprovistas de citocromos, catalasa negativa, oxidasa negativa, no productoras de esporas, carentes de motilidad (salvo contadas excepciones), con forma de coco o bacilo (Bergey's Manual).

Las BL son microorganismos ubicuos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo que pueden ser aisladas de alimentos o productos fermentados, como leche, yogur, queso, chucrut o kéfir; aunque también pueden ser encontradas en el suelo, en la superficie de vegetales no fermentados (tomate, manzana, naranja, mandarina, ananá, entre otros) o colonizando el tracto gastrointestinal del ser humano u otros animales, formando parte de la microbiota normal (Pereira Barbosa et al., 2022).

Algunas BL poseen la capacidad de producir compuestos de gran interés científico e industrial denominados “bacteriocinas”. Si bien la mayoría de las bacteriocinas presentan actividad principalmente dirigida hacia bacterias Gram positivas, existen bacteriocinas de amplio espectro activas contra bacterias Gram negativas, hongos patógenos, células tumorales e incluso virus (Orrego Andrade & Lobos Gilabert, 2020).

De acuerdo a Ruiz et al. (2023), actualmente, las únicas bacteriocinas aprobadas por la FDA para su uso en alimentos son la nisina y la pediocina, pero sólo la nisina cuenta con la aprobación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la European Food Safety Authority. En el contexto de la República Argentina, la nisina es la única bacteriocina aprobada para su uso en alimentos como conservante (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2023). La

nisina es un lantibiótico, nombre que se deriva de la presencia del aminoácido lantionina, por lo que su mecanismo de acción consiste principalmente en la formación de poros en la membrana plasmática bacteriana. Desde el punto de vista de la industria farmacéutica y de la salud humana, las bacteriocinas representan una herramienta alternativa y prometedora en la lucha contra microorganismos multirresistentes.

La OMS (2016), considera que la resistencia a los antibióticos es un evento que ocurre cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) se adaptan y se vuelven capaces de crecer en presencia de antibióticos ante los cuales antes eran sensibles, volviéndolos ineficaces para su tratamiento. Las bacterias multirresistentes son una preocupación creciente en la salud pública debido a que son microorganismos difíciles de tratar y pueden provocar infecciones graves y potencialmente mortales, además de que impiden garantizar procedimientos complejos (cirugías, quimioterapias, etc.) con bajos riesgos (Shin et al., 2015; Serra-Burriel et al., 2020).

Es debido a esto que el estudio de nuevas alternativas que permitan mitigar estos problemas es tan necesario como urgente. Tal es el caso de la investigación del poder antimicrobiano de las bacteriocinas, las cuales ya han reportado tener capacidad tanto bacteriostática como bactericida al ser evaluadas contra patógenos multirresistentes (Shin et al., 2015; Delpech et al., 2017). En este contexto, las bacteriocinas cuentan con las ventajas de ser compuesto de tamaño muy pequeño, que actúan de forma rápida y ante los cuales los microorganismos desarrollan resistencia de manera mucho más lenta en comparación con los antibióticos comunes (Aguirre & Litterio, 2017; Jensen et al, 2020).

Otra estrategia posible es la de la administración simultánea de antibióticos y bacteriocinas que exhiban un comportamiento antibacteriano sinérgico. Esto, además, permitiría disminuir la concentración de antibiótico necesaria para inhibir de manera efectiva el crecimiento de tales bacterias durante el tratamiento, disminuyendo la presión selectiva sobre la bacteria y minimizando la probabilidad de ocurrencia de toxicidad medicamentosa debida a las altas dosis de antibióticos necesarias (Tong et al., 2014)

Desde el descubrimiento de la primera bacteriocina en el año 1925 por el bacteriólogo británico Frederick W. Twort (Rios et al., 2016), muchos otros compuestos pertenecientes a esta categoría han sido y continúan siendo descubiertos a medida que

se intensifica el estudio de nuevos nichos en los que se desarrollan bacterias capaces de producirlos como, por ejemplo, las BL. Es en consecuencia a todo lo anteriormente citado, y con motivo de revalorizar la región del Noreste Argentino (NEA) en términos de biodiversidad, es que se enmarca la importancia de la investigación de las BL productoras de bacteriocinas aisladas a partir de vegetales autóctonos del Chaco. Así, determinar el uso potencial de estas nuevas bacteriocinas y de nisina (bacteriocina de uso comercial) frente a bacterias resistentes a antibióticos, y la combinación de las mismas con antibióticos comerciales, como posible medida para uso terapéutico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección y recolección del material vegetal

Se utilizaron los frutos de las siguientes plantas autóctonas de la región NEA, que fueron recolectados en su lugar de origen durante el año 2024: algarrobo blanco (*Neltuma alba*), recolectado en zona rural (26° 28' 08,787" S, 60° 14' 59,1122" W); chañar (*Geoffroea decorticans* (Gill. Ex Hook. Et Arn.) Burk.), recolectado en zona rural (26° 28' 08,787" S, 60° 14' 59,1122" W); tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), recolectada en zona urbana periférica de Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco (26° 48' 28" S, 60° 27' 00" W); tutiá (*Solanum sisymbriifolium* Lam.), recolectado en zona rural (26° 28' 08,787" S, 60° 14' 59,1122" W).

Una vez recolectados, los frutos fueron transportados al laboratorio en condiciones de refrigeración y se analizaron en un plazo no mayor a 48 horas.

2.2. Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas

El material vegetal fue lavado con agua destilada, luego procesado por disgregación mecánica con agua de peptona estéril para realizar diluciones seriadas, sembradas en MRS-Agar (1,2%) suplementado con sorbato de potasio al 0,02% (para evitar el crecimiento de mohos y levaduras), incubadas a 30°C por 48-72 horas bajo condiciones anaeróbicas. A partir de estas placas, se seleccionaron aleatoriamente entre 5 y 10 colonias, las cuales fueron purificadas sobre el mismo medio.

Los cultivos seleccionados fueron caracterizados preliminarmente usando tinción de Gram, morfología celular y reacción de catalasa (Bergey's Manual). Los

aislamientos Gram positivos y catalasa negativos fueron almacenados a -80°C en caldo MRS + 20% (v/v) de glicerol.

2.3. Actividad antimicrobiana (producción de sustancias del tipo bacteriocina)

2.3.1. Screening para actividad antimicrobiana

Dicho ensayo fue realizado siguiendo la metodología descrita en Rivas et al., 2025. Brevemente, placas de Petri se cubrieron con 15 ml de agar BHI fundido (agar al 1%), se inocularon con 30 μl de un cultivo activo del microorganismo indicador (MI), en el que se formaron pocillos de 5 mm con un sacabocado estéril. Luego, se colocaron 30 μl de un cultivo activo del aislamiento de BL en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 24 h a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo indicador. La aparición de zonas transparentes de 6 mm o más grandes alrededor del pocillo, se calificaron como inhibición positiva. A tal efecto, se emplearon los siguientes MI; bacterias Gram positivas: *Listeria (L.) innocua* ATCC 33090, *L. innocua* 7, *Staphylococcus (S.) aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermis* ATCC 12228, *Brochothrix thermosphacta* 405 y *Enterococcus faecalis*; bacterias Gram negativas: *Escherichia (E.) coli* ATCC 35218 y *E. coli* FBUNT (Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

2.3.2. Caracterización de los compuestos antibacterianos

Para esta determinación, por cada cepa de BL que presentó actividad antimicrobiana en el ensayo anterior (2.3.1.) se utilizó una placa de Petri sembrada con cada MI frente al cual había exhibido actividad, aplicando metodología descrita en Rivas et al., 2025. Brevemente, estos aislados se cultivaron durante 12 h a 30°C en caldo MRS. Luego, el cultivo bacteriano se centrifugó (4000 g, 10 min a temperatura ambiente) y filtró (membrana de acetato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro) para obtener un sobrenadante libre de células (SLC). La inhibición ácida se descartó mediante el ajuste de pH de las muestras a pH 6,5 (con NaOH 1 N). La actividad inhibitoria del peróxido de hidrógeno se descartó mediante la adición de catalasa (300 UI/ml). La naturaleza proteínica de los compuestos antimicrobianos se determinó mediante la adición de enzimas proteolíticas: tripsina, papaína y proteinasa K (concentración final de 1 mg/ml). Las muestras se incubaron durante 24 h a 30°C .

2.4. Determinación del perfil antibacteriano frente a patógenos clínicos

Se realizó la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de nisina y de los antibióticos: gentamicina, norfloxacin y ampicilina para *E. coli* y oxacilina y gentamicina para *Staphylococcus*, mediante el método de microdilución en caldo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). Las dosis de nisina empleadas fueron: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 62,5 µg/mL. Se usaron concentraciones de antibióticos diferentes de acuerdo al perfil de resistencia aportado por las instituciones que aislaron cada bacteria resistente. En esta etapa se emplearon ocho bacterias patógenas resistentes de origen clínico provistas por los laboratorios de análisis clínico del Hospital 4 de Junio y de la Unidad Médica Educativa (UME-UNCAUS), ambos de la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña (Tablas 1 y 2). Cinco cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM): UME1, *S. aureus* (Sa)5307, Sa5357, Sa5646 y Sa5627; y tres *E. coli* resistentes a ampicilina: Ec4905, Ec1785 y Ec1763; cuyos perfiles de resistencia antimicrobiana, fueron aportados por los centros de salud que realizaron los aislamientos. Además, se estudiaron cepas derivadas de la colección de cultivos ATCC: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *E. coli* ATCC 35218.

Tabla 1: Perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*.

	Sa5627	Sa5646	UME1	Sa5307	Sa5357
Eritromicina	S	R	S	S	S
Clindamicina	S	R	S	S	S
Trimetoprima-sulfametoxazol	S	S	S	S	S
Penicilina	R	R	R	R	R
Oxacilina	R	R	R	R	R
Rifampicina	S	S	S	S	S
Minociclina	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S
Levofloxacin	S	R	S	S	S
Gentamicina	S	R	S	S	S
Norfloxacin	R	R	R	R	R

Ampicilina R R R R R

Sa: *Staphylococcus aureus*; UME1: *Staphylococcus aureus* UME1. R: resistente; S: sensible

Tabla 2: Perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos clínicos de *Escherichia coli*.

	Ec1785	Ec1763	Ec4905
Meropenem	S	S	S
Ciprofloxacina	R	R	R
Piperacilina/Tazobactama	S	S	S
Cefepime	S	S	S
Amicacina	S	S	S
Ampicilina	R	R	R
Gentamicina	R	R	R
Norfloxacin	R	R	R

Ec: *Escherichia coli*. R: resistente; S: sensible

Cinco mililitros de solución fisiológica estéril fueron inoculados con 100 μ L a 200 μ L de la suspensión de las cepas activas, hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células por mililitro). Se agregó 0,1 mL de estas suspensiones bacterianas a 5 mL de caldo MH (Mueller-Hinton) estéril, ajustados previamente con los cationes: 10 μ L Ca^{++} y 5 μ L Mg^{++} , para alcanzar valores que se aproximan a las concentraciones fisiológicas (Stephen et al., 2005). En cada pocillo de la policubeta se depositó 3 μ L de solución del agente antimicrobiano y 100 μ L del caldo MH inoculado con la cepa contra la que se ensayaría la acción antimicrobiana. Las policubetas empleadas en los ensayos se incubaron durante 16-20 h a 37° C. Luego de la incubación, se evidenció el crecimiento bacteriano por la presencia de turbidez y/o un sedimento de células en el fondo del pocillo. La CIM correspondió a la concentración más baja de nisina o antibiótico que restringió el crecimiento bacteriano a un nivel visualmente no evidenciable.

2.5. Evaluación de los efectos de interacción entre las sustancias antimicrobianas

Para la evaluación del sinergismo antibacteriano se utilizó el método del tablero de ajedrez (Moody, 2007). Se evaluaron diferentes combinaciones de nisina con antibióticos comerciales: oxacilina, ampicilina, gentamicina y norfloxacin. Cada una

de las combinaciones fueron transferidas a un pocillo de una policubeta. Las concentraciones evaluadas en las combinaciones estuvieron comprendidas en un rango de una dilución inferior a la CIM, la CIM y el doble de la CIM (para evaluar potencial antagonismo) de cada uno de los compuestos presentes en la mezcla. Para las bacterias resistentes a la nisina se probó la concentración 500 µg/mL de la misma, y dos diluciones siguientes. En cada pocillo se adicionó 100 µl del inóculo bacteriano conteniendo 5×10^5 UFC/ml. Se utilizaron las mismas bacterias que se emplearon para la determinación de la CIM de los compuestos usados individualmente. Luego se calcularon los Índices de Concentración Fraccionaria Inhibitoria (ICFI). Para este índice inicialmente se obtuvieron las Concentraciones Fraccionarias Inhibitorias (CFI) de cada componente dividiendo la CIM del compuesto en la combinación por la CIM del agente antimicrobiano solo. El ICFI se calculó luego como la suma de las CFI de cada componente en la combinación y permitió definir si una mezcla presentaba efecto sinérgico ($\leq 0,50$), aditivo (0,51–1,00), indiferente (1,01–3,99) o antagónico ($\geq 4,00$) (Schelz et al., 2006).

$$CFI_{\text{antimicrobiano A}} = \frac{\text{CIM de A en combinación con B}}{\text{CIM del antimicrobiano A}}$$

$$CFI_{\text{antimicrobiano B}} = \frac{\text{CIM de B en combinación con A}}{\text{CIM del antimicrobiano B}}$$

$$ICFI = \sum CFI = CFI_{\text{antimicrobiano A}} + CFI_{\text{antimicrobiano B}}$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento y purificación de bacterias ácido lácticas

De las frutas nativas procesadas, se seleccionaron aleatoriamente 64 colonias de las placas de agar MRS, según las diferencias en su apariencia morfológica (tamaño, borde, color y topografía, entre otros). De las cuales, 15 se precaracterizaron como BL por ser Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas ni móviles (Bergey's Manual) (Tabla 3). Estos aislados se seleccionaron, conservaron y utilizaron para las siguientes pruebas *screening* para actividad antimicrobiana y caracterización de los compuestos antibacterianos.

Tabla 3: Bacterias aisladas de diferentes frutas nativas procesadas.

BL	Morfología	Fuente
Alg1	Bacilo	Algarrobo
Alg2	Bacilo	Algarrobo
Cha1	Coco	Chañar
Cha2	Coco	Chañar
Cha3	Coco	Chañar
Tun1	Coco	Tuna
Tun2	Coco	Tuna
Tun3	Coco	Tuna
Tun4	Bacilo	Tuna
Tun5	Coco	Tuna
Tun6	Coco	Tuna
Tun7	Coco	Tuna
Tun8	Coco	Tuna
Tut1	Bacilo	Tutiá
Tut2	Coco	Tutiá

Alg: Algarrobo blanco, Cha: Chañar, Tut: Tutiá, Tun: Tuna

3.2. *Actividad antimicrobiana*

3.2.1. *Screening para actividad antimicrobiana*

Las suspensiones celulares de los 15 aislados (presuntas BL) mostraron actividad antagonista contra todos los MI ensayados, independientemente de si se trataba de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas. Presentando, en todos los casos, halos de inhibición en el rango de 8 a 15 mm. Existen numerosas investigaciones en las que se registra la actividad antimicrobiana de las BL (aisladas a partir de diversas fuentes) frente tanto a bacterias Gram-positivas como a bacterias Gram-negativas (Dejene et al., 2021), siendo *S. aureus* (Christensen et al., 2021; Spacova et al., 2020) y *E. coli* (Byakika et al., 2019; Manzoor et al., 2016) las más estudiadas de cada grupo, respectivamente. Se tiene conocimiento de que la inhibición que las BL producen sobre el crecimiento de otras bacterias se debe a múltiples factores, siendo los más

importantes la acidificación del medio provocada por la producción de determinados ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), la coagregación y la producción de péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana (bacteriocinas y sustancias inhibitorias de tipo bacteriocina) (Agriopoulou et al., 2020; Christensen et al., 2021).

3.2.2. Caracterización de los compuestos antibacterianos

Se observaron áreas de inhibición, de diámetro variable, alrededor de todos los pocillos inoculados con suspensiones celulares y los correspondientes sobrenadantes libres de células sin neutralización. Esto último descarta cualquier compuesto unido a la pared celular de las BL como agente responsable de la inhibición. Por el contrario, no se observaron halos de inhibición en ningún pocillo donde se sembró sobrenadante libre de células neutralizado, lo que indica que la inhibición reportada por las diferentes bacterias aisladas frente a los MI estudiados se debe a la producción de ácido. Esto elimina la producción de peróxidos o la síntesis de compuestos tipo bacteriocinas de la lista de potenciales agentes antagonistas del crecimiento de los MI. Hwanhlem et al. (2014), aislaron 386 BL a partir de material vegetal fresco, de los cuales sólo 4 cepas fueron capaces de producir compuestos de tipo bacteriocina e inhibir a *Brochothrix thermosphacta* DSM 20170 y *L. monocytogenes* DMST 17303 en ensayos de difusión en agar. Otros autores como Demir & Basbülbul (2017), aislaron más de cien BL, todas mostraron actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *L. monocytogenes* y *L. innocua* debido a la producción de ácido. En otro estudio, Grosu-Tudor et al. (2014) aislaron 274 cepas de BL de alimentos fermentados tradicionales de Rumania y solo alrededor del 2% de ellas fueron capaces de producir compuestos inhibidores de tipo bacteriocina. Por su parte, Elyas et al. (2015), aislaron 40 cepas BL de vegetales fermentados típicos de Sudán y encontraron que 2 de ellas producían sustancias del tipo bacteriocinas. Estos y otros estudios realizados por diversos autores destacan la notable dificultad que supone el aislamiento de BL productoras de bacteriocinas.

Cabe resaltar, además, que las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas tienen un desempeño pobre como agentes antibacterianos frente a Gram-negativas debido a la presencia de la membrana externa, la cual constituye una barrera que controla eficazmente la permeabilidad a este tipo de sustancias; por lo que la actividad antagonista de las BL sobre este tipo de bacterias parece deberse casi en su

totalidad a la acción del ácido láctico. Este ácido orgánico es una molécula pequeña, soluble en agua, que puede permear al espacio periplasmático a través de proteínas porinas y atravesar la membrana citoplasmática en su forma no disociada, induciendo la caída del pH intracelular y la consecuente alteración de la fuerza protón-motriz transmembranal (Agriopoulou et al., 2020)

3.3. Determinación del perfil antimicrobiano frente a patógenos clínicos

Debido a que, hasta el momento, no se logró aislar y seleccionar una BL cuya producción de bacteriocina fuera suficiente y prometedora para su potencial aplicación; tal lo planificado, se continuaron los estudios con nisina comercial de *Lactococcus lactis* Sigma-Aldrich® (potencia: 900 UI/mg) en las siguientes pruebas.

Se determinó que la CIM de nisina frente a 8 estafilos (3 cepas ATCC y 5 cepas SARM obtenidas de aislamientos clínicos) estuvo comprendida entre 250-500 µg/mL (Tabla 4). Además, se estudió la CIM de oxacilina y gentamicina frente a las cepas de aislamientos clínicos a fin de valorar y/o corroborar el carácter de susceptibilidad/resistencia a dichos antibióticos, encontrándose que las cepas UME1, Sa5307, Sa5646 y Sa5627 presentaron resistencia frente a la oxacilina ($CIM \geq 4$ µg/mL) y que ninguna de las cepas de aislamientos clínicos resultó resistente a la gentamicina ($CIM \geq 16$ µg/mL).

Cabe destacar que la elección de los antibióticos y los criterios para determinar resistencia o susceptibilidad a los mismos, fueron escogidos siguiendo las recomendaciones presentes en Clinical and Laboratory Standards Institute (2020).

Tabla 4: Determinación de CIM de agentes antibacterianos frente a cepas de estafilococos.

Cepas bacterianas	CIM _{Nisina}	CIM _{Oxacilina}	CIM _{Gentamicina}
Sa29213	250	0.125	0.25
Sa25923	500	0.125	0.25
Se	500	8	2
UME1	500	9	9
Sa5307	500	9	9
Sa5357	500	<0,6	4,5
Sa5646	500	300	75

Sa5627

500

18

9.37

Sa: *Staphylococcus aureus*; Se: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; UME1: *Staphylococcus aureus* “UME1”; S: sensible. Las concentraciones de CIM están expresadas en µg/mL.

Adicionalmente, se determinó las concentraciones inhibitorias mínimas de nisina, gentamicina, norfloxacin y ampicilina frente a cepas de *Escherichia coli* (Tabla 5). Las cuatro cepas de *E. coli* evaluadas fueron resistentes a la gentamicina (CIM ≥ 16 µg/mL). Las cepas Ec4905, Ec1785 y Ec1763 fueron resistentes a ampicilina (CIM ≥ 32 µg/mL) y a norfloxacin (CIM ≥ 16 µg/mL). No se encontró CIM de nisina frente a ninguna de las cepas de *E. coli*; por lo que se supone que, de existir esta, se encuentra por encima de la dosis máxima ensayada.

Tabla 5: Determinación de CIM de agentes antibacterianos frente a cepas de *Escherichia coli*.

Cepas bacterianas	CIM _{Nisina}	CIM _{Gentamicina}	CIM _{Norfloxacin}	CIM _{Ampicilina}
Ec35218	>1000	18	<9	<9
Ec4905	>1000	75	150	>300
Ec1785	>1000	37,5	300	>300
Ec1763	>1000	75	>300	300

Ec: *Escherichia coli*. Las concentraciones de CIM están expresadas en µg/mL.

Los resultados hallados son coherentes con los obtenidos por otros investigadores que estudiaron la capacidad antibacteriana y el espectro de actividad de la nisina, respecto a la actividad frente a bacterias gran positivas. Por ejemplo, Shi et al. (2017), demostraron que la nisina es capaz de inhibir el crecimiento de 14 cepas de *S. aureus*, con CIM oscilando entre 16 y 32 µg/mL. Por su parte, Jensen et al. (2020), determinaron la CIM de nisina frente a cepas SARM, obteniendo valores entre 6,4 y 12,8 µg/mL; además de comprobar que la nisina exhibió actividad bactericida frente a estas cepas y que la resistencia a la meticilina no modifica la sensibilidad a la nisina. Yehia et al. (2022) comprobaron el efecto bacteriostático de la nisina sobre cepas SARM. Adicionalmente, Bennett et al. (2021), evaluaron la actividad antibacteriana de varias bacteriocinas (incluida la nisina) frente a cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Streptococcus*, encontrando que 14 de estas cepas multirresistentes fueron inhibidas por

nisina, con una CIM que fue menor o igual a 100 µg/mL, concentraciones menores a las registradas en nuestro estudio. Nuestros resultados indicarían que las MI utilizadas presentan mayor resistencia a la nisina en las condiciones ensayadas.

Se tiene conocimiento de que el espectro de actividad de la nisina está prácticamente restringido a una amplia variedad de bacterias Gram-positivas (incluidas bacterias formadoras de esporas y bacterias patógenas y responsables de descomposición), exhibiendo escasa o nula actividad frente a bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos (Moshtaghi et al., 2018). Esto no hace más que respaldar los resultados hallados en el presente estudio. Esta falta de actividad de la nisina frente a bacterias Gram-negativas se debe a la membrana externa, que actúa como barrera de permeabilidad, impidiendo la interacción entre la nisina y el lípido II y, en consecuencia, neutralizando la actividad antibacteriana de la misma (Jensen et al., 2020).

A raíz de la dificultad que interpone al accionar de la nisina la membrana celular de las bacterias Gram-negativas, diversas estrategias han sido estudiadas para intentar superar dicho obstáculo, entre las que figuran la adición de agentes quelantes (EDTA, lactoferrina, citratos, etc.), el uso de liposomas y el desarrollo de nanocompuestos unidos a nisina, entre otros (Khan et al., 2015; Vukomanović et al., 2017). La idea principal detrás de estas estrategias es la de alterar la integridad de la membrana externa.

3.4. Evaluación del tipo de interacción entre antibióticos y nisina

En la Tabla 6 podemos observar que se halló interacción de tipo sinérgica ($ICFI \leq 0,50$) de nisina y oxacilina frente a tres cepas distintas de SARM: Sa5646, UME1 y Sa5307 y efecto aditivo ($ICFI = 0,51-1,00$) al ser ensayada contra Sa5627.

Mientras que las combinaciones de nisina y gentamicina resultaron indiferentes ($ICFI 1,01-3,99$) al ser ensayadas contra las cepas de *S. aureus*. Lo mismo resultó (efecto indiferente) al combinar gentamicina, norfloxacin, y ampicilina con Nisina al ser evaluadas contra las cepas de *E. coli* estudiadas.

Tabla 6: Evaluación de la interacción entre nisina y oxacilina frente a cepas de *S. aureus*.

Cepas bacterianas	CFI_{Nisina}	$CFI_{Oxacilina}$	ICFI	Tipo de interacción
-------------------	----------------	-------------------	------	---------------------

Sa5646	0,25	0,25	0,5	sinergismo
Sa5627	0,5	0,125	0,625	aditividad
UME1	0,25	0,125	0,375	sinergismo
Sa5307	0,25	0,25	0,5	sinergismo

CFI: concentración fraccionaria inhibitoria; ICFI: índice de concentración fraccionaria inhibitoria. ICFI: $\leq 0,50$ efecto sinérgico; 0,51–1,00 efecto aditivo; 1,01–3,99 efecto indiferente; $\geq 4,00$ antagonismo. Las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g/mL}$.

En lo que concierne al efecto de combinaciones de antibióticos (u otros agentes con actividad antimicrobiana) y nisina frente a bacterias Gram-positivas, hay una cuantiosa diversidad de estudios en los que se verifica el efecto sinérgico de dichas combinaciones, principalmente frente a estafilococos. Por ejemplo, Yehia et al. (2022), encontraron una combinación sinérgica entre nisina y reuterina (compuesto orgánico producido por *Lactobacillus reuteri*) al ser evaluada contra una cepa SARM y *S. aureus* ATCC 25937. Existen, además, investigaciones que demuestran la actividad sinérgica en combinaciones de nisina con eritromicina y con cefazolina, frente a una cepa de *Streptococcus* del grupo B (procedente de un aislamiento clínico) y bacterias patógenas causantes de mastitis, respectivamente (Kitazaki et al., 2017; Hayes et al., 2019). Un estudio de Wang et al. (2023) fue llevado a cabo con la finalidad de evaluar la actividad (*in vivo* e *in vitro*) y los potenciales mecanismos de acción de combinaciones de nisina y oxacilina frente a cepas SARM. En dicha investigación los autores demostraron que la nisina puede restaurar la susceptibilidad de las cepas SARM a la oxacilina (e inhibir la producción de biofilms) al inhibir la transcripción del gen *mecA* (responsable de la resistencia a la meticilina).

En relación a la actividad antimicrobiana de la nisina frente a bacterias Gram-negativas, como ya se discutió en el apartado anterior (3.3), se tiene conocimiento del escaso efecto que esta tiene sobre estos microorganismos, por lo que los resultados hallados en los experimentos de interacción entre nisina y antibióticos frente a cepas de *E. coli* resistentes no resultan sorprendidos. Esto quizás se deba a que las concentraciones de nisina evaluadas no alcanzaron a ejercer un efecto desestabilizador considerable sobre la membrana externa de la pared celular bacteriana como para alterar su

integridad, condicionados por la concentración de nisina comercial con la que se trabajó (Jensen et al., 2020; Khan et al., 2015; Vukomanović et al., 2017).

4. CONCLUSIONES

Valorar la biodiversidad local de la provincia de Chaco y la búsqueda de BL productoras de bacteriocinas subraya la importancia de explorar los recursos naturales autóctonos. Aunque en esta investigación no se logró aislar cepas productoras de bacteriocinas, el estudio proporciona una base valiosa para futuros trabajos que podrían considerar la utilización de diferentes fuentes, sumando productos vegetales fermentados, repetir los ensayos en temporadas con más precipitaciones y con más producción de frutos, o métodos de aislamiento más avanzados.

Los resultados obtenidos demostraron que la nisina comercial exhibe un espectro de acción limitado, mostrando una aceptable actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas. No se observó inhibición significativa del crecimiento de bacterias Gram-negativas (todas ellas cepas de *Escherichia coli*), lo que resalta la limitación de la nisina frente a estos tipos de microorganismos. Este hallazgo es consistente con la literatura revisada, que sugiere que la nisina, debido a su mecanismo de acción enfocado principalmente en la pared celular bacteriana, es menos efectiva contra bacterias Gram-negativas que poseen una membrana externa adicional que actúa como una barrera protectora.

Adicionalmente, se evaluó el tipo de interacción desarrollada entre la nisina y los antibióticos: oxacilina, gentamicina, norfloxacin y ampicilina, frente a bacterias resistentes a antibióticos. Los resultados mostraron que la nisina no presentó interacción sinérgica o aditiva con los antibióticos al ser evaluada frente a bacterias Gram-negativas, lo cual limita su potencial aplicación frente a este tipo de patógenos. En contraste, cabe resaltar que, se halló 3 combinaciones de nisina y oxacilina con comportamiento sinérgico, y una con comportamiento aditivo, capaces de inhibir eficientemente el crecimiento de 4 cepas SARM.

En conclusión, esta investigación ofrece información valiosa sobre las limitaciones y potencialidades de la nisina en el contexto del desarrollo de nuevas estrategias y combinaciones de agentes antimicrobianos tendientes a la lucha contra la problemática emergente de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Los resultados

sugieren que, aunque la nisina puede ser efectiva contra bacterias Gram-positivas y podría tener un papel en tratamientos específicos combinados, carece de eficacia contra bacterias Gram-negativas. Estos hallazgos enfatizan la necesidad de continuar explorando nuevas fuentes de aislamiento y tipos de bacteriocinas, así como de desarrollar estrategias innovadoras que puedan superar las barreras presentadas por las bacterias Gram-negativas. Por otro lado, queda pendiente el estudio de interacción entre nisina y otros ATB comerciales. La integración de estos conocimientos es crucial para avanzar en la lucha contra la resistencia antimicrobiana y mejorar el manejo de infecciones bacterianas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2023).

Capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios. En ANMAT (Ed.), *Código Alimentario*

Argentino.

República

Argentina.

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_capitulo_xviii_aditivos.pdf

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020).

Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects.

Microorganisms, 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>

Aguirre, G. E., & Litterio, N. J. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de

bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina. Córdoba, Argentina:

Universidad Católica de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

<http://pa.bibdigital.ucc.edu.ar/id/eprint/1450>

Bennett, S., Said, L. B., Lacasse, P., Malouin, F., & Fliss, I. (2021). Susceptibility to Nisin, Bactofencin, Pediocin and Reuterin of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* Causing Bovine Mastiti. *Antibiotics*, 10(1418).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10111418>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth Informational Supplement*. (16^a ed.).

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100* (30^a ed.).

Delpech, G., Bistoletti, M., Ceci, M., Lissarrague, S., Sánchez Bruni, S., & Sparo, M. (2017). Bactericidal Activity and Synergy Studies of Peptide AP-CECT7121 Against Multi-resistant Bacteria Isolated from Human and Animal Soft Tissue Infections. *Probiotics & Antimicro. Prot.* <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9289-3>

Demir, E., & Basbülbul, G. (2017). Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Products. *Biotechnology Journal International*, 18(2), 1-9. <https://doi.org/10.9734/BJI/2017/33504>

Elyas, Y.Y., Yousif, N. M., & Mohamed Ahmed, I. A. (2015). Screening of Lactic Acid Bacteria from Sudanese Fermented Foods for Bacteriocin Production. *Journal of*

Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 373-378.

<https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.5.373-378>

Grosu-Tudor, S.S., Stancu, M.-M., Pelinescu, D., & Zamfir, M. (2014).

Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2459-2469. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1671-7>

Hayes, K., Cotter, L., & O'Halloran, F. (2019). In vitro synergistic activity of erythromycin and nisin against clinical Group B Streptococcus isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1381–1390. <https://doi.org/10.1111/jam.14400>

Hwanhlem, N., Chobert, J.-M., & H-Kittikun, A. (2014). Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria isolated from mangrove forest in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, Screening and Optimization. *Food Control*, 41, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.021>

Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., & Leisner, J. J. (2020). Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11(1007). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007>

Khan, A., Vu, K. D., Riedl, B., & Lacroix, M. (2015). Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 124-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.035>

Kitazaki, K., Koga, S., Nagatoshi, K., Kuwano, K., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto,

K., Ano, H., & Katamoto, H. (2017). In vitro synergistic activities of cefazolin and nisin A against mastitis pathogens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(9), 1472-1479. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0180>

Moody, J. (2007). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. En *Clinical microbiology procedures handbook* (2nd ed., págs. 1-23). Washington, DC: ASM Press.

Moshtaghi, H., Rashidimehr, A., & Shareghi, B. (2018). Antimicrobial Activity of Nisin and Lysozyme on Foodborne Pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* at Different pH. *Journal of Nutrition and Food Security*, 3(4), 193-201. <https://doi.org/10.18502/jnfs.v3i4.163>

Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.

Orrego Andrade, B., & Lobos Gilabert, O. (2020). Efecto Antimicrobiano de Bacteriocinas en Bacterias Multirresistentes. Chile: Universidad de Talca. Escuela de Tecnología Médica.

Pereira Barbosa, J., Pires de Amorim Trinidad, D., Souza Tette, P. A., & Furtado Martins, E. M. (2022). Lactic Acid Bacteria Isolated from Fruits: A Review on Methods for Evaluation of Probiotic Potential. *Journal of Food and Nutrition Research*, 10(10), 711-726. <https://doi.org/10.12691/jfmr-10-10-9>

Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V.,

Vila, M. M., & Teixeira, J. A. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, 191, 51-80.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008>

Rivas, F.P., Garro, O.A., & Garro, M.S. (2025). Isolation and Determination of Technological Properties of Lactic Acid Bacteria from Native Plants of the *Gran Chaco* - Region of South America. *Plant Foods for Human Nutrition*, 80:111.
<https://doi.org/10.1007/s11130-025-01349-0>

Ruiz, M. J., García, M. D., Krüger, A., Padola, N. L., Medina Canalejo, L. M., & Etcheverría, A. I. (2023). Libro de Resúmenes: II Congreso de Microbiología Veterinaria. *Identificación de sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas producidas por Lactiplantibacillus plantarum LP5* (págs. 1-3). Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/226081>

Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279-285.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>

Serra-Burriel, M., Keys, M., Campillo-Artero, C., Agodi, A., Barchitta, M., Gikas, A., Palos, C., & López-Casasnovas, G. (2020). Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 15(1): e0227139.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227139>

- Shi, C., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Liu, K., Zhang, G., & Guo, N. (2017). Synergistic antimicrobial effects of nisin and p-Anisaldehyde on *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.056>
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2015). Biomedical Applications of Nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>
- Stephen, J. C., et al. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. ISBN 1-55581-347-X (soft cover). Society for Microbiology. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Tong, Z., Zhang, Y., Ling, J., Ma, J., Huang, L., & Zhang, L. (2014). An In Vitro Study on the Effects of Nisin on the Antibacterial Activities of 18 Antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089209>
- Vukomanović, M., Žunič, V., Kunej, Š., Jančar, B., Jeverica, S., Podlipec, R., & Suvorov, D. (2017). Nano-engineering the Antimicrobial Spectrum of Lantibiotics Activity of Nisin against Gram Negative Bacteria. *Scientific Reports*, 7(4324). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04670-0>

Wang, J., Ma, X., Li, J., Shi, L., Liu, L., Hou, X., Jiang, S., Li, P., Lv, J., Han, L.,

Cheng, Y., & Han, B. (2023). The Synergistic Antimicrobial Effect and Mechanism of Nisin and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Science*, 24(6697).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms24076697>

Yehia, H. M., Alkhuriji, A. F., Savvaidis, I., & Al-Masoud, A. H. (2022). Bactericidal effect of nisin and reuterin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *S. aureus* ATCC 25937. *Food Science and Technology*, 42.
<https://doi.org/10.1590/fst.105321>