

**BASES BIOLÓGICAS DE LOS PATRONES
DE PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA DE
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
(BACTERIOCINAS)**



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

CLAUDIA TESO PÉREZ

Granada, 2023

Directores de Tesis: Dr. Antonio Manuel Martín Platero y Dra. María Esther Fárez Vidal

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Facultad de Ciencias

BASES BIOLÓGICAS DE LOS PATRONES DE PRODUCCIÓN Y RESISTENCIA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (BACTERIOCINAS)

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

Granada, 2023

Director de Tesis

Directora de Tesis

Antonio Manuel Martín Platero

María Esther Fárez Vidal

La doctoranda

Claudia Teso Pérez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Claudia Teso Pérez
ISBN: 978-84-1117-994-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84443>

La doctoranda Claudia Teso Pérez y los directores de tesis Antonio Manuel Martín Platero y María Esther Fárez Vidal garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 16 de Mayo de 2023

Director de Tesis

Directora de Tesis

Antonio Manuel Martín Platero

María Esther Fárez Vidal

La doctoranda

Claudia Teso Pérez

AGRADECIMIENTOS

Realizar una tesis doctoral puede parecer un trabajo individual, pero no hay duda de que es el resultado de todos los granitos de arena que habéis puesto en el largo y tedioso camino denominado "doctorado". Gracias a todos los que estuvisteis, estáis y siempre estaréis.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directores de tesis Antonio Manuel Martín Platero y Esther Fárez Vidal, por acogerme en el grupo de investigación, y darme una oportunidad única para descubrir la belleza, así como los desafíos, que implica trabajar con lo que no se ve; gracias por ayudarme a crecer tanto a nivel profesional como personal. Un especial agradecimiento a Antonio Manuel Martín Platero, con quien he tenido el privilegio de trabajar no solo durante el desarrollo de la tesis sino desde que empecé realizado mi Trabajo Fin de Grado hace más de seis años, y que despertó en mí la curiosidad por la Microbiología ya durante las prácticas de la carrera.

También, agradecer a mi tutor Manuel Martínez, por haber apostado por mí y guiarme durante todos estos años. Gracias por toda tu paciencia y amabilidad. Agradecer a Juanma por su predisposición a ayudar en todo lo que esté en su mano, por las charlas, sus múltiples consejos y por todo lo que he aprendido de él, tanto de la ciencia como de la vida. También me gustaría agradecer a Manolo por confiar en mí, sus enseñanzas y ser mi compañero de viaje en los congresos.

A todos los compañeros y estudiantes de TFG y TFM con los que he compartido innumerables horas de laboratorio, que también han aportado su granito de arena al desarrollo de esta tesis. En especial a Marta por todas las risas tan necesarias en este último año y por diseñarme la preciosa portada. Por último, me gustaría agradecer a Migue, Juan, Sonia y Estefanía, por ser mis pilares en el laboratorio y a los que tengo la suerte de llamar amigos. Gracias por estar siempre ahí cuando lo he necesitado, y por vuestra ayuda inestimable.

Agradecer a todos los compañeros del Departamento de Microbiología con los que he compartido tan buenos momentos. A los radiactivos, Marcos, Mar, Cristina, Antonio Newman, Migue Ruiz, Jaime, Guille...gracias por todos esos viernes de café y copa en el Soho (¡y lo que surja!). A los quintupleplantinos, Curro y Lucía, por la infinidad de desayunos compartidos en el Menorca donde ahogábamos las penas. Y a las

antagónicas Andrea y Sonia, por entendernos sin decir palabra y por seguir siempre libres de *Pseudomonas*.

A mi amiga de toda la vida, Carmen, por tantos años de amistad, por tantos momentos compartidos, por escuchar todos mis audios interminables y ayudarme tanto en mis problemas laborales como personales.

A mi familia, mis tíos, primos y abuelos que siempre te preguntan, se interesan y te apoyan, muchas gracias a todos. En especial agradecer a mis padres y mi hermano que me enseñan, que me apoyan incondicionalmente, me cuidan, me quieren. Porque sin ellos no habría llegado hasta aquí. No hay palabras para agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

Por último, a Andoni. Que me ayuda hasta altas horas de la madrugada, me aconseja, me apoya y está tanto en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos. Por todo lo que haces por mí. Gracias por estar siempre a mi lado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos.....	5
1. Introducción	7
1.1. Distribución y composición de las comunidades microbianas	8
1.1.1. Microorganismos en ambientes naturales	8
1.1.1.1. Comunidades en aguas y suelos.....	8
1.1.1.2. Comunidades simbiotes	11
1.1.2. Microorganismos en ambientes industriales	15
1.1.2.1. Microbiología de los quesos	20
1.2. Bacterias del Ácido Láctico.....	27
1.3. Género <i>Enterococcus</i>	31
1.3.1. Ecología de los enterococos	33
1.3.2. Factores que afectan al crecimiento de enterococos en el ambiente.....	37
1.3.3. El género <i>Enterococcus</i> como patógeno nosocomial	38
1.4. Factores influyentes en la estructura de la comunidad microbiana	41
1.4.1. Factores abióticos.....	41
1.4.2. Factores bióticos.....	47
1.5. Bacteriocinas	52
1.5.1. Clases de bacteriocinas producidas por las BAL.....	56
1.5.2. Genética de la biosíntesis de bacteriocinas	60
1.5.3. Determinantes de inmunidad frente a bacteriocinas.....	63
1.5.4. Diversidad de bacteriocinas en el género <i>Enterococcus</i>	68
2. Objetivos	75
3. Referencias.....	77
CAPÍTULO II. Materiales y Métodos	105
1. Medios de cultivo.....	107
1.1. Medios de crecimiento y producción de bacteriocinas	107
1.2. Medios para ensayo de actividad bacteriana	108
1.3. Medios empleados para la conservación de microorganismos	109
1.4. Tampones	109
2. Microorganismos, titulación y aislamiento.....	109
2.1. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios sólidos	109
2.2. Microorganismos de colección.....	110
3. Ensayos de antagonismo microbiano.....	112
3.1. Ensayos de producción en medio sólido.....	112
3.2. Ensayos de producción en medio líquido	112

4. Producción y purificación de bacteriocinas	113
4.1. Cromatografía de intercambio catiónico	113
4.2. Cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido C-18	114
5. Técnicas de aislamiento de ADN.....	114
5.1. Obtención de células totales de muestras de queso	114
5.2. Extracción de ADN genómico.....	114
5.3. Determinación de la concentración de ADN cromosómico	115
6. Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Secuencias Multilocus	115
7. Identificación de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva	117
7.1. Preparación de librerías	117
7.2. Análisis de secuencias	119
8. Secuenciación	120
9. Electroforesis en geles de agarosa	121
10. Análisis estadísticos	122
11. Búsqueda de homologías	123
12. Análisis filogenéticos.....	123
13. Ensamblaje, anotación y análisis de genomas	124
14. Referencias.....	126

CAPÍTULO III. Enterocin cross-resistance mediated by ABC transport systems

.....	131
Abstract	133
1. Introduction.....	135
2. Materials and Methods.....	138
2.1. Bacterial Strains and Culture Media.....	138
2.2. Inhibitory-Activity Assays	138
2.3. Bacteriocin Production and Purification.....	139
2.4. <i>mr10A/B</i> Gene Cluster Sequencing and Annotation, and Genetic Data	140
2.5. Cluster Analyses.....	140
3. Results.....	140
3.1. <i>mr10A/B</i> Gene Cluster.....	140
3.2. Homologies between the ABC Transporters	141
3.3. Mutant Sensitivity to Enterocins MR10A/B.....	143
4. Discussion	144
5. References.....	148
6. Supplementary material	152

CAPÍTULO IV. Cross-resistance groups in enterococcal populations by means of

ABC-transporter immunity	155
Abstract	157
1. Introduction.....	159
2. Material and methods.....	161
2.1. Mr10EFGH ABC transporter screening.....	161
2.2. Analysis of Mr10EFGH ABC transporter association with bacteriocin structural genes.....	162
2.3. Comparative genomic analysis of the Mr10EFGH ABC transporter genetic context.....	162
2.4. Phylogenetic analysis	163
2.5. Protein specificity.....	163
3. Results.....	163
3.1. Mr10EFGH ABC transporter taxonomic distribution	163
3.2. Mr10EFGH ABC transporter genomic distribution	164
3.3. Molecular evolution of the Mr10EFGH ABC transporter.....	168
4. Discussion	171
5. Conclusions.....	174
6. References.....	175
7. Supplementary material	179

CAPÍTULO V. Comparative genome analysis of *E. faecalis* S-48, *E. faecalis*

UGRA10, and <i>E. faecalis</i> MRR10-3 draft genomes: insight into genomics of saposin-like enterocin producers.....	183
Abstract.....	185
1. Introduction.....	187
2. Material and methods.....	188
2.1. Microbial strains.....	188
2.2. Genome sequencing.....	189
2.3. Genome annotation.....	190
2.5. Bacteriocin screening	191
2.6. MLST assignment	191
2.7. Comparative genome analysis	191
3. Results.....	191
3.1. <i>E. faecalis</i> S-48, <i>E. faecalis</i> UGR10, and <i>E. faecalis</i> MRR10-3 genomes.....	191
3.2. Presence of virulence factors, antibiotic resistance genes and Mobile Genetics Elements (MGEs).....	195
3.3. Specific genomic features of circular and leaderless enterocin producers	197
3.4. Phylogenetic relationship between Circular and MR10A/B-like enterocin carriers.....	198
4. Discussion	199

5. References.....	203
6. Supplementary Material.....	208

CAPÍTULO VI. Bacteriocin-producing enterococci modulate the microbiota

present in cheese made from raw milk	213
Abstract.....	215
1. Introduction.....	217
2. Material and methods.....	219
2.1. Sampling and microbial enumeration.....	219
2.2. Antimicrobial assays and microbial isolation.....	219
2.3. DNA extraction	220
2.4. Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA)	220
2.5. Data analysis.....	221
2.5.1. 16S rRNA metagenomic sequencing	221
2.5.2. Sequences and data analysis.....	222
3. Results.....	223
3.1. Differential diversity among samples.....	223
3.2. Differential antagonistic producers frequency among <i>enterococci</i>	228
3.3. Impact of enterocin producers on population and community diversity.....	229
4. Discussion	233
5. References.....	238
6. Supplementary material	244

CAPÍTULO VII. Discusión general y Conclusiones

1. Discusión	247
2. Conclusiones	259
3. Referencias.....	261

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. BAL utilizadas comúnmente como probióticos.....	30
Tabla I.2. Factores de virulencia enterocócica y su asociación con el estadio de la enfermedad.	40
Tabla I.3.Principales bacteriocinas aisladas de enterococos.	69
Tabla I.4. Características de las proteínas predichas codificadas por el grupo de genes <i>as-48</i> ...	71
Tabla II.1. Composición general del medio de cultivo TSB	107
Tabla II.2. Composición general del medio de cultivo BHI	107
Tabla II.3. Composición general del medio de cultivo KF	108
Tabla II.4. Composición general del medio de cultivo MHA	108
Tabla II.5. Muestras de quesos analizadas	110
Tabla II.6. Mutantes del <i>cluster</i> de genes de AS-48 y cepas controles	111
Tabla II.7. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados	116
Tabla II.8. Composición general de la reacción de amplificación para MLSA	116
Tabla II.9. Composición general de la mezcla de la primera PCR de construcción de librerías V4	118
Tabla II.10. Secuencias de los adaptadores index (Illumina, 2016).....	119
Tabla II.11. Composición general de la mezcla de la segunda PCR.....	119
Tabla II.12. Condiciones de PCR para cada par de cebadores	119
Tabla II.13. Composición del tampón de electroforesis TAE 1x	121
Tabla II.14. Composición de la solución de carga	122
Table III.1. Bacterial strains used in the present study	139
Table III.2. Comparison between MR10A/B and AS-48 pump-forming proteins.....	141
Table IV.1. Genera with proteins homologous to each component of the Mr10EFGH transporter	164
Table V.1. Main genomic features of <i>E. faecalis</i> S48, UGRA10 and MRR10-3 genomes strains	192
Table V.2. Main Gene ontology annotations	192
Table V.3. Main gene ontology annotations of unique core genes of genomes associated to MR10A/B-like or circular bacteriocins.....	198
Table VI.1. Primers used for MLSA analysis.	221
Table VI.2. Ten most abundant bacterial genera per dairy animal obtained through the analysis of 16S rRNA metagenome.	226
Table VI.3. Percentage of enterocin producers per sample.....	229
Table VI.4. Effect of enterocin producing populations in enterococcal diversity.....	229

Table VI.5. t-test of dependents variables exploring the sensitivity of enterococci belonging to the same cheese and different cheeses.	230
Table VI.6. General Linear Models exploring the effects of the presence/absence of <i>Enterococcus</i> -bacteriocin producers in different alpha diversity indexes of the bacterial community of cheeses.	231
Table VI.7. Pearson's correlations exploring the effects of proportion of <i>Enterococcus</i> -bacteriocin producers against two indicator strains and different alpha diversity indexes of the bacterial community of cheeses.	232
Table VI.8. Correlations exploring the association between of proportion of <i>Enterococcus</i> -bacteriocin producers different alpha diversity indexes of the bacterial <i>Enterococcus</i> population of cheese.	233
Supplementary Table SIII.1. Comparison between putative proteins of <i>mr10</i> and <i>150</i> gene clusters.....	152
Supplementary Table SIII.2. Inhibition halo (expressed in mm) of each <i>E. faecalis</i> strain against different concentrations of MR10A/B bacteriocin.	152
Supplementary Table SIV.1. Bacterial genomes downloaded from NCBI.....	179
Supplementary Table SV.1. Genomes found associated with some bacteriocin with a saposin-like fold.	210
Supplementary Table SVI.1. Main raw milk cheese features and microbiological counts.....	244

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Cambios del ecosistema microbiano del intestino humano en función de la edad, así como posibles factores que podrían afectar la composición de la microbiota en diferentes etapas de la vida.	13
Figura I.2. Principales países productores de queso a nivel mundial (A) y producción mundial de queso por tipo de leche (B).	21
Figura I.3. Proceso de fabricación del queso.....	22
Figura I.4. Interacciones bióticas posibles en comunidades microbianas.	48
Figura I.5. “Piedra, papel o tijeras” juego de dinámica de competencia en comunidades de tres cepas.....	55
Figura I.6. Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL.	59
Figura I.7. Superposición de PisI (azul) con EntA-im (naranja) e ImB2 (amarillo).	65
Figura I.8. Organización genética del <i>cluster</i> de genes responsable de la enterocina AS-48.	72
Figura I.9. Organización genética del cluster de genes responsable de las enterocinas entJ/I.	73
Figure III.1. Common bacteriocin-gene cluster organization.	136
Figure III.2. Genetic organization of AS-48, MR10A/B and L50A/B enterocins.	142
Figure III.3. Homology between gene clusters of enterocins AS-48 (a), MR10A/B (b), and L50A/B (c).	143
Figure III.4. Sensitivity of AS-48 mutants to MR10A/B. Heatmap depicting the cluster analysis of mutant sensitivity against MR10A/B.....	144
Figure IV.1. Mr10EFGH transporter phylogenetic tree.	165
Figure IV.2. Comparison between different bacteriocin gene clusters.	166
Figure IV.3. Comparison between contigs containing the transporter Mr10EFGH associated with the same bacteriocin.....	167
Figure IV.4. Protein similarity between the different carriers of Mr10E (A) and Mr10F(B) proteins.....	169
Figure IV.5. Tanglegram between genomes carrying the Mr10EFGH transporter and their <i>mr10E</i> gene.	170
Figure IV.6. Maximum-likelihood phylogenetic tree of the core genomes from strains carrying the Mr10EFGH transporter.	171
Figure V.1. Ten most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories.	193
Figure V.2. Top twenty most abundant InterProScan gene families for <i>E. faecalis</i> S48, <i>E. faecalis</i> UGRA10 and <i>E. faecalis</i> MRR10-3 genomes.....	194
Figure V.3. Enterococcal virulence factors found in <i>E. faecalis</i> S48, UGRA10 and MRR10-3 genomes.....	196

Figure V.4. Core genes shared between genomes associated to circular and leaderless bacteriocins without total core gene.	197
Figure V.5. Phylogenetic tree of bacteriocin-associated genomes.	199
Figure VI.1. Cheese microbial counts.	224
Figure VI.2. Bacterial genera present in raw milk cheeses.	225
Figure VI.3. Phylogenetic tree of <i>Enterococcus</i> strains isolated from cheese made with raw milk.	227
Figure VI.4. Enterocins producers.	228
Figure VI.5. Boxplot showing the difference in sensitivity found between <i>enterococci</i> present in the same cheese sample and those in different cheeses samples.	230
Figure VI.6. Boxplot showing differences in Shannon's (A) and Faith's phylogenetic diversity indexes (B), and Amplicon Sequence Variant richness (C) between raw milk cheeses with and without presence of <i>Enterococcus</i> -bacteriocin producers.	231
Figure VI.7. Correlations between proportion of <i>Enterococcus</i> -bacteriocin producers against <i>E. faecalis</i> S47 (from the whole <i>Enterococcus</i> population) and Shannon's diversity index of the bacterial community of cheeses.	232
Supplementary Figure SIII.1. Antibacterial activity assays.	153
Supplementary Figure SV.1. Twenty most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories of circular bacteriocin-associated genomes.	208
Supplementary Figure SV.2. Twenty most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories of MR10-like bacteriocin-associated genomes.	209

Listado de abreviaturas

ABC: ATP-Binding Cassette	IDH: Intermediate Disturbance Hypothesis
Ace: Adhesina al colágeno de <i>E. faecalis</i>	IET: Interspecies Electron Transfer
Acm: Adhesina al colágeno de <i>E. faecium</i>	IR: Inverted Repeat
ACT Artemis Comparison Tool	KF: Kenner Fecal
ADNr: ADN ribosómico	LAB: Lactic Acid Bacteria
ARNr: ARN ribosómico	LAPs: Linear Azole Containing Peptides
AS: Sustancia de agregación AS	Man-PTS: Mannose Phosphotransferase System
ASV: Ampli Sequence Variant	MGEs: Mobile Genetic Elements
Aw: Actividad del Agua	MHA: Mueller Hinton Agar
BAL: Bacterias del Ácido Láctico	MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis
BAP: Bacterias del Ácido Propionico	MLSA: Multilocus Sequence Analysis
BHA: Brain Heart Infusion Agar	MSG: Monosodium Glutamate
BHI: Brain Heart Infusion	MSOP: Modification of the protein Salting-Out Procedure
CARD: Comprehensive Antibiotic Resistance Database	NBD: Nucleotide Binding Domain
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo	NSLAB: Non-Starter Lactic Acid Bacteria
CHEF: Clamped Homogeneous Electric Fields	NTP: Nucleoside Triphosphate
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat	ORF: Open Reading Frame
DUF: Domain of Unknown Function	PBPs: Periplasmic binding proteins
Ebp: Endocarditis y pelos asociados a biopelícula	PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	PGPB: Plant Growth-Promoting Bacteria
EfaAfs: Antígeno de endocarditis de <i>E. faecalis</i>	PH: Pleckstrin Homology
EfaAfm: Antígeno de endocarditis de <i>E. faecium</i>	PubMLST: Public Databases for Molecular Typing
FIGE: Field Inversion Gel Electrophoresis	QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology
GLM: General Lineal Model	QS: Quorum Sensing
GRAS: Generally Recognized As Safe	REA: Restriction Enzyme Accessibility
HTS: High-throughput sequencing	RG: Resistance Genes
HK: Histidine Kinase	

RGI: Identificador de Genes de Resistencia

RiPPs: Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides

RND: Resistance-Nodulation-Division

ROS: Reactive Oxygen Species

RR: Response Regulator

ST: Sequence Type

T6SS: Type VI Secretion System

TCC: Trifeniltetrazolio

TFA: Ácido trifluoroacético

TMDs: Transmembrane domains

TMS: Transmembrane Region

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

VFDB: Virulence Factor Database

VR: Virulence Factors

VRE: Vancomycin-Resistant *Enterococcus*

RESUMEN

Los microorganismos conforman la mayor parte de los seres vivos del planeta. Estos se pueden encontrar en prácticamente cualquier ambiente formando comunidades microbianas complejas esenciales para la salud humana, ambiental y en múltiples áreas biotecnológicas. Sin embargo, a pesar del gran impacto para la humanidad nuestro conocimiento de los principios que gobiernan la estructuración y funcionamiento de los ecosistemas microbianos es muy limitada, lo que implica una escasa capacidad para un control y optimización racional de las comunidades microbianas. En estas comunidades se producen multitud de interacciones esenciales en la estructuración, mantenimiento y desarrollo de las mismas, siendo el antagonismo clave en la configuración del equilibrio entre las poblaciones. Múltiples sustancias antimicrobianas están involucradas en el antagonismo, destacando los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias (bacteriocinas), como uno de los compuestos antagónicos más comunes en las especies microbianas. Su producción implica la expresión coordinada de varios grupos de genes distribuidos en uno o más operones, pudiendo estar ubicados tanto en el cromosoma como en plásmidos. En la producción de estas sustancias antibióticas es esencial que los productores porten su propio gen de inmunidad para evitar la autoinhibición.

Sabemos que la producción de bacteriocinas está ampliamente distribuida entre las especies bacterianas, sin embargo, esto contrasta con la alta diversidad de comunidades de microorganismos a las que pertenecen, lo que parece contradecir el efecto letal de las bacteriocinas. Su estudio se ha limitado a un punto de vista local en la interacción bilateral entre cepas productora y sensible, dejando de lado que suelen vivir en ambientes de diferente grado de complejidad microbiológica. Además, los estudios de inmunidad se centran en los patrones de resistencia en la propia inmunidad del organismo productor, pero con poca frecuencia indagan en los patrones de resistencia de otros individuos que puedan coexistir con los productores. Por ello, el objetivo general de la presente tesis ha sido discernir los mecanismos moleculares y ecológicos que explican los patrones de producción y resistencia de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) en comunidades de bacterias lácticas.

Para ello se comenzó estudiando las bases moleculares de la producción y resistencia a bacteriocinas de distintas estirpes mediante ensayos de inmunidad cruzada entre cepas productoras de las bacteriocinas AS-48, en concreto *Enterococcus faecalis* A-

48-32, y diversos mutantes de la misma; y cepas productoras de MR10A/B como *Enterococcus faecalis* MRR10-3. Estos ensayos mostraron que la resistencia cruzada por parte de las cepas productoras de AS-48 a la enterocina MR10A/B se debe a la presencia de un transportador ABC (Transportador-2 en el *cluster* de AS-48). Dicho transportador aparece tanto en el *cluster* de genes de AS-48 como de MR10-3, siendo el responsable de la inmunidad en cada caso. Para estos análisis, describimos la composición del *cluster* génico de MR10A/B, que aún no estaba descrito. Estos hallazgos abren el camino a la investigación de la resistencia más allá de las variantes de una misma bacteriocina.

La constatación de este mecanismo compartido de inmunidad condujo a estudiar la variabilidad de dichos genes de inmunidad (Transportador-2) y su distribución en otras especies. En concreto este transportador se encontró en múltiples poblaciones de enterococos y asociado con diferentes bacteriocinas más allá de AS-48 o variantes de MR10A/B, así como huérfano en bacteriocinas. Teniendo en cuenta este último caso, la resistencia a la bacteriocina podría movilizarse independientemente de su bacteriocina asociada, lo que podría generar diversas poblaciones que compartan un sistema de resistencia común. Esta característica es crucial para desarrollar modelos más precisos de dinámica de producción/resistencia en la naturaleza. Adicionalmente, durante estos estudios pusimos de manifiesto el papel clave de Mr10E en el grado de inmunidad/resistencia, componente del que se desconoce su función. Al estudiar la especificidad de cada componente del transportador se mostró que la secuencia primaria de Mr10E cambia en función de la bacteriocina de su *cluster* correspondiente, mientras que el resto de componentes cambian en función de la especie en la que se localizan, independientemente de la bacteriocina a la que se asocie.

Dada la posibilidad de aparición de diversos grupos de poblaciones con un sistema de resistencia común, se realizó un estudio de genómica comparativa utilizando las cepas de *E. faecalis* S-48, *E. faecalis* UGRA10 y *E. faecalis* MRR10-3 como bacterias modelo para los productores de enterocina AS-48 y L50. Mediante la secuenciación de dichos genomas y el análisis genómico comparativo con los genomas de *E. faecalis* disponibles públicamente, pusimos de manifiesto poca cohesión entre estos productores; sin embargo, algunas enterocinas podrían impulsar la expansión clonal de poblaciones específicas.

Para finalizar, se ha estudiado el efecto de la producción de bacteriocinas a nivel de poblaciones y comunidades de bacterias lácticas. Para ello se utilizó la microbiota de quesos como sistema modelo; y más concretamente el género *Enterococcus* como

bacteria bacteriocinogénica modelo debido a su frecuente producción de enterocinas y presencia en niveles variables en estas comunidades. Mediante la caracterización y cuantificación de las poblaciones de enterococos y comunidades de bacterias lácticas, así como gracias a la detección y cuantificación de las capacidades enterocinogénicas de las poblaciones de enterococos, se ha puesto de manifiesto una tendencia general de mayor diversidad en las comunidades de bacterias lácticas asociadas a los productores de enterocina. Sin embargo, la mayor diversidad se encuentra relacionada negativamente con los productores de enterocinas, de forma que, a niveles bajos o moderados de productores de enterocinas mayor diversidad de bacterias lácticas se alcanzan en la comunidad del queso. En qué medida estos resultados pueden extenderse a otras especies de LAB o incluso a otros ecosistemas microbianos silvestres necesitará más investigación. De todos modos, nuestro estudio apunta a la producción de bacteriocinas como un factor importante a tener en cuenta para controlar las comunidades bacterianas.

Por tanto, los resultados obtenidos en la presente tesis suponen un avance en el conocimiento de los patrones que gobiernan las comunidades microbianas, poniendo de manifiesto la importancia de las interacciones antagonistas mediadas por bacteriocinas en la estructuración y comprensión de las dinámicas poblacionales y comunitarias de microorganismos. Futuros estudios en otro tipo de comunidades lácticas o comunidades naturales más complejas permitirán obtener un conocimiento exhaustivo de cómo las poblaciones de una comunidad se organizan ante unas condiciones abióticas dadas, permitiendo así la predicción, el diseño y la explotación racional de las comunidades microbianas.

CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos

1. Introducción

Los microorganismos son los organismos más abundantes de la Tierra, e intervienen en procesos vitales de los ecosistemas, como la producción primaria, la descomposición, el ciclo de nutrientes, la regulación del clima, el almacenamiento de carbono, la propagación de enfermedades y la transformación de contaminantes (Ducklow, 2008). De hecho, se estima que la Tierra está habitada por entre 10^{11} - 10^{12} especies microbianas (Locey & Lennon, 2016). Éstos han colonizado ambientes extremos, pudiendo encontrarlos en ambientes extremadamente ácidos, alcalinos, salados, ricos en metales, radiactivos o bajos en nutrientes, así como en ambientes de alta presión, de alta temperatura o temperaturas bajo cero en el hielo marino (O'Malley & Dupré, 2007).

A pesar de su abundancia, en comparación con animales y las plantas, la diversidad microbiana es ampliamente desconocida. Hasta hace poco se tenía escasa información sobre la diversidad microbiana ya que el conocimiento sobre ésta se basaba en métodos de cultivo tradicionales, pero gracias al desarrollo de técnicas moleculares de secuenciación masiva y a los diseños experimentales *high-throughput*, se ha conseguido secuenciar genomas de comunidades enteras de forma más eficiente permitiendo un conocimiento más profundo de la diversidad de comunidades de microorganismos (Wang et al., 2020).

Los estudios de diversidad microbiana se completan con el estudio de la estructura de la comunidad, es decir por qué están compuestas y cómo se relacionan entre sí. Mientras que la diversidad refleja los tipos de microbios presentes en un hábitat, la estructura de la comunidad abarca información cuantitativa sobre los diferentes taxones y gremios (Liesack et al., 1997). De hecho, el análisis de la estructura de la comunidad permite evaluar el papel y la importancia de los microbios en sus hábitats y ecosistemas. A pesar del papel clave que juegan los microorganismos en multitud de funciones importantes de los ecosistemas, aún no está claro hasta qué punto la diversidad microbiana o la composición de la comunidad son importantes para determinar las tasas funcionales del ecosistema (Morris et al., 2020). Esto, unido al rápido cambio global que se está produciendo, la comprensión de los mecanismos de control mediante los cuales las comunidades microbianas determinan el funcionamiento de los ecosistemas es particularmente relevante.

1.1. Distribución y composición de las comunidades microbianas

Los microorganismos tienen una distribución ubicua, apareciendo en todos los ecosistemas de la biosfera, mostrando patrones biogeográficos bien diferenciados. Estos patrones se establecen debido a múltiples factores, tanto bióticos como abióticos, que, junto con procesos de mutación, selección, dispersión o deriva (Hanson et al., 2012), acabarán determinando la composición y dinámica microbianas de cada ecosistema de microorganismos. Pero además de en ambientes naturales, comunidades microbianas de distinta complejidad y composición, juegan un papel importante en múltiples procesos industriales, tales como la producción de alimentos o la biorremediación.

1.1.1. Microorganismos en ambientes naturales

1.1.1.1. Comunidades en aguas y suelos

Un gramo típico de suelo contiene miles de millones de microorganismos individuales que representan miles de especies diferentes (Yarwood, 2021). La enorme biodiversidad de microorganismos vivos presentes en el suelo se puede considerar la denominada “biomasa microbiana del suelo” (Hirsch et al., 2010). Los estudios recientes con técnicas independientes de cultivo han podido obtener mayor información sobre la vida microbiana del suelo, poniéndose de manifiesto que en el suelo se pueden encontrar organismos pertenecientes a los tres principales dominios: Bacteria, Eucarya y Archaea (Gattinger et al., 2002).

Las comunidades de microorganismos presentes en el suelo llevan a cabo múltiples actividades entre las que se incluyen: ciclo del carbono y el nitrógeno, renovación de materia orgánica, degradación de xenobióticos y formación de agregados en el suelo, además de interactuar simbióticamente con las plantas (Hirsch et al., 2010). Por tanto, los cambios en la microbiota del suelo afectan directamente a las funciones de este ecosistema, especialmente los ciclos de carbono y nitrógeno (Deng et al., 2018)

Se ha podido observar que la cantidad y el tipo de bacterias que podemos encontrar en los diferentes tipos de suelos dependen de las condiciones del mismo, incluyendo la temperatura, la humedad, la presencia de sal y otros productos químicos, así como la cantidad y tipos de plantas. Además, se ha visto que la distribución bacteriana en el suelo no es uniforme, siendo mucho mayor la concentración de bacterias que se encuentran alrededor de las raíces de las plantas, en la denominada rizosfera (Glick, 2012). La

interacción bacteria-plantas puede ser beneficiosa, dañina o neutral para la planta. Aquellas bacterias que benefician a las plantas se les denomina bacterias promotoras del crecimiento vegetal (o PGPB del inglés Plant Growth Promoting Bacteria) y se pueden encontrar en la rizósfera, en la superficie de la raíz o asociados a la misma (Grover et al., 2011). La actividad de dichas bacterias es tan importante que en la agricultura se han estado introduciendo bacterias específicas en el suelo durante mucho tiempo. Estas bacterias suponen un beneficio para las plantas ya que se consideran suministro de nutrientes para los cultivos, estimulan el crecimiento de las plantas controlando los fitopatógenos, producen fitohormonas, mejoran la estructura general del suelo, acumulan compuestos inorgánicos y participan en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Ortiz & Sansinenea, 2022).

Además de en el suelo, los microorganismos también constituyen un componente importante en los diversos ambientes acuáticos. En estos encontramos microbios funcionalmente diversos y que juegan un papel crucial en la calidad del agua y la salud humana. Gracias a la multitud de procesos biogeoquímicos en los que están implicados, mejoran la sostenibilidad, estabilidad y calidad de los ecosistemas acuáticos (Zinger et al., 2012). Por ejemplo, multitud de microorganismos que habitan en el agua tiene la capacidad de eliminar metales pesados o el petróleo (Dixit et al., 2015). También nos encontramos microorganismos con capacidad de catalizar procesos de tratamiento de aguas residuales eliminando materia orgánica, metales tóxicos, olores o nutrientes, incluidos el nitrógeno y el fósforo (Ferrera & Sánchez, 2016).

Los sistemas de agua dulce de interior como lagos, ríos o estanques, proporcionan diversos hábitats y recursos ambientales para el desarrollo de vida microbiana. Los microorganismos aquí presentes están implicados en la descomposición de la materia orgánica en otros nutrientes de los que pueden alimentarse otros organismos; controlan la calidad del agua; participan en la remineralización y restauración de nutrientes que influyen en la circulación de materiales dentro de estos ecosistemas; biodegradan compuestos contaminantes; y suponen una fuente de alimento para otros organismos (Newton et al., 2011).

Gracias a técnicas independientes de cultivo, se ha puesto de manifiesto que en sistemas acuáticos de agua dulce hay presencia de bacterias Gram positivas, al contrario de lo que se pensaba inicialmente (Glöckner et al., 2000). De hecho, se ha podido determinar que especies pertenecientes a los filos *Bacteroidota* (anteriormente

denominado *Bacteroidetes*), *Bacillota* (anteriormente denominado *Firmicutes*), *Pseudomonadota* (anteriormente denominado *Proteobacteria*) y *Actinomycetota* (anteriormente denominado *Actinobacteria*) (Yang et al., 2019) son las mayoritarias, estas últimas especialmente abundantes en el bacterioplancton. De igual forma, se ha podido determinar que la mayoría de las bacterias que habitan en los sistemas de agua dulce son autóctonas del agua dulce, y difieren taxonómicamente de las bacterias que habitan en los ambientes terrestres circundantes.

Además se ha visto que la distribución de estas bacterias autóctonas en la columna de agua responde a gradientes físico-químicos, tales como la concentración de nutrientes, la temperatura o la cantidad de luz (Burganskaya et al., 2018), además de jugar un papel relevante las interacciones bióticas como la depredación de metazooplancton y de protistas (Langenheder & Jürgens, 2001)

En el caso de los océanos, los microorganismos representan más del 70% de la biomasa marina total (Bar-On et al., 2018) formando parte del microbioma oceánico. y siendo responsable de funciones metabólicas esenciales. Al igual que en las comunidades de agua dulce, en las comunidades oceánicas la composición también se ve influenciada por gradientes físico-químicos relacionados con los cambios estacionales, la profundidad y las características de la materia orgánica (Moran, 2015).

Entre sus múltiples efectos, estas comunidades son esenciales en los niveles CO₂ atmosférico, siendo para ello de especial relevancia las interacciones bióticas que establecen complejas redes tróficas que van a determinar los flujos del carbono (Pomeroy et al., 2007). Sutiles cambios en la composición y actividad de los microorganismos pueden influir profundamente en el ciclo global del carbono.

Como hemos visto existen multitud de microorganismos implicados en procesos fundamentales del océano y de la Tierra. Actualmente se sabe que las comunidades microbianas en el agua de mar conforman unidades ecológicas que se encuentran altamente interconectadas y funcionan en sintonía (Steele et al., 2011). Lo que implica que existan reglas de ensamblaje comunitario entre el plancton microbiano (Beman et al., 2011) y que se coordinen procesos metabólicos complejos (Ottesen et al., 2014). Es por tanto crucial caracterizar las comunidades de microorganismos acuáticos y comprender su impacto en los entornos acuáticos.

1.1.1.2. Comunidades simbiotes

Además de en ambientes naturales de vida libre, los microorganismos han creado nichos específicos estrechamente asociados con diferentes organismos adaptando su modo de vida a una interacción simbiótica (Kamagata & Narihiro, 2016). Actualmente, la simbiosis es uno de los procesos evolutivos más importantes que influyen en biodiversidad a lo largo de la historia de la vida en la Tierra. Esta podría definirse como cualquier tipo de interacción íntima y de largo plazo entre diferentes organismos (Raina et al., 2018). Las simbiosis microbianas pueden ir desde meras interacciones metabólicas y defensivas, hasta la integración celular y genómica completa. Además, las interacciones simbióticas no siempre benefician a ambos organismos implicados (mutualismo), pudiendo darse relaciones simbióticas comensalistas o parasitarias.

En el caso de los humanos, cada persona tiene en torno a 10-100 mil millones de células microbianas que conviven simbióticamente en su cuerpo, localizándose la gran mayoría de ellas en el intestino (Ursell et al., 2012). Esto se traduce en que el 90% de las células que hay sobre y dentro del cuerpo humano son microbianas (Pflughoeft & Versalovic, 2012), estando dominadas por los filos bacterianos *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Actinomycetota* y *Pseudomonadota*. Pero esta gran cantidad de microorganismos no se distribuye al azar, apareciendo patrones de composición microbianas específicos en función del sitio anatómico del cuerpo humano donde se desarrollan, según la complejidad y las funciones de la comunidad; además de que existe cierta correlación con el estado de salud, el genotipo, la dieta y la higiene de un individuo (Dekaboruah et al., 2020).

Desde que nacemos, se inicia una interacción constante entre el cuerpo humano y su microbiota autóctona, siendo estas interacciones importantes a la hora de mantener la salud y el bienestar general del individuo (Ogunrinola et al., 2020). La mayoría de los microbios presentes en el cuerpo humano son comensales, por tanto, esta asociación permite a los humanos beneficiarse de microorganismos sin sufrir daños (Ghosh, 2013). Aunque de forma esporádica, y bajo unas condiciones determinadas, los microbios comensales pueden actuar como patógenos oportunistas provocando infecciones, así como una cepa microbiana puede ser inocua para un hospedador y actuar como patógeno en otro (Ghosh, 2013).

El intestino, es el órgano más estudiado a nivel de microbiota. La microbiota aquí presente varía a lo largo del tracto (desde el esófago al colon), pudiendo encontrar hasta

más de 100 mil millones de microbios (Wang et al., 2017). Pero es en el intestino grueso donde podemos encontrar el ecosistema microbiano más complejo y dinámico (Martinez-Guryn et al., 2019). Esta microbiota es la única que evoluciona continuamente durante la vida del hospedador, debido a múltiples factores que influyen en la misma (Figura I.1). Las propias condiciones del nacimiento van a influir en la primera microbiota que colonice el intestino. Los lactantes nacidos por parto natural entran en contacto con la microbiota de la vagina materna, encontrándose mayores proporciones de lactobacilos en los primeros días de vida (Avershina et al., 2014). Sin embargo, aquellos lactantes nacidos por cesárea contienen una microbiota intestinal colonizada principalmente por especies de *Clostridium* (Jakobsson et al., 2014). Tras el nacimiento el intestino es colonizado primeramente por anaerobios facultativos que establecen un ambiente que favorecerá la posterior colonización de anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium spp.* La leche materna juega un papel crucial en la configuración de la composición de la comunidad microbiana, encontrándose una microbiota más sana con una población dominada por *Bifidobacterium* y menos abundancia de especies como *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* en comparación a los neonatos alimentados con fórmula (Rinninella et al., 2019). Sin embargo, al llegar al primer año de vida, la diversidad microbiana comienza a cambiar, adquiriendo una composición más similar a un perfil microbiano de adulto (Palmer et al., 2007), alcanzándose una mayor estabilidad a los 3 años de vida. En la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es más estable, aunque puede sufrir perturbaciones debido entre otros factores a la urbanización, la movilidad global, las dietas altamente procesadas, el saneamiento y la higiene o la toma de antibióticos (Dethlefsen & Relman, 2011). Las principales bacterias encontradas en el intestino pertenecen a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Peptococcus* y *Ruminococcus* (Donaldson et al., 2016). Mientras que en el estómago e intestino delgado se encuentran las bacterias de los géneros *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Veilonella*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* o *Rothia* entre muchos otros (Dridi et al., 2012). Al llegar a la vejez en general se observa una disminución de la abundancia de especies 'asociadas con la salud', tales como las bifidobacterias, y una mayor abundancia de *Pseudomonadotas* (Martino et al., 2022) (Figura I.1).

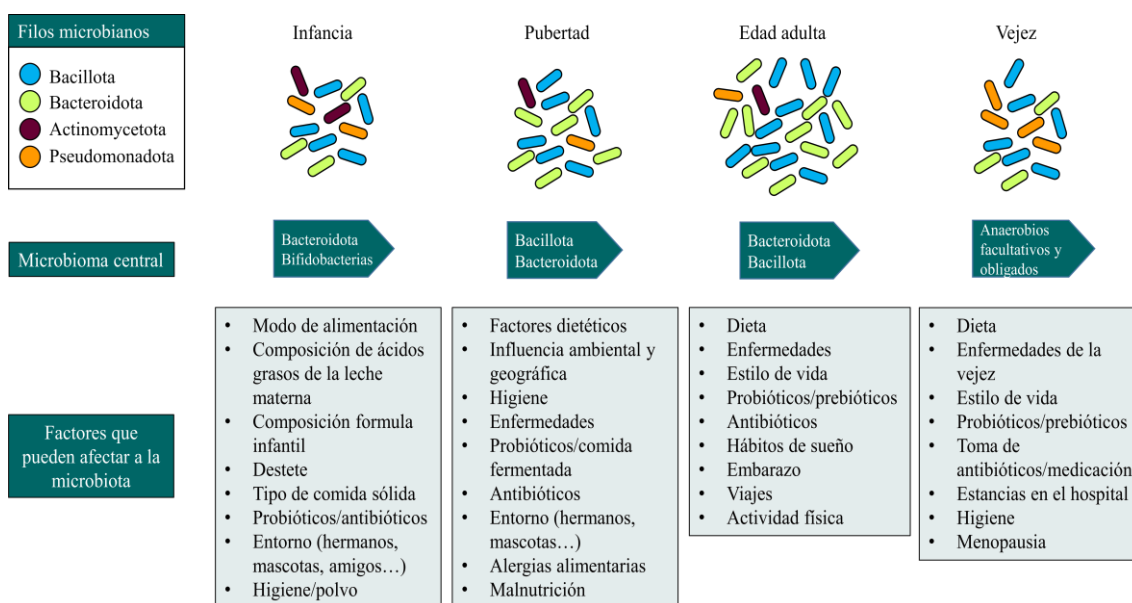


Figura I.1. Cambios del ecosistema microbiano del intestino humano en función de la edad, así como posibles factores que podrían afectar la composición de la microbiota en diferentes etapas de la vida. Adaptado de Nagpal et al., (2018).

Todas las comunidades de microorganismos presentes en el cuerpo humano benefician a su hospedador de múltiples formas. Las bacterias presentes en la piel y sistema respiratorio producen bacteriocinas, tóxicos o antibióticos que inhiben el crecimiento y colonización de otras cepas bacterianas patógenas (Chiller et al., 2001). La microbiota oral ayuda a la digestión, confiere inmunidad, resistencia a la colonización, síntesis de vitaminas (Dagli et al., 2016). La microbiota intestinal por su parte ayuda en la degradación de carbohidratos que no se pueden digerir tales como celulosa, hemicelulosa o pectina. También permiten la síntesis de vitaminas que mejoran la absorción de iones, controlan la proliferación y diferenciación del epitelio, así como inhiben la colonización de cepas patógenas (Hall et al., 2017). Sin embargo, las alteraciones de esta microbiota conllevan el desarrollo de enfermedades tales como impétigo, celulitis, acné, caries dentales, gingivitis, cáncer de colon o enfermedad de Crohn, faringitis, neumonía, entre muchas otras.

Al igual que en humanos, la microbiota intestinal de los animales rumiantes juega un papel fundamental, especialmente la residente en el rumen. Dada su dieta basada en alimentos con alto contenido en celulosa y otros polisacáridos complejos, los rumiantes dependen de una relación simbiótica con los microorganismos presentes en el rumen, que,

gracias a la fermentación anaeróbica, son capaces de degradar dichos compuestos produciendo ácidos grasos volátiles, vitaminas, y proteínas útiles para los rumiantes, facilitando la posterior absorción por el resto del intestino (Xu et al., 2021). A su vez, es importante que el hospedador proporcione un entorno adecuado para la supervivencia de los microorganismos, estableciéndose así una relación comensal (Choudhury et al., 2012).

Si bien en general las bacterias ofrecen beneficios a los rumiantes en algunos casos pueden ser perjudiciales para el rendimiento animal. Por ejemplo, en ganado alimentado con grano, *Streptococcus bovis* provoca una rápida acumulación de ácido láctico que conlleva una acidosis ruminal. *Fusobacterium necrophorum* puede actuar como patógeno oportunista utilizando el lactato e infectando las úlceras ruminales. O las bacterias metanógenas que al producir metano no solo supone una pérdida de energía para el animal, sino que además contribuyen a la generación de gases de efecto invernadero asociados al calentamiento global (Wells & Varel, 2011).

Otros vertebrados no mamíferos cuya microbiota intestinal simbiote está muy bien caracterizada es la de las aves. La amplia variedad de dietas y condiciones de vida de las aves las hace de particular interés para la investigación del microbioma. Las principales bacterias que se encuentran en el intestino aviar pertenecen a los filos *Bacteroidota*, *Pseudomonadota* y *Bacillota* (Waite & Taylor, 2014). Aunque se han encontrado diferencias significativas entre las aves en cautiverio y las silvestres debido a diferencias ambientales, dietéticas, sistemas de apareamiento únicos y capacidad migratoria de larga distancia. Por ejemplo, taxones específicos de *Clostridiales*, *Synergistota* y *Actinomycetota* predominan en aves silvestres mientras en aves cautivas, su microbioma intestinal está dominado por miembros de *Gammaproteobacteria* (Colston & Jackson, 2016). A pesar de que a partir de aves cautivas y silvestres se pueden aislar *Bacillota*, la proporción de los mismos es superior en aves de corral cautivas en comparación a las aves silvestres (Waite & Taylor, 2015). Además, se han encontrado diferencias en la composición microbiana de las aves silvestres en los meses de verano e invierno debido a cambios drásticos en la dieta, que los individuos en cautiverio no experimentan (Wienemann et al., 2011). Si las aves en libertad son migratorias, les permite entrar en contacto con diferentes hábitats y organismos intermedios, haciendo que las fuentes de su microbiota intestinal sean más diversificadas, y por tanto existiendo

mayor probabilidad de transmisión mutua de microorganismos intestinales (Sun et al., 2022).

En el caso de los insectos, su microbiota intestinal ha demostrado ofrecer múltiples efectos beneficiosos tales como mejoría en la calidad de las dietas, participación en la digestión de componentes recalcitrantes, protección frente a patógenos e incluso influyen en la fertilidad y reproducción (Engel & Moran, 2013). Al igual que los humanos, las comunidades microbianas son más abundantes en el intestino. De hecho, se ha comprobado que algunos microbios intestinales están implicados en la degradación de compuestos tóxicos ayudando a la adaptación ambiental de sus insectos hospedadores (Itoh et al., 2018). Además, se ha observado que la microbiota intestinal de los insectos tiene potencial para proporcionar recursos biológicos aplicables en la medicina y la industria, debido a los péptidos antimicrobianos y enzimas digestivas efectivos y optimizados (Jang & Kikuchi, 2020). Entre las bacterias más abundantes en el intestino de los insectos encontramos aquellas pertenecientes a los filos *Pseudomonadota* y *Bacillota*, seguidos de *Bacteroidota*, *Mycoplasmata* y *Actinomycetota* (Yun et al., 2014).

Al igual que en animales y humanos, el desarrollo de los insectos también influye en su microbiota. Al nacer, la mayoría de los insectos son casi axénicos, a excepción de los microorganismos adquiridos verticalmente, y van adquiriendo su microbiota mediante coprofagia, canibalismo o trofalaxis. En insectos holometábolos, la microbiota que presentan durante la pupa es muy similar a cuando nacen, mientras que en el estado adulto prácticamente toda la microbiota es adquirida del medio ambiente después de emerger. Sin embargo, en los insectos hemimetábolos, los microbios que se adquieren después de la eclosión se pueden mantener durante toda la vida (Hammer & Moran, 2019).

1.1.2. Microorganismos en ambientes industriales

Existen multitud de entornos industriales en los que las comunidades microbianas son de elevado interés. La aplicación de los microorganismos en diversos procesos y sistemas ha mejorado los métodos de producción de materias primas, bienes de consumo o la gestión de residuos. Entre los productos que se pueden obtener gracias al uso de los microorganismos en la industria encontramos aditivos alimentarios, bebidas, productos fermentados, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, biocombustibles, biofertilizantes, metabolitos, antibióticos o vacunas.

Uno de los procesos biotecnológicos en los que están implicados los microorganismos es en la producción de biocombustibles. El consumo global de energía continuado ha provocado una demanda energética a la cual no podrá hacerse frente a corto plazo. Esto unido al agotamiento de combustibles fósiles, crea la necesidad de buscar alternativas renovables y sostenibles (Adegboye et al., 2021). Una viable alternativa es el uso de la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de biocombustibles (Ashokkumar et al., 2022). Los microbios juegan un papel primordial en el pretratamiento de dicha materia prima, ya que las enzimas que producen permiten transformar la materia prima en un hidrolizado compuesto por una mezcla de azúcares y otros productos como ácidos orgánicos o compuestos fenólicos (Kumar et al., 2009). Se pueden destacar cepas de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* (Dien et al., 2003).

Otro proceso importante donde participan los microorganismos es en la biorremediación. La biorremediación se basa en la degradación, erradicación, inmovilización o desintoxicación de compuestos peligrosos en el medio ambiente (suelos, sedimentos, sustancias o agua subterránea) a través de la acción de los microorganismos, transformándolos en formas menos tóxicas (Sharma, 2020). El uso de microorganismos en biorremediación tiene múltiples ventajas ya que estos son nutricionalmente y metabólicamente flexibles, pueden adaptarse a condiciones ambientales extremas, y producen enzimas que les permiten degradar los contaminantes complejos en carbono (Thakur et al., 2019). Los principales microorganismos que llevan a cabo la biodegradación son miembros activos de consorcios microbianos. Entre estos encontramos cepas de los géneros: *Acinetobacter*, *Actinobacter*, *Acaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillins*, *Berijerinckia*, *Flavobacterium*, *Methylosinus*, *Mycrobacterium*, *Mycococcus*, *Nitrosomonas*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pseudomonas*, *Rhizoctomia*, *Serratia*, *Trametes* y *Xantofactor* (Singh et al., 2014). Por sí solos son incapaces de degradar compuestos tóxicos siendo importante las interacciones entre diferentes especies de microbios biodegradadores. Por ejemplo, la decoloración microbiana de los colorantes azoicos es más eficaz en condiciones anaeróbicas, pero estas condiciones conducen a la formación de aminas aromáticas que son tóxicas para los humanos, requiriéndose por tanto una etapa aeróbica para su degradación completa. En estos casos el uso de cultivos bacterianos mixtos como, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Enterococcus sp.* han resultado de utilidad en la biodegradación y decoloración del tinte

(Kouzuma & Watanabe, 2014). Por otro lado, se ha visto que los microbios también pueden eliminar metales tóxicos presentes en ambientes contaminados. Este es el caso de las bacterias disimilatorias reductoras de metales que reducen la forma oxidada soluble del uranio, U(VI), a U(IV) insoluble, evitando que se propague a sitios no contaminados (N'Guessan et al., 2008). Aunque muchos de estos procesos aún no se han aplicado en la práctica a la restauración ambiental a gran escala, conocer las interacciones microbio-metal contribuirá a la búsqueda de nuevas estrategias de remediación.

Muchos microbios producen una amplia variedad de enzimas tanto extracelular como intracelularmente que poseen características que las hace atractivas para su comercialización. El uso de las enzimas no solo garantiza una utilización eficiente de materias primas, sino que, además, implica la no generación de residuos o que estos sean mínimos y sustituyen a los productos químicos tóxicos (Singh & Bajaj, 2016). Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de una reacción bioquímica específica (Gurung et al., 2013). Es tal la demanda de enzimas microbianas que entre los años 2012-2015 las ventas mundiales de enzimas industriales fueron creciendo desde \$1 mil millones hasta los \$3,74 mil millones (Liu & Kokare, 2017). Entre las enzimas industriales, aproximadamente el 50% son producidas por hongos y levaduras, y el 35% por bacterias (Liu & Kokare, 2017). Algunas de las ventajas de usar enzimas producidas por microorganismos son que estas son más activas y estables que las producidas por plantas. Además, tienen un alto rendimiento y son fáciles de modificar y optimizar debido a la diversidad bioquímica y la susceptibilidad a la manipulación génica (Gurung et al., 2013). Por último, gracias a la aplicación de técnicas más actuales, como la detección de metagenomas o la extracción de genomas, los microorganismos suponen una fuente de nuevas enzimas (Adrio & Demain, 2014). Entre las principales industrias donde el uso de enzimas es habitual encontramos la industria alimentaria (45%), detergentes (34%), textiles (11%), cuero (3%) y pulpa y papel (1.2%) (Singh, 2010). También se utilizan en el ámbito de la medicina. Por ejemplo, en la producción de antibióticos betalactámicos, como penicilinas y cefalosporinas (Volpato et al., 2010); o incluidos en ciertos medicamentos que se utilizan para reducir el colesterol en sangre (Ma et al., 2010).

Por último, destacamos la importancia de los microorganismos en la industria alimentaria. Los alimentos se han considerado uno de los impulsores ambientales que más influyen en la microbiota humana a lo largo de la vida de los individuos. Los microbios, y más en concreto, las bacterias de los alimentos, se han asociado a una multitud variable

de escenarios, ya sean positivos como negativos. Se ha observado que las comunidades bacterianas presentes en los alimentos pueden beneficiar la salud del hospedador, ayudar a mejorar la calidad del alimento (sobre todo en alimentos fermentados) o mejorar la conservación de los mismos prolongando su vida útil (Antunes et al., 2020). Sin embargo, también se han asociado a algunos efectos negativos como provocar cambios en el equilibrio de la comunidad microbiana del hospedador, transmitir enfermedades o deteriorar los alimentos (Antunes et al., 2020). Estos microorganismos patógenos normalmente proceden del propio alimento en crudo o pueden introducirse posteriormente a través de máquinas contaminadas, materiales de empaquetamiento o mala manipulación del alimento. En este sentido la formación de biopelículas es especialmente relevante por su persistencia en las instalaciones (Coughlan et al., 2016).

Son de especial relevancia los microorganismos implicados en la fermentación de alimentos, puesto que participan tanto directamente en la transformación y producción del alimento fermentado, como influyen en la microbiota y la salud de los consumidores. La fermentación de alimentos se considera una de las formas más antiguas de procesamiento y conservación (Achi, 2005). Entre los principales alimentos fermentados producidos por la actividad microbiana encontramos: bebidas alcohólicas tales como vino de arroz, de frutas y cerveza; productos lácteos como yogur, crema agria y queso; productos de soja como el tofu o el cardamomo; verduras fermentadas como kimchi y chucrut; condimentos como vinagre, salsa amarilla y salsa de soja; y edulcorantes como el glutamato monosódico (abreviado como MSG por sus siglas en inglés, Monosodium Glutamate) (Chen, 2021). En estos alimentos es donde más notablemente se puede observar los cambios intrínsecos provocados por los microorganismos (Yap et al., 2022). Por ello, estos microorganismos son de gran importancia para la industria alimentaria, con un gran impacto económico en este sector. Los microbios que se encuentran en los alimentos fermentados pueden provenir de las materias primas o de los entornos de producción, es decir su introducción es espontánea, o pueden ser posteriormente inoculados en forma de cultivos iniciadores (Yap et al., 2022). Estos cultivos iniciadores producen diversos compuestos como enzimas, compuestos volátiles y moléculas antimicrobianas como ácidos orgánicos, ácidos grasos o bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de patógenos y deterioradores de los alimentos (Reis et al., 2012).

Entre las principales bacterias asociadas con productos fermentados destacamos *Acetobacter* y *Glucanoacetobacter*. Ambas, son bacterias del ácido acético que oxidan

sustratos de carbono siendo muy utilizadas en la producción de café, cacao y vinagre (Schwan & Ramos, 2014). Para la fermentación industrial de la soja se han utilizado durante mucho tiempo *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* gracias a su velocidad de crecimiento acelerando el proceso de fermentación (Schallmeyer et al., 2004).

Por otra parte, las levaduras también juegan un papel importante en la producción de muchos alimentos fermentados. De hecho, su uso suele estar vinculado con los alimentos fermentados autóctonos, gracias a su capacidad de tolerar ambientes ácidos, de crecer a elevadas temperaturas y de estar presentes en muchos ambientes (Schwan & Ramos, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* es la cepa más utilizada debido a su implicación en la fermentación.

Por último, uno de los grupos bacterianos más importantes en productos fermentados es el de las bacterias del ácido láctico (BAL) (descritas posteriormente) (Hatti-Kaul et al., 2018). El papel que juegan estos microorganismos es múltiple:

- Son ampliamente utilizadas en la producción de una gran variabilidad de productos, principalmente lácteos (quesos y leches fermentadas), pero también en carnes, pescado, verduras, salsas, cereales y bebidas alcohólicas (Leroy & De Vuyst, 2004).
- Modifican la estructura, sabor y aroma de las materias primas, acelerando además el proceso de maduración (Hu et al., 2022).
- Influyen en el equilibrio de las poblaciones microbianas de los alimentos, ya que, gracias a su capacidad inhibitoria de microorganismos patógenos alimentarios, previenen el deterioro de los alimentos y conservan las cualidades higiénicas de los mismos alimentarios.
- Diversos géneros pertenecientes a las BAL como *Lactobacillus* o, *Pediococcus*, actúan como probióticos mejorando la salud humana. Su presencia en los alimentos, así como su consumo histórico contribuye a su aceptación natural como GRAS (de sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe) para el consumo humano (Londoño et al., 2015).

Por todo ello, el conocimiento en profundidad de estos microorganismos puede ser útil para su uso racional en la fabricación de alimentos fermentados, lo que puede ser decisivo para la generación de un producto final satisfactorio. A continuación, profundizaremos en la microbiología de los quesos, uno de los alimentos fermentados de mayor consumo mundial y, por tanto, de un gran impacto económico.

1.1.2.1. Microbiología de los quesos

Como se ha comentado con anterioridad, el proceso de fermentación es uno de los métodos más antiguos utilizados para conservar alimentos y para mejorar su valor nutricional. Uno de los productos fermentados más antiguos es el queso. Su fabricación se remonta a hace unos 8.000 años en el oeste de Asia (Sandine & Elliker, 1970). Actualmente, el consumo y la producción de queso están en aumento. En el año 2014 la producción mundial de queso alcanzó los 21 millones de toneladas métricas y se espera que crezca a un valor de mercado global de 106 mil millones de dólares estadounidenses para 2026 (Reuben et al., 2023). Actualmente, existe una gran variedad de quesos con diferentes texturas, sabores y formas. Solo en el año 2020 se produjeron 25.947.072 toneladas de queso en todo el mundo. Siendo Estados Unidos de América el mayor productor con 6.220.001 toneladas de queso, seguido de Alemania con 3.170.500 toneladas y Francia con 2.233.225 toneladas (Figura I.2A). Además, hasta el año 2020, la leche de vaca, ya sea entera o desnatada, ha sido la más utilizada para producir queso (Figura I.2B) (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2023).

El queso es una fuente rica en nutrientes esenciales, como proteínas, grasas, vitaminas y minerales. Además, sus componentes ejercen importantes beneficios para la salud (Walther et al., 2008). Por tanto, es normal que cada vez se estudie con más detalle los procesos microbianos que suceden durante la elaboración y maduración de los quesos. Estos estudios se han centrado principalmente en conocer los microorganismos que participan en la transformación de la leche durante la elaboración del queso. Pero también en conocer la seguridad de los mismos, ya que pueden contaminarse con microbios patógenos y provocar enfermedades o causar alteraciones de la leche y queso haciéndolos no aptos para su consumo.

La microbiota de los quesos es muy compleja y se caracteriza por la sucesión de diferentes microorganismos a lo largo de la elaboración del queso (Irlinger & Mounier, 2009).

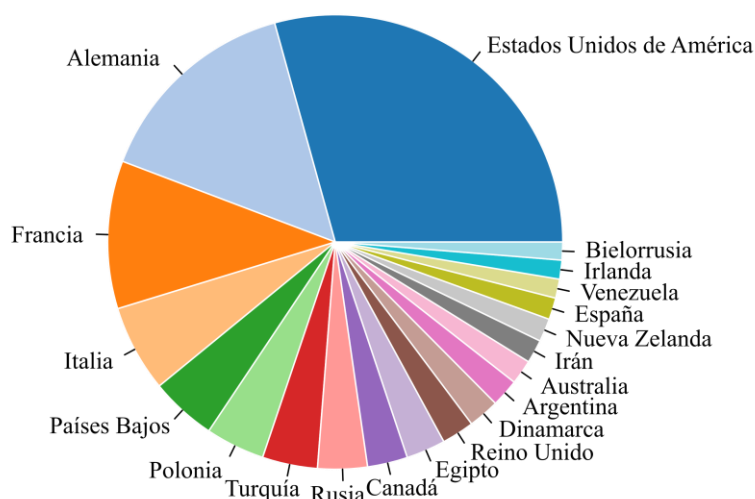
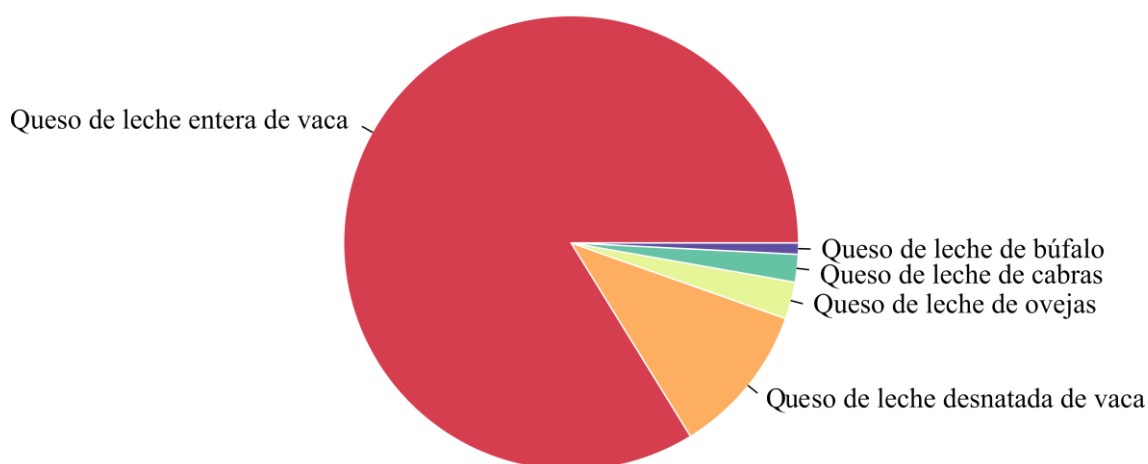
A**B**

Figura I.2. Principales países productores de queso a nivel mundial (A) y producción mundial de queso por tipo de leche (B).

Para elaborar queso es necesario cuajar la leche, nata o suero de leche de animales rumiantes; principalmente vaca, cabra y oveja o una mezcla de ellos. En general, a la leche se le añade cuajo (enzimas) junto con una cantidad controlada de bacterias, principalmente BAL, que acidifican el medio, permitiendo la coagulación de las proteínas de la leche. Durante la elaboración del queso, además de las proteínas de la leche, cambian sus azúcares; en concreto, la lactosa se descompone en ácido láctico gracias a la acción de las BAL (FAQ, 2015). Tras esto se elimina el suero y el producto restante se madurará durante un periodo variable según se desee (Figura I.3).

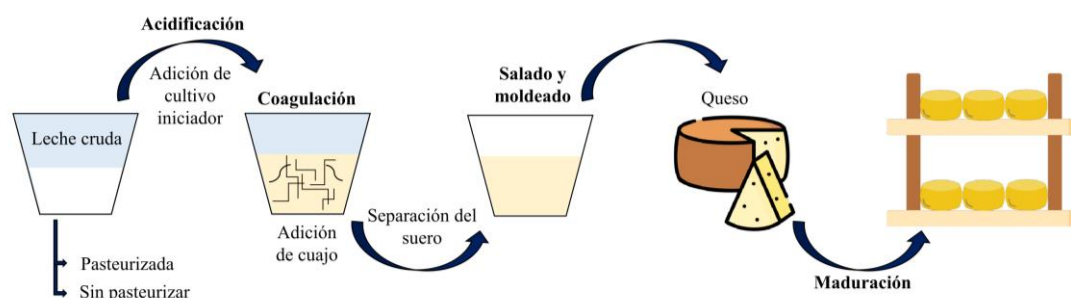


Figura I.3. Proceso de fabricación del queso. Adaptado de Nam et al., (2021).

Los principales microorganismos que aparecen en el queso se pueden dividir en dos grupos: cultivos iniciadores y cultivos secundarios.

Los cultivos iniciadores suele ser una mezcla de microorganismos en los que predominan las BAL, aunque también puede contener microorganismos no BAL. Estos cultivos participan principalmente en la producción de ácido láctico acidificando el medio permitiendo la coagulación de la leche (Kongo, 2013). La acidificación adecuada determina la fuerza del coágulo, la tasa de crecimiento microbiano, la solubilidad del fosfato cálcico etc; en definitiva, las propiedades reológicas del queso (Lucey et al., 2003). Aunque tradicionalmente se hacía uso de las BAL presentes de forma natural en la leche, ahora es común añadir intencionadamente cultivos iniciadores industriales a la leche. Generalmente son grupos ya definidos de bacterias que se han seleccionado específicamente para su uso en elaboración del queso. Estos cultivos iniciadores se seleccionan en función de la tasa de acidificación a una temperatura determinada, de su insensibilidad a los fagos, de su facilidad de manejo y de su estabilidad (Høier et al., 2010).

Estos cultivos iniciadores también pueden contribuir a la maduración gracias a la producción de enzimas y metabolitos que degradan proteína, lípidos y aminoácidos contribuyendo al sabor del producto final (McSweeney, 2007). Además, gracias a la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno por parte de estos cultivos iniciadores, se inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos obteniéndose productos microbiológicamente seguros. (Parente et al., 2017). Entre las cepas BAL empleadas como cultivos iniciadores encontramos *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, dentro de cultivos mesófilos (aquellos cuya temperatura óptima esta

entre 30-37°C); y *Streptococcus thermophilus* y algunas especies de *Lactobacillus* como *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus helveticus* en el caso de cepas termófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 40-45°C) (Coelho et al., 2022). Actualmente, a pesar de que a *Enterococcus* no se le otorga la calificación de GRAS, se siguen utilizando algunos debido a sus propiedades beneficiosas (Ben Braïek & Smaoui, 2019).

Los cultivos iniciadores están compuestos por diferentes especies o por diferentes cepas de una misma especie. Por tanto, se pueden dividir en cultivo definidos y no definidos en función del conocimiento que se tenga sobre su composición (Høier et al., 2010). A su vez se pueden subdividir en (1) cultivos definidos formados por múltiples cepas (por ejemplo, *Lactococcus. lactis subsp. lactis* y *Lc. lactis subsp. cremoris*, típico del queso Camembert) (2) cultivos definidos compuestos por una sola cepa (como *S. thermophilus* en el queso Mozzarella); (3) cultivos mixtos definidos (*S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Propionibacterium shermanii* en el queso Emmental); y (4) cultivos mixtos no definidos (como se da en el queso italiano Parmigiano Reggiano) (Gatti et al., 2014; Høier et al., 2010).

Además de BAL iniciadoras, en los quesos se pueden encontrar BAL no iniciadoras, llamada NSLAB según sus siglas en inglés (non starter lactic acid bacteria). Estos cultivos normalmente se desarrollan espontáneamente en los quesos o por contaminación de los materiales usados o del ambiente, pero en algunos casos pueden adicionarse con el fin de acelerar el proceso de maduración y producir el sabor deseado en forma de cultivos secundarios (Gobbetti et al., 2015). Dichos cultivos se seleccionan para sobrevivir a las temperaturas de cocción de la cuajada de queso y participar en el desarrollo del sabor en una etapa posterior de la maduración del queso. Esta microbiota está compuesta principalmente por lactobacilos mesófilos heterofermentadores facultativos y obligados como *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Levilactobacillus brevis* (Beresford et al., 2001). Aunque también encontramos especies de los géneros *Enterococcus* (como *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), *Pediococcus* (como *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*) y *Leuconostoc* (como *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*) (Beresford et al., 2001).

Con respecto a los cultivos iniciadores secundarios su principal función es participar en el aroma, color y textura de los quesos (Irlinger et al., 2017). Estos están compuestos por diferentes especies de mohos, levaduras y bacterias, destacando *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium sp.* y lactobacilos heterofermentadores. Excepto *Propionibacterium* y los lactobacilos, el resto de cultivos secundarios crecen principalmente en la corteza.

Entre otros microorganismos presentes en los quesos encontramos las bacterias corineformes, generalmente situadas en la superficie de quesos de untar. Entre estos destacamos *Brevibacterium*, seguido de *Arthrobacter*, *Agrococcus*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium*, y *Microbacterium spp* (Cogan, 2011). Estos microorganismos son responsables del color rojo o naranja. En la superficie de quesos duros, semiduros y blandos también se encuentran especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus* cuya principal función se cree que es la producción de proteinasas y lipasas (Beresford et al., 2001).

Las bacterias del ácido propiónico (BAP) son muy típicas en quesos suizos del tipo Emmental. Participan principalmente en el metabolismo del lactato producido por las BAL iniciadoras en propionato, acetato y CO₂. Este último es el responsable de los típicos agujeros, llamados ojos, de estos quesos. *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. thoenii*, *Prop. jensenii* y *Prop. acidipropionici* son las especies más importantes de BAP. Aunque tradicionalmente las cepas de BAP surgían de forma natural, actualmente se adicionan deliberadamente a la leche (Cogan, 2011).

Por último, otro gran grupo presente en los quesos son las levaduras y los mohos. A pesar de que no se tiene clara su función y que se consideran contaminantes adventicios, en algunos casos se adicionan deliberadamente después de la salmuera. Se sitúan en superficie de quesos curados con moho, como el queso azul o el Camembert. Destacan *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. (Bintsis, 2021).

Todos estos grupos de microorganismos no están presentes a la vez en el queso, si no que se van sucediendo los unos a los otros a lo largo del proceso de producción del mismo. En el queso que proviene de leche pasteurizada, la principal microbiota que se encuentra tras el tratamiento son cepas de bacterias termodúricas y esporas. Destacando los géneros de BAL *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Richter & Vedamuthu, 2001). Posteriormente es normal adicionarle un cultivo iniciador, compuesto por BAL

principalmente, que suelen alcanzar valores máximos al segundo día de fermentación (Crow et al., 1995). Los cultivos iniciadores son fundamentales en las primeras horas de elaboración del queso, pero al comenzar la maduración, el número de BAL disminuye drásticamente debido al gasto de lactosa y a su propio comportamiento autolítico (Gatti et al., 2014). Aunque los iniciadores también están presentes durante el proceso de maduración, gracias a la producción enzimática que interviene en la proteólisis y la conversión de aminoácidos en compuestos de sabor. Por el contrario, las NSLAB no crecen adecuadamente en la leche, por lo que se encuentran en bajas densidades al principio de la producción del queso, no contribuyendo a la producción de ácido láctico durante la fabricación (Beresford et al., 2001). Al llegar a la maduración estas proliferan rápidamente utilizando como fuente de energía la lactosa residual o el D-lactato proveniente de la isomerización del L-lactato producido por las BAL (McSweeney et al., 2017). Las NSLAB intervienen en la textura, acidez y sabor del queso al fermentar la lactosa y convertir las proteínas de la leche, el citrato y los lípidos en compuestos aromáticos volátiles (Broadbent & Steele, 2005). Este lactato también es utilizado por las BAP, creciendo en número estas y generando los típicos ojos del queso Emmental. Así como es especialmente relevante en la maduración de quesos con moho en la superficie como el Camembert o el Brie. Especies como *Geotrichum candidum* o *Penicillium camemberti* aumentan su número durante la maduración gracias al metabolismo del lactato mediante oxidación a CO₂ y O₂, desacidificando la superficie del queso, generándose un gradiente de pH del centro hacia fuera. Conforme aumenta el pH de la superficie del queso, el fosfato de calcio precipita como una capa de Ca₃(PO₄)₂, generándose también un gradiente de fosfato de calcio del centro a la superficie y migrando este hacia la superficie. La reducción en la concentración de fosfato de calcio, junto con la disminución del pH provoca un ablandamiento del interior característico del queso Camembert (McSweeney & Fox, 2004). La desacidificación de la superficie de los quesos permite que otras cepas menos tolerantes al ácido prosperen y colonicen el queso como *Arthobacter arilaitensis* o *Corynebacterium casei* (Licitra et al., 2007).

En este ambiente con tipos tan diferentes de microorganismos, que se van sucediendo, se producen multitud de interacciones entre ellos, ya sea beneficiosas, neutras o perjudiciales. Entre las interacciones negativas, como la competición, se ha encontrado que ciertas cepas de *Arthobacter*, *Corynebacterium* y levaduras producen sideróforos que les ayuda a absorber oligoelementos limitantes como el hierro o el zinc, mientras que

otros microorganismos como *Brevibacterium* y *Microbacterium* han desarrollado mecanismos para “robar” los sideroforos a los productores (Noordman et al., 2006).

Por otra parte, la producción del ácido láctico, acético y ciertas sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas, por parte de las BAL inhibe el crecimiento de microorganismos susceptibles o patógenos (Arqués et al., 2015; Silva et al., 2018). Ciertas cepas productoras de bacteriocinas se utilizan como “cultivos protectores” fundamentales en la inhibición de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* o *Clostridium sp.* y otros microbios indeseables (Bassi et al., 2020). Estas bacteriocinas también podrían tener un efecto subinhibitorio ayudando a la sucesión de microbios en la fermentación de la leche (Herve-Jimenez et al., 2009). La actividad antimicrobiana que se produce en el queso se ha asociado con un consorcio de microorganismos, por ejemplo, ciertos consorcios microbianos de la corteza de quesos madurados de untar tienen un importante efecto antilisteria (Bleicher et al., 2010). Además de compuestos antibacterianos, algunas BAL producen compuestos antifúngicos como ácidos orgánicos, ácidos grasos, ciclopéptidos o diacetilo que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Leyva Salas et al., 2019). Pero, no solo las BAL producen dichos compuestos, si no que otros microbios como levaduras, inhiben el crecimiento de otras levaduras.

Por otro lado, entre las interacciones neutras, se ha observado que la presencia de las BAL en la leche permite el crecimiento de cepas no proteolíticas gracias a la producción de proteinasas, sin suponer ningún beneficio ni perjudicar a las BAL (Senaka Ranadheera et al., 2012). En quesos con presencia de BAP, como se ha comentado con anterioridad, estas se aprovechan del lactato producido por las BAL para llevar a cabo su metabolismo, pero se ha encontrado que otros componentes como aminoácidos y péptidos que son liberados por los sistemas proteolíticos de las BAL favorecen el crecimiento de las BAP. De manera similar, el crecimiento de ciertas bacterias se ve favorecido por la presencia de levaduras, sin beneficio aparente para estas últimas (Álvarez-Martín et al., 2008). Por ejemplo, durante los primeros días de maduración, las levaduras y/o mohos colonizan las superficies del queso y utilizan el lactato (Callon et al., 2006).

Entre las interacciones beneficiosas encontramos la cooperación entre diversas especies de BAL, como la que se produce entre *Lc. lactis* y *L. casei* durante la proteólisis de las proteínas de la leche en el proceso de maduración (Desfossés-Foucault et al., 2014). También existe cooperación entre diferentes especies de BAL y levaduras. Se ha visto

que las levaduras proporcionan vitaminas o fuentes de carbono y nitrógeno a las BAL (De Freitas et al., 2009), mientras que estas últimas producen ácido láctico que puede ser utilizado por levaduras que no usan la lactosa como fuente de energía. En el estudio de Dugat-Bony et al., (2015) se realizó un análisis de las interacciones que se producían en la corteza de un modelo de queso con una microbiota sintética compuesta por *Lc. lactis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Glutamicibacter arilaitensis*, *Corynebacterium casei*, *Hafnia alvei* y *Staphylococcus equorum*, junto con ciertas especies de levaduras como son *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* y *Kluyveromyces lactis*. Los resultados que obtuvieron pusieron de manifiesto el desarrollo sucesivo y la cooperación metabólica de diferentes grupos microbianos. Durante los primeros días de maduración del queso *Lc. lactis* y la levadura *K. lactis* fermentaron rápidamente la lactosa. Esta fermentación proporcionó el lactato necesario para el crecimiento de las especies de levadura *D. hansenii* y *G. candidum* que sustituyeron a las anteriores. Al consumirse el lactato se desacidifica el medio desarrollándose las cinco bacterias sensibles a los ácidos.

Como se ha visto, la composición fisicoquímica heterogénea que caracteriza al queso ofrece la posibilidad de desarrollarse comunidades microbianas multiespecies interactuantes y la ocupación a la vez de múltiples nichos por cepas "especializadas", utilizando diferentes sustratos (Siewewerts et al., 2008). La complejidad de las comunidades aquí presentes es muy reducida en comparación a otros hábitats microbianos como puede ser el cuerpo humano (Gill et al., 2006), lo que facilita su manejo y estudio. Estas comunidades son fácilmente cultivables y manipulables en el laboratorio, permitiendo la recreación de la formación de las mismas en el laboratorio y el estudio de la dinámica temporal que se produce durante la formación de la comunidad (Wolfe et al., 2014). Además, la manejabilidad del sistema hace que pueda ser útil para comparar con otros sistemas menos manejables donde coexisten especies similares de bacterias y hongos. Adicionalmente, se pueden obtener gran cantidad de réplicas recopilando grandes conjuntos de datos y permitiendo análisis más exhaustivos (Wolfe & Dutton, 2013). Todo esto hace del queso un ecosistema microbiano modelo que permite unir estudios *in situ* e *in vitro* para comprender mejor los patrones y los mecanismos subyacentes del ensamblaje, función y las interacciones de las comunidades microbianas.

1.2. Bacterias del Ácido Láctico

Las BAL constituyen un grupo polifilético variado de géneros bacterianos Gram positivos, de morfología cocoidea o bacilar, catalasa negativos, no formadores de esporas

y anaerobios-aerotolerantes, con bajo contenido en G+C, que originan ácido láctico como principal producto final de la fermentación de azúcares (Castellone et al., 2021). En función de los productos finales de la fermentación de carbohidratos las BAL se pueden agrupar en homofermentativas, si el único producto final de fermentación es el ácido láctico; y en heterofermentativas, si además de ácido láctico producen etanol, acetato y CO₂ (Raj et al., 2022).

Actualmente, las BAL están clasificadas dentro del filo *Bacillota*, en la clase *Bacilli* y del orden de los *Latobacillales* (Mokoena, 2017). La morfología celular, el tipo de fermentación de la glucosa, la temperatura de crecimiento y la utilización de carbohidratos son criterios que se utilizan para clasificar los diferentes géneros de BAL (Quinto et al., 2014). Entre los géneros que componen este grupo encontramos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Khalid, 2011).

Son uno de los grupos más extendido en la naturaleza, debido a su capacidad para crecer en diversos sustratos y bajo diversas condiciones (Mokoena, 2017). Estas se pueden encontrar desde en plantas a alimentos fermentados, así como en superficies mucosas de humanos y animales. En el cuerpo humano, las BAL forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal y genitourinario (Panagiota Florou-Paneri, 2013). Destaca su presencia en alimentos, especialmente en alimentos fermentados. Debido a su prolongado consumo por la humanidad, y las escasas asociaciones a infecciones, como se comentó con anterioridad las BAL han sido catalogadas como microorganismos GRAS (Londoño et al., 2015). De hecho, es en estos alimentos fermentados donde se han venido utilizando durante décadas como cultivos iniciadores, siendo su aplicación principal, la elaboración de diversas variedades de quesos y leches fermentadas. Como se ha comentado anteriormente, estos microorganismos cumplen importantes y diversas funciones en los alimentos fermentados como pueden ser el desarrollo de propiedades organolépticas, conservar las cualidades nutritivas de los mismo e incrementar la vida útil gracias a la inhibición de patógenos. Esta inhibición principalmente es debida a la competencia por los nutrientes entre los distintos microorganismos, así como debido a la producción de sustancias inhibitoras por parte de las BAL como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno o las bacteriocinas (Wang et al., 2021).

Si por algo destacan las BAL es por su papel en la industria biotecnológica. Además de su papel en la producción de alimentos fermentados, más recientemente las BAL están despertando interés como hospedadores alternativos a *E. coli* y *S. cerevisiae*, en la producción de plásticos, nailon, combustibles o ingredientes farmacéuticos, alimentarios y cosméticos (Börner et al., 2019). Por otra parte, al formar parte de la microbiota de las plantas, presentan un gran potencial como biofertilizantes, agentes de biocontrol y bioestimulantes (Lamont et al., 2017). Además, muchas BAL producen compuestos antimicrobianos que se postulan como posibles alternativas a antibióticos gracias a su alta especificidad y potencia *in vivo*. Quizás unas de las aplicaciones más novedosas de las BAL es su utilización en el ámbito médico, concretamente como agentes vehiculares de fármacos, así como su uso en las vacunas (Szatraj et al., 2017). Por último, ciertas BAL no patógenas, principalmente *Lactobacilos* y *Pediocococos*, así como algunas cepas de Bifidobacterias, son empleadas como probióticos (Tabla I.1) gracias a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas, así como de conferir beneficios nutricionales y de salud al hospedador (Zielińska & Kolożyn-Krajewska, 2018). Algunas especies de *Enterococcus* y *Streptococcus* también tiene potencial como probióticos (Burton et al., 2017; Franz et al., 2011). Para que un microorganismo pueda ser utilizado como probiótico debe cumplir una serie de características como poseer la capacidad de adherirse al epitelio y colonizar el tracto gastrointestinal, estabilizar la microbiota intestinal ya presente, inhibir la acción de microorganismos patógenos, producir sustancias antimicrobianas y estimular la respuesta inmune (Panagiota Florou-Paneri, 2013). Al llegar los microorganismos probióticos al tracto gastrointestinal pueden interactuar con los aquí presentes, principalmente estabilizando la comunidad bacteriana y restaurando la microbiota intestinal original (Zhao et al., 2021). Entre estas interacciones encontramos la competencia con patógenos por conseguir nutrientes o adherirse al epitelio. Algunos microorganismos probióticos como *Lactobacilos* o Bifidobacterias, pueden modificar el entorno, produciendo ácidos orgánicos que bajen el pH intestinal, inhibiendo de esta forma el crecimiento de microorganismos patógenos (Dobson et al., 2012). Otros regulan la expresión de genes relacionados con la secreción de moco intestinal, mejorando la función barrera y excluyendo a los patógenos (Sanders et al., 2019). Otro mecanismo de probiosis propuesto es la producción de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos patógenos (O'Shea et al., 2012).

Tabla I.1. BAL utilizadas comúnmente como probióticos. Adaptado de Raj et al, (2022)

BAL		Alimento Fermentado	Efecto inmune
<i>Lactobacillus</i>		Arroz glutinoso fermentado (tapai pulut), tapioca (tapai ubi), dosa, kimchi y natto, chucrut y vinagre	Anticancerígeno, antiestreñimiento y refuerzo del sistema inmunológico Antioxidante, antimicrobiano, antihipertensivo, antidiabético y antiobesidad
<i>L.alimentarius,</i> <i>L. pentosus</i> <i>Lpb. plantarum</i> <i>L.versmoldensis</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P.pentosaceus</i>	Carnes fermentadas como Basterma, nem chua (carne magra de cerdo), belacan o kapi (pasta de gambas, budu (salsa de pescado)	Aumento de la vida útil de la carne y sabor de los productos cárnicos.
<i>Lb. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>Lpb. plantarum</i> <i>Lb. helveticus</i>	Leche cultivada, yogur, queso, fermentación de la lactosa.	Mejora la inmunidad contra los patógenos y sirve como antioxidante. Mejorar la actividad la actividad antiinflamatoria, antihemolítica y antioxidante
<i>Lpb. plantarum</i>		Leche fermentada	Actividad antioxidante, inmunomoduladora y antimicrobiana
<i>P. pentosaceus</i> <i>L. casei</i> DK128	<i>Lpb.plantarum</i> DK119	Repollo fermentado coreano (Kimchi)	Reduce la actividad del norovirus murino responsable de la gastroenteritis
<i>E. faecium</i> L3		Productos lácteos fermentados	Reduce la infección causada por el virus de la influenza (H3N3, H1N1)

La capacidad de los probióticos de provocar cambios en la microbiota intestinal se ha puesto de manifiesto en diversos estudios. Cox et al., (2010) analizaron la microbiota fecal de bebés de 6 meses que fueron tratados con suplementos de *L. rhamnosus* diariamente. Los resultados que obtuvieron pusieron de manifiesto una mayor abundancia de *L. rhamnosus* y mayor uniformidad en la microbiota fecal de los bebés, lo que apunta a que ayuden a la estabilidad ecológica de la microbiota. Preidis et al., (2012) observaron un aumento transitorio en la uniformidad y diversidad del microbioma intestinal de ratones tratados con *Limosilactobacillus reuteri* en comparación a los no tratados. La pérdida de diversidad está asociada con una disminución en la resiliencia ecológica, llegándose a asociar a enfermedades del tubo digestivo o afecciones cutáneas

(Forno et al., 2008; Manichanh et al., 2006). Los probióticos pueden inducir cambios en la microbiota intestinal y estabilizar las comunidades microbianas. Sin embargo, se necesitan más estudios en humanos para evaluar hasta qué punto los probióticos influyen el microbioma intestinal humano y si los cambios están asociados con beneficios clínicos en el hospedador. Gracias al uso de los probióticos se han podido tratar múltiples enfermedades, principalmente intestinales, aunque en el futuro se espera que ayuden en el tratamiento de enfermedades orales o respiratorias (Mortaz et al., 2013; Zhang et al., 2022a).

1.3. Género *Enterococcus*

Entre los microorganismos que con más frecuencia se aíslan de derivados lácteos, destaca el género *Enterococcus*, debido a la importancia que han adquirido sus bacteriocinas (enterocinas) en la última década. Estas bacterias juegan un papel fundamental en la elaboración de quesos, especialmente en la maduración, ya que contribuyen al gusto y aroma típico de los mismos gracias a procesos metabólicos como proteólisis, lipólisis y degradación del citrato (Foulquié Moreno et al., 2006). Además, muchas de las cepas de enterococos productoras de enterocinas presentan actividad frente a patógenos alimentarios como *Listeria sp.* y *Clostridium sp.*, incluso se han descrito casos de actividad antiviral frente a algunos virus, como es el caso de enterocina CRL 35 (Wachsman et al., 2003).

Los enterococos son un género de BAL que se caracterizan por ser anaerobios aerotolerantes, catalasa negativos y no formadores de endosporas (Teixeira et al., 2015). Pueden crecer a temperatura de entre 10 y 45°C, siendo la óptima entre 35 y 37 °C, para la mayoría de especies, así como en un amplio rango de pH siendo el óptimo de 7,5-8,5. También toleran y crecen en ambientes con salinidad de hasta 6,5% NaCl y 40% de ácidos biliares (Fisher & Phillips, 2009; Van Tyne & Gilmore, 2014). Además, se caracterizan por catabolizar gran variedad de fuentes de energía como carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y muchos cetoácidos (Stuart et al., 2006).

No fue hasta finales del siglo XIX cuando los enterococos se reconocieron como género independiente de los estreptococos. Esta separación fue posible, en 1984, gracias a los análisis de ARN 16S, así como a estudios de hibridación de RNA-DNA y DNA-DNA que revelaron que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* (clasificados

como estreptococos hasta ese momento) estaban muy separados de estreptococos no enterococos como *Streptococcus bovis* (Ogier & Serror, 2008).

Al contrario que otras BAL, los enterococos no están reconocidos como GRAS, de hecho, se utilizan como indicador fecal en el análisis de aguas contaminadas (Ogier & Serror, 2008). Sin embargo, diferentes especies del género *Enterococcus*, como *Enterococcus faecium* SF68 y *E. faecalis* Symbioflor 1, se están comercializando como probióticos, pudiendo llegar a ser idóneos sustitutos a los antibióticos (Torres-Henderson et al., 2017). En humanos se ha probado *E. faecium* SF68 para el tratamiento de diarrea y para el síndrome del intestino irritable, mejorando ambas patologías, ya sea reduciendo la duración como disminuyendo los síntomas; por su parte *E. faecalis* Symbioflor 1 interviene regulando y estimulando el sistema inmune permitiendo combatir sinusitis crónica o bronquitis recurrente (Franz et al., 2011).

Con respecto a la identificación de enterococos, se han aplicado durante años diversos métodos que permitan identificarlos adecuadamente. Entre estos métodos encontramos el análisis de plásmidos y enzimas de restricción (Restriction Enzyme Accessibility o REA) del ADN, electroforesis enzimática multilocus (del inglés Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE), el análisis de endonucleasas de restricción utilizando electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) según sus siglas en inglés (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), electroforesis en gel de campo invertido (FIGE, Field-Inversion Gel Electrophoresis) y electroforesis homogénea de campo eléctrico con abrazadera de contorno (CHEF, Clamped Homogeneous Electric Fields) (Teixeira & Merquior, 2013). Aun así, es complicado identificar y diferenciar entre especies de enterococos debido a la alta variabilidad fenotípica existente. Se están probando, de igual forma, diversos métodos que permitan diferenciar entre enterococos con diferente origen, entre los más recientes está el análisis Multilocus de Secuencias (MLSA) según sus siglas en inglés (Multilocus sequence analysis) basado en análisis de las secuencias parciales de una serie de genes conservados (De las Rivas et al., 2007).

Actualmente se han podido identificar hasta 50 especies de enterococos ampliamente distribuidos en la naturaleza (Van Tyne & Gilmore, 2014). Aunque normalmente forman parte de la microbiología del tracto gastrointestinal de vertebrados, también se han podido aislar de productos lácteos, intestino de insectos, comida fermentada, plantas, suelo y agua (Ogier & Serror, 2008).

Es común encontrar enterococos formando parte de la microbiota normal de los mamíferos, específicamente en el tracto gastrointestinal. Es aquí donde se ha visto que ciertas especies de enterococos, como *E. faecalis*, cumple funciones clave relacionadas con el sistema inmune tales como el mantenimiento de la homeostasis de la inmunidad local o la ayuda en el establecimiento de la inmunidad de las mucosas (Kao & Kline, 2019). Este efecto local en la inmunidad producido por *E. faecalis* se ha observado que también puede tener efectos sistémicos, por ejemplo, reduciendo la respuesta alérgica en diferentes partes del cuerpo o induciendo la producción de IgA (Rautava et al., 2006). Sin embargo, como muchas bacterias, *E. faecalis* ha desarrollado estrategias para evadir la vigilancia inmunológica y la muerte, lo que permite que pueda pasar de ser comensal a convertirse en patógeno; estando implicado en múltiples enfermedades principalmente en infecciones del tracto urinario, bacteremia y endocarditis, y rara vez causan infecciones intraabdominales y meningitis (Dubin & Pamer, 2014).

1.3.1. Ecología de los enterococos

Los enterococos son bacterias ubicuas que se pueden encontrar en la microbiota intestinal de humanos y animales vertebrados e invertebrados, así como en productos provenientes de animales, en ambientes contaminados por materia fecal, plantas, suelo, o aguas (Ogier & Serror, 2008). Es en estos ambientes donde están sometidos a múltiples factores bióticos y abióticos estresantes que pueden conducir a una reducción de su población.

- **Enterococos en animales**

El cuerpo humano, especialmente el tracto gastrointestinal, está colonizado por multitud de microorganismos. Entre estos microorganismos los enterococos se localizan principalmente en el intestino delgado y grueso, aunque constituyen una población minoritaria (hasta el 1%). De todos ellos destacan *E. faecalis* y *E. faecium* como los predominantes, aunque también se han detectado ocasionalmente en heces *E. durans*, *Enterococcus avium* y *Enterococcus caccae* (Lebreton et al., 2014). En concreto *E. faecalis* presenta una abundancia ligeramente superior a *E. faecium* (Dubin & Pamer, 2014), aunque en algunos casos *E. faecium* se ha encontrado como cepa mayoritaria (Layton et al., 2010). En el caso del tracto gastrointestinal de otros mamíferos, podemos encontrar diferencias en las especies encontradas según el animal. En caballos las especies predominantes son *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*,

Enterococcus casseliflavus, y *Enterococcus mundtii*, siendo variable la proporción que se puede encontrar de cada una de las especies según el estudio llevado a cabo (Lebreton et al., 2014). En mascotas, tales como perros y gatos, se encuentran las especies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium* y *E. hirae* principalmente (Layton et al., 2010). De Graef et al., (2003) propusieron una nueva cepa de enterococo, *Enterococcus canis* sp. nov., asociada a perros, que mostraba una alta similitud en la secuencia de ADNr 16S (98,4% a 99%) con miembros del grupo de especies de *E. faecium*, mientras que el nivel de reasociación de ADN-ADN con estas especies era muy bajo (7-13%). Así como Naser et al., (2005) propusieron *Enterococcus canintestini* LMG 13590T como otra cepa asociada a la microbiota intestinal de perros, que presentaba una alta similitud en la secuencia de ADNr 16S (98–99%) con *E. dispar*, *E. canis* y *E. asini*. En lechones se han encontrado las especies *E. faecium*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. durans* y *Enterococcus cecorum*. Presentándose una distribución similar en la microbiota de los jabalíes (Aarestrup et al., 2002; Silva et al., 2012). En bovinos se ha descrito una colonización enterocócica dependiente de la edad, comenzando con una microbiota dominada por *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. avium*, sustituyéndose progresivamente con la edad por *E. cecorum* (Lebreton et al., 2014).

Al igual que en bovinos, en pollos se ha visto una sucesión de colonización de enterococos dependiendo de la edad. En un principio están colonizados por *E. faecalis*, que posteriormente es desplazada por *E. faecium*. El uso continuado de tilosina (promotor del crecimiento) ha provocado que *E. faecium* sea resistente a ella y por tanto se ha promovido la colonización el intestino de los pollos por parte de esta especie (Kaukas et al., 1987). En los pollos maduros se ha observado mayor proporción de *E. cecorum*, no encontrándose *E. avium* y *E. gallinarum* a pesar de que desde su descubrimiento se habían asociado a los pollos (Lebreton et al., 2014). En otras aves silvestres también se encontraron *E. faecium* como la especie predominante, pudiendo aislarse adicionalmente *E. durans* y *E. gallinarum* (Silva et al., 2011).

Escarabajos, moscas, abejas o termitas están colonizados por enterococos igualmente. Entre los enterococos encontrados en estos insectos predominan *E. faecalis* y *E. faecium*, pero también se han aislado otras especies con menor prevalencia como *E. casseliflavus*, *E. gallinaraum* y *E. durans* (Cox & Gilmore, 2007). *E. termitis* y *E. rotai*, presentes en termitas y mosquitos respectivamente, han sido algunas de las últimas cepas identificadas (Sedláček et al., 2013; Švec et al., 2006).

- **Enterococos en el medio ambiente**

Además de asociado a hospedadores, se han encontrado multitud de enterococos en hábitats extraintestinales muy diversos, aunque no está claro hasta qué punto estos enterococos provienen de fuentes animales por contaminación fecal. Una vez los enterococos se encuentran en estos hábitats naturales, su crecimiento y desarrollo depende del nicho y de los factores estresantes (como la luz, salinidad, nutrientes o depredación) a los que se vean expuestos (Staley et al., 2014). Los hábitats más comunes donde se aíslan enterococos son suelo, sedimentos, plantas y aguas.

Se han encontrado enterococos en prácticamente todos los tipos de suelo, sedimentos marinos y de agua dulce y en la arena, encontrándose más estudios de suelos templados y tropicales (Byappanahalli et al., 2012a; Fujioka & Byappanahalli, 2001; Ran et al., 2013). Probablemente los enterococos presentes en el suelo derivan de contaminación por desechos humanos y animales y, con el tiempo, una parte de la población original se podría haber adaptado a este medio. De hecho, los enterococos derivados de contaminación han demostrado resistir largo tiempo las condiciones que se encuentran en el suelo, pudiendo verse afectados por la humedad o materia orgánica de los mismos o así como por la competencia por los nutrientes con otros microorganismos (Byappanahalli & Fujioka, 2004). Siendo los enterococos de sedimentos y estuarios los que presentan supervivencias más prolongadas (Anderson et al., 2005). Entre las especies más frecuentes encontradas en suelos de climas templados son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. durans* y *E. avium* variando la proporción de las mismas dependiendo de la muestra (Ran et al., 2013), siendo *E. faecalis* el que se encontró en mayor proporción.

En el caso de los enterococos en sedimentos se ha observado que una perturbación de este medio provoca un aumento de concentración de enterococos en el agua sugiriendo que los microorganismos se adsorben a partículas de sedimento y posteriormente pueden ser resuspendidos en el agua (Staley et al., 2014). Además, las concentraciones de enterococos aquí presentes han demostrado variar en función de la descarga proveniente de diferentes fuentes como tratamientos de aguas residuales, arroyos y aguas pluviales (Ferguson et al., 2005). Los enterococos más comunes encontrados en sedimentos marinos son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* y *E. mundtii* (Ferguson et al., 2005) y en menor medida *E. gallinarum*, *E. durans* y *E. avium*. Por último, aquellos enterococos encontrados en arenas de playas, tales como *E. faecium*, *E. casseliflavus* o *E.*

durans entre muchas otras no identificadas, aun no se tiene claro si son residentes naturales o transitorios, aunque se han encontrado enterococos formando biopelículas, sugiriendo que algunas de las poblaciones sí podrían ser residentes en la arena (Piggot et al., 2012).

Los enterococos presentes en aguas dulces se han utilizado durante mucho tiempo como indicadores de contaminación fecal, sin embargo, la vegetación o los sedimentos contribuyen a la presencia de enterococos en el agua (Staley et al., 2012). Entre los enterococos más aislados en ríos y lagos encontramos *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. mundtii* (Badgley, Nayak, et al., 2010). El estudio llevado a cabo por Ahmed y Katouli (2008) reveló que el 95% de los enterococos coincidían con una librería de aislamientos de fuentes animales, apuntando que la mayoría de la población es de origen fecal. Sin embargo, en otros casos se ha encontrado *E. casseliflavus* como mayor representante de los enterococos (96,5%) sugiriendo que existen poblaciones potencialmente naturalizadas que estructuran la población de enterococos en la columna de agua (Badgley, Thomas, et al., 2010). En el caso de las poblaciones de enterococos en aguas marinas se ha observado que la concentración de los mismos varía en función del oleaje, del momento del día, de la marea y de la profundidad (Boehm et al., 2002). Entre las principales especies encontradas en aguas marinas encontramos *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. mundtii* (Badgley, Nayak, et al., 2010).

Otro hábitat donde se encuentran los enterococos es en las plantas, terrestres y acuáticas. Pero, al igual que como sucede en ambientes acuáticos, no se tiene claro el origen de las cepas aquí presentes ya que podrían provenir de contaminación fecal, transportadas por insectos y viento o ser autóctonas (Lebreton et al., 2014; Staley et al., 2014). Se han encontrado enterococos asociados a diversas formas de vegetación como algas, algas marinas, vegetación sumergida, plantas con flores y cultivos forrajeros, encontrándose el alga verde macrófita *Cladophora*, presente en aguas dulces y marinas, como una importante fuente de *E. coli* y enterococos. *E. casseliflavus* se ha encontrado como la especie dominante en vegetación acuática sumergida (Badgley, Thomas, et al., 2010) mientras que *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. sulfureus* y muchas otras cepas que se asemejan a *E. faecalis* en cultivos forrajeros (Müller et al., 2001; Ott et al., 2001).

1.3.2. Factores que afectan al crecimiento de enterococos en el ambiente

En estos ambientes extraentéricos, los enterococos están influenciados y limitados por factores abióticos y bióticos (Byappanahalli et al., 2012b). A pesar de esto, se ha visto que algunas poblaciones de enterococos han conseguido establecerse y naturalizarse, aunque suponen una minoría en estos ambientes. Entre los factores abióticos que limitan a los enterococos encontramos la luz solar, especialmente en ambientes marinos. La exposición a luz solar conlleva una fotoinactivación de las poblaciones de enterococos. Esta fotoinactivación puede ser directa, si componentes celulares como los ácidos nucleicos absorben fotones cambiando los enlaces químicos; o indirecta si son los sensibilizadores endógenos y exógenos los que absorben los fotones. Esta energía se transfiere posteriormente a los componentes celulares causando daño a la célula o reaccionan con el oxígeno formando especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species) que causan daño fotooxidativo (Sassoubre et al., 2014). Comparativamente, la fotoinactivación solar ha resultado ser más acusada en aguas marinas que en aguas dulces (Byappanahalli et al., 2012b). Aun así, el efecto de la luz solar sobre los enterococos depende de múltiples factores como la composición química, la turbidez, la temperatura o la profundidad del agua, además la concentración de enterococos puede variar a lo largo del día (Byappanahalli et al., 2012b).

Una de las características distintivas de los enterococos es su capacidad de crecer en ambientes salinos (hasta 6,5% de cloruro sódico) tolerando salinidades superiores que otros grupos bacterianos como los coliformes y *E. coli* y por tanto afianzándose como uno de los mejores indicadores de contaminación fecal en aguas recreativas. Aun así, diversos estudios han confirmado que la salinidad sí se correlaciona negativamente con el crecimiento de enterococos, pudiendo observarse una disminución de la concentración de los mismos en ambientes salinos en comparación con no salinos (Dorsey et al., 2010; Viau et al., 2011).

Quizás el mayor factor limitante que puedan encontrar los enterococos en el medio ambiente es la inanición, ya que pasan del tracto gastrointestinal animal rico en nutrientes a ambientes oligotróficos. Algunos estudios han demostrado que bajo condiciones de escasez de nutrientes al menos se ven inducidas 42 proteínas, destacando la proteína *gls24*, cuyo gen está bajo el control de un operón inducible por estrés (Giard et al., 2000). Además de esta proteína, se han encontrado dos genes, *sigV* y *rsiV* codificantes de factores sigma y antisigma respectivamente, en *E. faecalis* están controlados por un

mismo operón. Este operón se expresa de manera diferencial en función de factores estresantes, sobreexpresándose en condiciones de inanición total (Benachour et al., 2005). Por último, también se ha observado que ciertas cepas de enterococos son capaces de adquirir un estado denominado viable pero no cultivable que les permite sobrevivir en ambientes estresantes durante un periodo de tiempo superior (Heim et al., 2002).

Por último, la mortalidad de enterococos debido a la depredación por parte de protozoos y/o infección y lisis por bacteriófagos es una de las principales razones de su deterioro en el medio ambiente (Wanjugi & Harwood, 2013). De hecho, la depredación por protozoos puede llegar a generar un 90% de mortalidad tanto en microorganismos autóctonos como alóctonos en aguas marinas y dulces. Siendo mayor la depredación cuando la temperatura es más alta (Byappanahalli et al., 2012b). Por otra parte, a pesar de que aún faltan muchos estudios sobre el efecto de bacteriófagos en la disminución de las poblaciones enterococales, se han llegado a secuenciar 63 bacteriófagos de enterococos, número que sigue siendo bastante reducido en comparación a otras cepas bacterianas patógenas (Chatterjee et al., 2021) y encontrándose algunos bacteriófagos que pueden afectar a la formación del biofilm enterococcal (Song et al., 2021).

1.3.3. El género *Enterococcus* como patógeno nosocomial

A pesar de ser bacterias comensales que forman parte de la microbiología del tracto gastrointestinal de vertebrados, los enterococos en ocasiones se pueden comportar como patógenos oportunistas pudiendo provocar infecciones del tracto urinario, sepsis o endocarditis, entre otras afecciones (Fisher & Phillips, 2009). De las 50 especies identificadas hasta la actualidad, *E. faecalis* y *E. faecium* son las mayoritarias aisladas del tracto gastrointestinal de humanos y vertebrados, pero también las que provocan en torno al 90% de infecciones enterococales (Van Tyne et al., 2013), aunque, sólo ciertas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* son las adaptadas a ambientes hospitalarios y causantes procesos infecciosos (Van Tyne & Gilmore, 2014). La versatilidad de los enterococos a proliferar en diferentes ambientes les predispone a mostrar resistencia, intrínseca o adquirida, a concentraciones bajas de diversos antibióticos (Ogier & Serror, 2008), la mayoría de ellos utilizados actualmente en clínica (Teixeira et al., 2015; Van Tyne & Gilmore, 2014). Dicha resistencia está asociada en parte a los más del 25 % de elementos móviles que se encuentran en su genoma, así como diversos factores de virulencia (Tabla I.2), relacionados con la colonización e invasión de tejidos y con la resistencia a mecanismos de defensa específicos y no específicos del hospedador (Franz et al., 2011).

Adicionalmente los elementos móviles pueden transferirse entre cepas, en la denominada transferencia horizontal de genes, contribuyendo a la supervivencia y evolución de los enterococos en entornos hospitalarios (Van Tyne et al., 2013). De hecho, ciertos estudios demostraron que las infecciones nosocomiales no estaban causadas por la propia flora prehospitalaria de los pacientes, si no que se producía la infección una vez llegados al hospital (Franz et al., 2003; Stuart et al., 2006). Entre los antibióticos a los que son resistentes los enterococos encontramos aminoglucósidos, beta-lactámicos, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (Hammerum, 2012). En particular, los enterococos resistentes a vancomicina (VRE de sus siglas en inglés Vancomycin-Resistant *Enterococci*) suponen actualmente un desafío en ambientes hospitalarios (Cetinkaya et al., 2000).

La vancomicina se comenzó a utilizar en clínica en el 1972 y sólo 15 años después surgieron los primeros casos de enterococos resistentes a vancomicina en Francia e Inglaterra (Fisher & Phillips, 2009). El antibiótico actúa uniéndose al terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de los precursores de peptidoglucano, inhibiéndose la síntesis de pared celular bacteriana (Miller et al., 2014). La resistencia se produce cuando se genera un cambio en los aminoácidos terminales del precursor a D-Alanina-D-lactato o D-alanina-D-serina (Fisher & Phillips, 2009). Esta sustitución reduce la afinidad de unión de los precursores del péptidoglucano a la vancomicina permitiendo que se siga construyendo pared celular (Kristich et al., 2014). La capacidad de producir un terminal diferente en los precursores de peptidoglucanos está codificada en operones de resistencia situados en elementos genéticos móviles (Kristich et al., 2014; Van Tyne & Gilmore, 2014).

En la actualidad hay descritos hasta 9 *clusters* (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* y *vanN*) que intervienen en la resistencia a vancomicina, aunque los aislados más comunes en los hospitales son los fenotipos VanA y VanB de *E. faecalis* y *E. faecium* (Van Tyne & Gilmore, 2014). VanA se codifica en el transposón Tn1546 y confiere resistencia a vancomicina y teicoplanina, mientras que VanB, se codifica en el transposón Tn5382/Tn1549 y confiere resistencia a vancomicina pero no a teicoplanina (Cetinkaya et al., 2000). Tanto *vanA* como *vanB* contienen tres genes (*vanHAX* and *vanH_BBX_B*) imprescindibles para la resistencia. Estos genes codifican para una deshidrogenasa (VanH y VanH_b) encargada de reducir el piruvato en lactato; una ligasa (VanA y VanB) que sintetiza D-ala-D-lac, y una dipeptidasa (VanX o VanX_b) que

hidroliza el terminal D-ala-D-ala. Por último, la expresión de ambos genes está regulada por un sistema de dos componentes compuesto por un regulador de respuesta situado en el citoplasma (VanS y VanS_b) y un sensor kinasa anclado a la membrana (VanR y VanR_b) (Arthur & Quintiliani R., 2001).

Tabla I.2. Factores de virulencia enterocócica y su asociación con el estadio de la enfermedad.
Adaptado de Franz et al., (2011)

Factor de virulencia	Asociación con el estadio de la enfermedad
Sustancia de agregación (AS)	Adhesina para unirse a células eucariotas, promueve la colonización
	Invasión de células eucariotas
	Adhesión a proteínas de la matriz extracelular (posible papel en la translocación)
	Aumenta la supervivencia de las células inmunitarias (evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador)
Citolisina (Cyl)	Toxina de células eucariotas, lisa las células inmunitarias (evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador)
Gelatinasa (Gel)	Hidroliza péptidos biológicos, p. colágeno y fibrina (posible papel en la translocación)
	Hidroliza péptidos antibacterianos (evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador)
Proteína de superficie enterocócica (Espfs and Espfm)	Adhesina, favorece la colonización
	Muestra características de MSCRAMM (posible papel en la evasión de la respuesta inmune del hospedador)
Adhesina al colágeno de <i>E. faecalis</i> (Ace) o <i>E. faecium</i> (Acm)	Adhesión a proteínas de la matriz extracelular, posible papel en la translocación
	Muestra características de MSCRAMM (posible papel en la evasión de la respuesta inmune del hospedador)
Antígeno de endocarditis de <i>E. faecalis</i> o <i>E. faecium</i> (EfaAfs y EfaAfm)	Adhesina: juega un papel en la endocarditis
Hialuronidasa	Hidroliza el ácido hialurónico, posible papel en la translocación
Feromona	Provoca inflamación, induce la producción de superóxido
Antígeno secretado por Sag	Adhesión a proteínas de la matriz extracelular
Producción de superóxido y peróxido de hidrógeno	Daño celular/ADN, promueve la colonización
Cápsula	Evasión de la respuesta inmune del hospedador
Endocarditis y pelos asociados a biopelícula (Ebp)	Adhesión, formación de biopelículas
Potenciador de biopelículas en <i>Enterococcus</i> (Bee)	Adhesión, formación de biopelículas

Desde los primeros inicios de VRE, se ha ido expandiendo por todo el mundo, pasando por Australia, hasta Bélgica, Canadá, Italia o España, aumentando la prevalencia de casos de VRE en hospitales desde un 0,3% hasta un 7,9% en cuatro años (Cetinkaya

et al., 2000). La transmisión de VRE se produce principalmente por contacto directo de una persona a otra o por contacto indirecto a través de ambientes, superficies u objetos infectados. Eso supone un problema puesto que la bacteremia a causa de VRE tiene peor pronóstico que la producida por enterococos susceptibles a vancomicina (Rubinstein & Keynan, 2013). Puesto que el tratamiento de VRE es tan complicado y poco exitoso, es importante llevar a cabo medidas que permitan evitar el contagio y seguir difundiendo la resistencia (Rubinstein & Keynan, 2013)

1.4. Factores influyentes en la estructura de la comunidad microbiana

Los microorganismos no viven aislados en sus respectivos ambientes si no que forman comunidades de distinto nivel de complejidad con un número variable de especies. En estas comunidades se producen multitud de interacciones complejas ya sea entre microbios, con células eucariotas de los hospedadores o con su entorno (Dunny et al., 2008). Estas interacciones son fundamentales para el establecimiento y prosperidad de las poblaciones microbianas en diferentes ambientes u hospedadores, ya que alteran la fisiología, expresión génica y supervivencia de las células individuales, pero también impactan en la dinámica y funcionalidad de toda la comunidad (Blanchard & Lu, 2015). Además, dentro de todas las posibles interacciones, las interacciones bióticas juegan papeles muy importantes especialmente manteniendo la biodiversidad y el flujo de energía de la comunidad (Zapién-Campos et al., 2015). Por tanto, dada la importancia de la composición de la comunidad en su funcionalidad, todas estas interacciones van a ser clave para mantener la biodiversidad, estructura y función de la comunidad microbiana (Kodera et al., 2022)

1.4.1. Factores abióticos

Para que los microorganismos se puedan desarrollar deben interactuar con el ambiente (interacciones abióticas), cuyas condiciones físico-químicas pueden ser muy variables en función del ambiente del que se trate. Estas fluctuaciones ambientales son ubicuas, diversas y modifican el comportamiento, la estructura, la ecología e incluso la evolución microbiana (Nguyen et al., 2021). Los factores abióticos que pueden influir en la estructuración y diversidad de las comunidades microbianas son muy diferentes en función del hábitat de las mismas. En general los factores más influyentes son la salinidad, el pH, la temperatura, la actividad del agua, la radiación UV, la latitud, la altitud, la cantidad de potasio y carbono, y las sales solubles (Gupta et al., 2017). Aunque también

se ha observado que la temperatura media anual o la precipitación media anual, influyen en la diversidad y composición de las comunidades microbianas (Zheng et al., 2020).

La salinidad ha demostrado tener un fuerte impacto en los patrones de distribución de las especies, así como es el principal factor determinante de la composición de la comunidad microbiana (Lozupone & Knight, 2007). La salinidad afecta negativamente a los microorganismos que viven en el suelo ya que la salinización del mismo tiene efectos adversos sobre el tamaño y crecimiento de la biomasa microbiana, disminuyendo las bacterias del suelo implicadas en el aporte o estabilización de materia orgánica del suelo (Zhang et al., 2019). Yuan et al. (2007) observaron que la cantidad de carbono proveniente de la biomasa microbiana se correlacionó negativamente con los altos niveles de sal en el suelo, apuntando a que suelos afectados por la sal contienen menos biomasa microbiana y por tanto perpetuándose las pérdidas de carbono orgánico del suelo salino. Además, también se ven afectadas la tasa de respiración y la nitrificación, disminuyendo o inhibiéndose completamente en suelos salinos en comparación con no salinos, suponiendo una disminución de la actividad microbiana (Wong et al., 2008). Algunos estudios sugieren que unos niveles de salinidad que varía de moderados a altos, podrían reducir la actividad de enzimas del suelo que regulan varios ciclos de nutrientes y reservas de materia orgánica del suelo (Rietz & Haynes, 2003; Wong et al., 2010). Sin embargo, aún existen ciertas contradicciones en el estudio del efecto de la salinidad del suelo sobre los microorganismos, ya que algunos estudios sugieren que con el aumento de la salinidad del suelo aumenta la actividad metabólica y la diversidad de las comunidades microbianas (Dong et al., 2022; Yuan et al., 2007).

En el caso de microorganismos que viven en ambientes acuáticos y sedimentos, la salinidad también ejerce un efecto negativo en la diversidad de las comunidades microbianas, posiblemente debido a que la acumulación de sal en el agua y los sedimentos eleva la osmolaridad extracelular muriendo aquellos microorganismos que no logran adaptarse a dicho estrés osmótico y, por tanto, reduciéndose la diversidad (Song et al., 2022). Aunque se ha observado que los microorganismos sí son capaces de sobrevivir en ambientes acuáticos con una salinidad media, siendo incluso superior su diversidad en ambientes acuáticos hipersalinos que salinos, viéndose drásticamente reducida la diversidad en ambientes saturados en sal (Zhong et al., 2016). Además, se ha observado que las arqueas tienen mayor capacidad de crecer y colonizar ambientes hipersalinos en

comparación con las bacterias, sugiriendo este hecho que las arqueas pueden soportar un estrés energético y salino superior (Oren, 2002).

El uso de sal es quizás uno de los métodos más antiguos utilizados para la conservación y prevención del deterioro de los alimentos. La concentración de la misma depende del tipo de alimento, el pH y su contenido en agua, pero normalmente con menos del 10% de sal es suficiente. En los quesos la concentración de sal varía entre 0.7-7% dependiendo mucho de la variedad de queso (Fox et al., 2017). Además de servir como conservante alimenticio, controlando el crecimiento de BAL y previniendo el crecimiento de microorganismo patógenos; al ser un determinante importante de la disponibilidad de agua, ejerce control sobre la actividad enzimática, los cambios bioquímicos y del sabor y aroma durante la maduración del queso (Guinee, 2004). Adicionalmente, el cloruro sódico (NaCl) participa en la hidratación proteica y en la modificación de la capacidad de retener de agua por parte de la caseína dentro de la matriz del queso y la viscosidad, por lo que también influye en la estabilidad y las propiedades texturales de los quesos (El-Bakry, 2012).

La mayoría de los quesos suelen salarse en salmuera, generándose un gradiente salino desde la corteza hacia el interior. Por tanto, los microorganismos que crecen en la corteza deben ser más tolerantes a la sal. Entre estos encontramos los corineformes, micrococos y estafilococos, que crecen hasta en un 10-15% de NaCl o *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti* que pueden crecer en presencia de hasta 10% y 20% de NaCl respectivamente (Cogan, 2011). Por el contrario, otros microorganismos, como *Geotrichum candidum*, son bastantes sensible a la sal. Su crecimiento se reduce en presencia de un 1% de NaCl, inhibiéndose completamente al 6%. Especialmente importante la concentración de sal en quesos para untar, al tener estos un pH superior a 5,7 y una elevada humedad es necesario adicionarle altas concentraciones de NaCl para evitar el desarrollo de bacterias patógenas y sus toxinas (Tanaka et al., 1986). En general, cuanto mayor sea la concentración de sales, mayor será la seguridad microbiológica de los quesos.

La temperatura ha demostrado ser otro factor que ejerce una fuerte influencia en la actividad microbiana, la biomasa y la composición de la comunidad presente en el suelo (Cregger et al., 2014). De hecho, el efecto de la temperatura es especialmente relevante en los últimos años dado el problema de calentamiento global al que nos enfrentamos. La mayoría de los modelos predicen que el flujo neto de CO₂ a la atmósfera aumentará,

debido a que la descomposición microbiana de la materia orgánica del suelo aumentará a la par que aumente la temperatura. Esto provocaría elevadas pérdidas de carbono en el suelo y un aumento de las emisiones de CH₄ y N₂O a la atmosfera (van Groenigen et al., 2011).

En los alimentos fermentados la temperatura es también un factor abiótico que afecta a las comunidades microbianas aquí presentes. Estos están expuestos a diferentes temperaturas desde el momento de la producción hasta el consumo. En concreto, en los quesos, la temperatura de maduración del queso debe ejercer dos importantes efectos, por un lado, se tiene que ajustar para controlar el crecimiento de bacterias patógenas, pero por otro debe promover el desarrollo de la microbiota secundaria y que se produzcan las reacciones necesarias para una correcta maduración (Cogan, 2011). De forma general, temperaturas más elevadas van a promover el crecimiento de microorganismos iniciadores y no iniciadores, pero también crecen microorganismos patógenos.

Importante a tener en cuenta es cómo afecta la temperatura de almacenamiento del queso. Si el queso posee unas características fisicoquímicas que no permitan el crecimiento de microorganismos patógenos, lo más adecuado es almacenarlos a una temperatura ambiente ya que las tasas de inactivación de microorganismos patógenos son mayores; sin embargo, si el queso tiene unas características que permita el crecimiento de microorganismos (como puede ser un queso fresco) lo ideal es almacenarlo a bajas temperaturas (Possas et al., 2021).

La disponibilidad de agua es uno de los factores abióticos más influyentes en las comunidades microbianas. Los microorganismos presentes en el suelo dependen del agua que haya en los mismos, por tanto, se puede decir que el agua es esencial para el ciclo de nutrientes. Sin embargo, el contenido de agua es muy variable en el tiempo y espacio, influyendo de esta forma en la difusión de solutos y gases (Yan et al., 2015). Al controlar la actividad microbiana, el agua se convierte en un factor determinante en las tasas de mineralización (Paul et al., 2003) De forma general, un exceso de agua en el suelo provoca una difusión limitada del oxígeno reduciéndose la actividad de microorganismos aerobios (Yan et al., 2015) pero aumentando la actividad de los anaerobios. Un déficit de agua en el suelo reduce en general la actividad y crecimiento de los microbios, conllevando una reducción en la mineralización de carbono y nitrógeno y cambiando la estructura de la comunidad (Sorensen et al., 2013).

El agua es quizás uno de los principales factores que controlan la tasa de deterioro de los alimentos (Erkmen & Bozoglu, 2016). Todos los microorganismos necesitan de agua para sobrevivir, siendo importante la disponibilidad de la misma más que la cantidad (Fox et al., 2017). La disponibilidad de agua se expresa mediante el concepto de actividad de agua (a_w), que hace referencia al agua presente en un alimento en forma “libre” y se expresa con un valor entre 0-1,0 (Erkmen & Bozoglu, 2016). En los quesos, generalmente, su humedad se va reduciendo a medida que avanza la maduración de los mismos, siendo más baja en quesos duros que se conservan durante periodos prolongados de tiempo, como ocurre con el Parmigiano Reggiano (Fox et al., 2017). En las primeras etapas de fabricación del queso, la a_w se sitúa en torno a 0.99, permitiendo que crezcan favorablemente los cultivos iniciadores. Sin embargo, durante la salazón y maduración la a_w se reduce, inhibiendo, y, por tanto, controlando, la actividad metabólica y multiplicación de los cultivos iniciadores (Beresford et al., 2001). Este descenso en la a_w también previene el crecimiento de cepas patógenas, como pueden ser *C. botulinum* (Buňková & Buňka, 2017) o *L. monocytogenes* (Wemmenhove et al., 2018). Además, el queso con el avance del tiempo pierde humedad por la evaporación generándose un gradiente en la a_w siendo más baja en la corteza que en el interior (Cogan, 2011). Este gradiente de humedad provoca que cepas patógenas como *L. monocytogenes* no pueda desarrollarse con facilidad en la corteza de quesos de untar o blandos (Lahou & Uyttendaele, 2017).

En el caso de la luz ultravioleta, sus efectos son muy diversos. En las bacterias del suelo la radiación UV-B puede dañar el ADN y producir ROS que conllevan una inhibición de la actividad microbiana en el suelo y por tanto un cambio en la composición de la comunidad bacteriana (Häder et al., 2015). Pero esta luz UV-B solo afecta a los microbios que viven en la superficie del suelo debido a su baja capacidad de penetración (Johnson, 2003). Las comunidades aquí presentes han desarrollado mecanismos de protección frente a este factor como la presencia de pigmentos bacterianos protectores de la UV y sistemas efectivos para reparar su ADN (Kumar et al., 2015; Snider et al., 2009). Los organismos acuáticos que viven cerca de la superficie del agua, también sufren la acción de la luz UV-B, viéndose inhibida la producción y biomasa bacteriana, así como la acción de enzimas metabólicamente importantes (Gustavson et al., 2000). Pero, por otro lado, la radiación UV-B degrada foto-químicamente compuestos de materia orgánica disuelta de mayor peso molecular a moléculas orgánicas más pequeñas y lábiles que

estimulan la actividad microbiana (Gustavson et al., 2000). Con respecto a la radiación UV-A, hay menos estudios disponibles sobre sus efectos en las bacterias del suelo, pero se cree que podría influir en el crecimiento de las plantas (y sus raíces) alterando indirectamente la microbiota del suelo (Verdaguer et al., 2017).

Con respecto al pH, la acidificación de suelos se ha convertido en un fenómeno común a nivel mundial, representando los suelos ácidos un 30-50% del total de tierra, afectando principalmente al desarrollo sostenible de la agricultura moderna (Kochian et al., 2004). Una de las principales causas de la disminución del pH en las tierras cultivables es el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados que llegan a acidificar entre 10 y 100 veces más que la lluvia ácida (Guo et al., 2010). Varios estudios han demostrado que en suelos con un pH ligeramente ácido (en torno a 5), a pesar de no ser un pH óptimo para el crecimiento de microorganismos, la riqueza, diversidad y uniformidad microbiana fueron superiores a suelos con pH neutro (en torno a 7), reduciéndose considerablemente la diversidad en suelos con pH ácidos (en torno a 4) (Cho et al., 2016; Li et al., 2014). El pH también influye en los microorganismos que viven en los océanos. El impacto de la acidificación de los mismos sigue generando debate. Aproximadamente un 23% del CO₂ atmosférico que se libera por la acción humana es absorbido por los océanos (Le Quéré et al., 2018), acidificándose estos. La acidificación de los océanos influye en la supervivencia, crecimiento, fotosíntesis, metabolismo, calcificación y tasa de fijación de nitrógeno, afectando en última instancia a los ecosistemas marinos (Pereira, 2020).

En el caso de los alimentos, generalmente la acidificación de los mismos se ha utilizado tradicionalmente como método de conservación. En concreto, en los quesos, es necesario un pH ligeramente ácido para que se produzca la coagulación de la leche. Pero cambios muy drásticos en el pH influyen en los procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos que se dan durante su producción influyendo en la calidad del producto final (Bansal & Veena, 2022). Por ejemplo, se ha observado que cambios en el pH de la matriz del queso afecta al crecimiento de microorganismos, a la actividad enzimática, la absorción y difusión de las sales, la correcta expulsión del suero o la distribución del calcio (Bansal & Mishra, 2020). La mayoría de las bacterias necesitan un pH neutro para un crecimiento óptimo, inhibiéndose el mismo a pH inferior a 5,0. Las BAL, principalmente los lactobacilos, tienen un pH óptimo por debajo de 7, pudiendo crecer a valores de pH de ~4,0. Las levaduras y mohos crecen a un pH entre 5-7, pero pueden crecer a pH muy ácidos (< 3,0). Los corineformes y los micrococos no crecen por debajo

de 5,5-6,0 (Hayaloglu, 2016). Por tanto, el pH del queso debe oscilar entre 5,6-6,0 para permitir que crezcan la mayoría de los microorganismos, siendo un factor importante en el control de crecimiento de los mismos. El pH muy ácido inhibe principalmente la función de las enzimas respiratorias de los microorganismos interrumpiendo el transporte de nutrientes al interior de la célula (Buňková & Buňka, 2017). Pero, a la vez, cuanto más bajo es el pH, más eficazmente se inhibe el crecimiento de bacterias patógenas.

1.4.2. Factores bióticos

Además del efecto de los factores abióticos sobre el desarrollo de los microorganismos, la interacción con otros organismos también tiene gran influencia en sus posibilidades de desarrollo. Tradicionalmente, las interacciones que se dan entre unidades biológicas (interacciones bióticas) se han clasificado en tres tipos: positivas, negativas y neutras. Si tenemos en cuenta la bidireccionalidad de la interacción, surgen las conocidas interacciones mutualistas (+,+), comensalistas (+,0), amensalistas (-,0), depredación/parasitismo (+,-) y competencia (-,-) (Faust & Raes, 2012) (Figura I.4). Se ha visto que las habilidades de los microbios para interactuar con las células de su entorno y el ambiente se pueden ver reflejadas en los genomas bacterianos de los individuos que componen las comunidades, ya que en muchos casos las interacciones ocurren a través de la transferencia de información molecular y genética (Stubbenieck et al., 2016). De hecho, parte de estas interacciones están basadas en la expresión génica que se produce en respuesta a un estímulo, ya sea biótico o abiótico, siendo dichas moléculas transferibles entre individuos (Atkinson et al., 2013). Entre las posibles interacciones que se pueden suceder encontramos el parasitismo, el mutualismo y el comensalismo. El parasitismo es aquella interacción donde un microorganismo vive sobre o dentro de otro organismo obteniendo sus nutrientes esenciales a costa de su hospedador, es decir un organismo sale beneficiado mientras otro es perjudicado (Drew et al., 2021).

Hay múltiples maneras en que un parásito daña a su hospedador ya sea invadiendo tejidos, produciendo toxinas, o causando daño directo a las células del hospedador. *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Actinomyces* y *Burkholderia* son algunos de los patógenos más conocidos causantes de enfermedades en humanos (Bartlett et al., 2022).

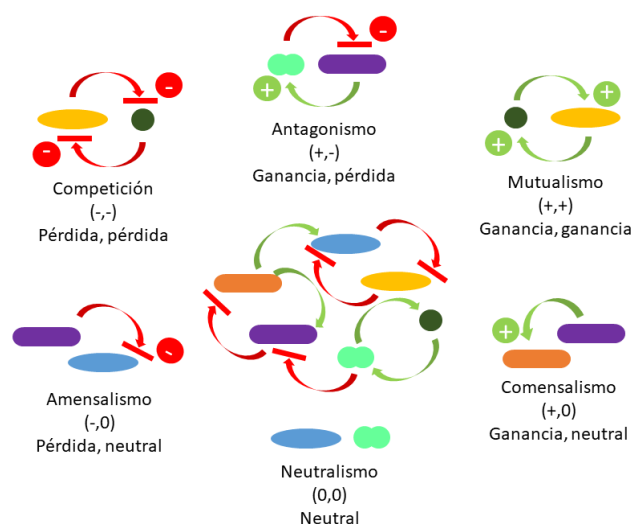


Figura I.4. Interacciones bióticas posibles en comunidades microbianas.

Por otro lado, en la interacción mutualista, ambas partes salen beneficiadas de la interacción. Sin embargo, esto no se ha comprobado empíricamente, surgiendo la idea de que muchos mutualistas son realmente hospedadores que explotan a los simbiositos, en una interacción denominada parasitismo invertido (Mushegian & Ebert, 2016). Además, se ha observado que las asociaciones mutualistas pueden ser obligadas o facultativas, dependiendo de si los organismos interactuantes sobreviven y mantienen las poblaciones en ausencia del otro. Muchas de las relaciones mutualistas obligadas ocurren entre células procariontas y sus hospedadores eucariotas. Por ejemplo, las especies del género *Wolbachia* (alfa-proteobacteria) han evolucionado hasta convertirse en mutualistas obligados como en el caso de su asociación con la avispa *Asobara tabida*, ya que la ausencia de la bacteria inhibe la oogenesis en la avispa (Aanen & Hoekstra, 2007). En el caso del mutualismo facultativo, este es bastante común entre interacciones microbio-microbio, especialmente cuando se produce intercambio de alimentos o recursos. Un ejemplo de esto se produce a nivel de los exudados de las raíces de las plantas, el peptidoglicano de la pared celular de *Bacillus cereus* proporciona el carbono necesario para que crezca *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*, sin que el crecimiento de *B. cereus* se vea alterado (Peterson et al., 2006). Otra interacción mutualista conocida es la denominada sintrofia donde ambas especies consiguen beneficios tróficos (Kouzuma et al., 2015). Por ejemplo, las interacciones que surgen entre bacterias fermentativas y arqueas metanogénicas que, gracias a la “transferencia de electrones entre especies (IET

del inglés Interspecies Electron Transfer)”, ambas pueden cooperar para transformar compuestos orgánicos en metano (Schink, 1997). La formación de biopelículas es quizás de las agrupaciones microbianas sintróficas más comunes en la naturaleza. Las biopelículas son un grupo de bacterias que se encuentran adheridas a una superficie y entre sí, incrustándose en una matriz que producen ellas mismas (Vestby et al., 2020). Para la formación de las mismas, las células comienzan a interactuar entre ellas, a través de señales bioquímicas e intercambio de material genético, iniciándose la biopelícula ya sea adherida a una superficie o sobre las propias células. Poco a poco las células van creando una matriz de sustancias poliméricas extracelulares donde se van incrustando más células (Donlan & Costerton, 2002), hasta obtener una biopelícula madura. Las biopelículas son promotoras de ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el agua, suelo, sedimento o subsuelo. Prácticamente todos los organismos superiores estamos colonizados por biopelículas pudiendo estar implicadas en múltiples infecciones (Flemming & Wuertz, 2019). Además, estas biopelículas también están presentes en el material médico e incluso en el agua potable, contaminando ambos ambientes (Muhammad et al., 2020). Pero, por otro lado, las biopelículas pueden aplicarse en la industria biotecnológica gracias a su capacidad de degradación de residuos contaminantes en el agua, biocatálisis, filtración de agua o producción de biocombustibles (Maksimova, 2014).

Por último, el término comensalismo hace referencia a aquellas relaciones donde un organismo se beneficia del otro, mientras que la otra parte no sale beneficiada ni perjudicada de la interacción. Se ha postulado que posiblemente no existan relaciones puras comensalistas, ya que lo más probable es que uno de los organismos sea beneficioso o dañino para el otro dependiendo de la dinámica que se produzca en el nicho donde se encuentra la comunidad (Little et al., 2008). Es más, es probable que un organismo sea beneficioso o comensal dependiendo de las condiciones. Por ejemplo, se ha descubierto que microbios comensales que habitan en el intestino humano participan en funciones como la absorción de nutrientes, homeostasis del sistema o desarrollo de la inmunidad (Hooper et al., 2002), siendo por tanto beneficiosos para el hospedador.

Los microorganismos también interactúan antagonicamente ya sea compitiendo por un recurso común o depredando a otro organismo competidor (Willey et al., 2008). La depredación se ha postulado como una interacción que afecta fuertemente a la riqueza y uniformidad de especies microbianas (Zhang et al., 2007). Un ejemplo de ello es la

depredación de bacterias del suelo por parte de protozoos, que no solo limita el tamaño de la población bacteriana si no que afecta a la composición y estructura de la comunidad de la misma (Murase et al., 2006).

Al igual que en organismos superiores, la competencia por conseguir nutrientes o espacio juega un papel importante dando forma a las interacciones microbianas (Little et al., 2008). Se han encontrado dos tipos de competencia, la explotadora y por interferencia. La competencia explotadora implica el consumo de un recurso limitante por parte de una cepa a través de una mayor absorción de nutrientes (Ghoul & Mitri, 2016).

Por ejemplo *S. cerevisiae* puede cambiar metabólicamente de fermentación a respiración cuando hay presencia de oxígeno, generando altas tasas de crecimiento, pero con poco rendimiento. Esto les permite consumir más rápidamente los nutrientes en comparación a sus competidores (MacLean & Gudelj, 2006). También se puede dar el caso en el que la cepa no consuma directamente los nutrientes si no que secreten moléculas que degraden o consuman dichos nutrientes. Sin embargo, la producción de dichas moléculas es costosa y al secretarse al exterior de la célula benefician al resto de organismos de la comunidad, por tanto, puede dar lugar a una estrategia de trampa o engaño que consiste en la explotación de productos secretados por otros sin tener los costos asociados a la producción de los mismos. Entre los sistemas que involucran la interacción cooperación-trampas encontramos la producción de sideróforos quelantes de hierro y el *quorum sensing* (QS) (Diggle et al., 2007). Además de por los nutrientes las cepas también compiten por el espacio posicionándose en nichos “privilegiados” y evitando la colonización por otras cepas (Kim et al., 2014). Esto se produce gracias a la producción de moléculas que afectan la estructura espacial y/o la motilidad microbiana (Bauer et al., 2018). Para ello las cepas contienen una gran variedad de moléculas como ramnolípidos, que permite a las células alcanzar nuevas áreas (An et al., 2006); adhesinas, mediante las cuales se adhieren a superficies evitando que los invasores las desplacen, o por ejemplo la secreción de polisacáridos extracelulares (Schluter et al., 2015).

Por otro lado, en la competencia por interferencia los organismos interaccionan a través de rasgos antagónicos como la producción de compuestos tóxicos, el crecimiento excesivo o el comportamiento agresivo (Gorter et al., 2021). De esta forma inhiben el crecimiento de los competidores y por tanto suponen una ventaja competitiva a los productores (Gorter et al., 2021). Son múltiples y muy diversos los compuestos tóxicos implicados en la presente competencia, destacamos la producción de bacteriocinas como

mecanismo de competencia por interferencia (descritas posteriormente) (Riley & Gordon, 1999). Otros mecanismos de esta competencia son aquellos mediados por sistemas de secreción tipo VI (T6SS del inglés Type VI Secretion System), utilizados por las células para inyectar toxinas y otras moléculas a células vecinas con el objetivo de lisarlas (Russell et al., 2014). La intensidad de la competencia por los recursos puede influir en los costos relativos a la producción de compuesto tóxicos. Cuando no hay competencia por los recursos porque no hay competidores, no hay ventaja en desarrollar un rasgo antagónico, por tanto, los genotipos que no desarrollan un rasgo antagónico deberían obtener beneficios de aptitud física y el antagonismo debería disminuir constantemente con el tiempo (Riley, 2011). En presencia de competidores, el grado de antagonismo que se desarrolla puede depender de la medida en que los productores y los competidores se superponen en varios aspectos de la ecología relacionada con la competencia, como el uso de recursos. En general, un alto grado de superposición de recursos, por ejemplo, puede conducir a una mayor confrontación a medida que la eliminación de competidores libera recursos adicionales. Por lo tanto, se espera que los niveles más bajos de superposición de recursos conduzcan a la evolución de una confrontación reducida, ya que los costos de producir características contradictorias no se compensan con los beneficios de la disponibilidad de recursos adicionales (Doekes et al., 2019). A pesar de que, en un principio, los péptidos producidos en estas relaciones antagonistas se creía que su única función era antimicrobiana, se ha puesto de manifiesto que pueden tener funciones no relacionadas con la actividad frente a otros microorganismos (Maqueda et al., 2008).

Más recientemente está surgiendo un interés por estudiar cómo estas interacciones microbianas pueden llegar a influir en la estructura de la comunidad. De hecho, son múltiples los experimentos llevados a cabo en los cuales se implementan dichas interacciones y se estudia cómo afectan a la dinámica de la población y la estructura espacial de la misma (Balagaddé et al., 2008; Basu et al., 2005; C. Liu et al., 2011).

Uno de los últimos trabajos que estudia el efecto de las interacciones en las comunidades de bacterias es el de Blanchar y Lu (2015). Estos pudieron determinar que comunidades donde se dan interacciones comensales, amensales y parasitarias la especie que se beneficia de la interacción tienden a dominar la población mientras que la especie perjudicada queda reducida a una minoría pudiendo llegar a extinguirse. Sin embargo, en comunidades con interacciones mutualistas, neutralistas y competidoras las abundancias

de ambas especies se mantienen iguales, cambiándose por el contrario la homogeneidad espacial. En comunidades mutualistas se determinó mayor grado de homogeneidad y robustez, mientras que en comunidades competidoras las especies se segregaron y fluctuaron, sugiriendo la existencia de una correlación fuerte entre la población y el tipo de interacción social (Blanchard & Lu, 2015). Además, aquellas interacciones perjudiciales como el amensalismo y competencia presentan una disminución fuerte de los linajes sobrevivientes y una expansión de la colonia irregular, sin embargo, en comunidades con interacciones beneficiosas (comensalismo y mutualismo), los linajes presentan mejoría y la expansión colonial es más suave. Quizás la competencia sea una de las interacciones que más influye en las comunidades microbianas. Ghoul y Mitri (2016) observaron que las interacciones competitivas generalmente reducen la diversidad, pero aumenta la estabilidad en las poblaciones a escala local. Además, estos mismos autores propusieron que a la larga las cepas de poblaciones competitivas pueden coexistir en el mismo nicho, pero manteniendo una relación de explotación. Un ejemplo de esto sería la dinámica piedra-papel-tijera (descrito posteriormente) que se produce en poblaciones productoras de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (Narisawa et al., 2008).

Actualmente, gracias al análisis de las interacciones microbianas se ha podido identificar taxones clave de una comunidad, así como se ha observado que el impacto de los microbios no se relaciona directamente con su abundancia en la comunidad, destacando aún más la importancia de los taxones raros (Shade et al., 2014). Además, el estudio de los individuos y sus interacciones, nos permite conocer los roles, tanto directos como indirectos, de miembros específicos de estas comunidades, predecir la respuesta de la comunidad a perturbaciones del ambiente y en un futuro, diseñar comunidades microbianas complejas para nuestro propio beneficio (Kodera et al., 2022).

1.5. Bacteriocinas

Los procesos de interferencia microbiana no específicos ocurren en todos los ecosistemas microbianos, incluidos los alimentos. Entre estos mecanismos se incluyen competencia por nutrientes, creación de ambientes inhóspitos o competencia por sitios de reclutamiento o colonización. Pero también existen relaciones amensalistas provocadas por la producción de sustancias antagónicas como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono o bacteriocinas (Arqués et al., 2015; Silva et al., 2018).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente y producidos por bacterias cuyo fin es matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias estrechamente relacionadas (Camargo Peralta et al., 2009). La mayoría de las bacteriocinas son catiónicas y normalmente anfipáticas. Esto se relaciona con su modo de actuación ya que la mayoría de bacteriocinas actúan mediante acumulación o inserción en la membrana de la célula diana, causando una mayor permeabilidad en la membrana de la célula que es atacada, así como una pérdida de la función de barrera de dicha membrana (Sánchez Hidalgo et al., 2011).

El hecho de que casi todos los procariotas produzcan algún tipo de bacteriocina hace replantearse el papel que tienen estas a nivel de población o comunidad microbiana. Aun así, su función ecológica es aún desconocida. Estas podrían otorgar una ventaja ecológica al organismo productor sobre sus competidores más cercanos (Heng et al., 2007); funcionar como péptidos colonizadores facilitando la invasión de nichos ajenos y a su vez permitir defenderse de la invasión por parte de otras especies (Majeed et al., 2011); o actuar como péptidos de señalización, ya sea señalizando a otras bacterias a través de la detección de quórum, comunicándose dentro de comunidades microbianas o con las células del sistema inmunitario del hospedador (Dobson et al., 2012).

Tradicionalmente se ha considerado que las bacteriocinas son un mecanismo utilizado para conseguir acceso a nutrientes (competencia por interferencia), sin embargo, se ha visto que hay mayor producción de bacteriocinas en ambientes ricos en nutrientes siendo los organismos productores prácticamente incompetentes en ambientes pobres en nutrientes (Heng et al., 2007; Majeed et al., 2011). Uno de los últimos papeles propuesto para las bacteriocinas sigue la hipótesis de “detección de competencia”, que postula que las bacterias tienen la capacidad de detectar y responder a la competencia (LeRoux et al., 2015). De hecho, la producción de bacteriocinas se ha visto que viene desencadenado por factores estresantes como limitación de nutrientes, la competencia o el daño celular.

Existen gran variedad de estudios y modelos teóricos y empíricos que aportan información sobre la dinámica de población de bacterias productoras y del rol de las bacteriocinas en las comunidades (Chao & Levin, 1981; Frank, 1994; Levin et al., 1988). Casi todos estos estudios están centrados en las bacteriocinas producidas por la cepa *E. coli*, las colicinas. Aun así, estos modelos tienen ciertas limitaciones al no poder tener en cuenta el entorno natural donde se producen las interacciones o no conocer la expresión real de los genes identificados (Bauer et al., 2018).

En comunidades bacterianas más simples que implican únicamente dos cepas, la productora de bacteriocinas y las sensibles a dicha bacteriocina, Chao y Levin (1981) pusieron de manifiesto que las pequeñas poblaciones de bacterias productoras de colicinas crecían mejor en ambientes estructurados (donde las células son sésiles y las interacciones son locales) invadiendo las cepas productoras a las sensibles a la bacteriocina; mientras que en ambientes desestructurados (como un medio de cultivo líquido, donde hay mayor masa bacteriana), se necesitaba mayor número de productores para mayor tasa de mortalidad de las bacterias sensibles. Esto es debido a que la producción de bacteriocina supone un coste energético para la cepa productora, además en ambientes desestructurados, el beneficio de la muerte de cepas sensibles se reparte al azar, traduciéndose ambas premisas en menor tasa de crecimiento y finalmente extinción de productoras (Riley & Wertz, 2002). Mientras que en ambientes estructurados los productores crecen en colonias separadas, la toxina difunde hacia las cepas sensibles vecinas estando a su disposición todos los recursos, restos y espacio de otras bacterias muertas y por tanto su tasa de crecimiento es mayor (Riley, 2011). Sin embargo, en ambientes más realistas, lo normal es que se encuentren más de dos especies en un mismo espacio.

En la dinámica de comunidades de tres cepas, además de las cepas productoras y sensibles, se incorpora una tercera cepa, en este caso resistente a la toxina. Dicha resistencia tiene su origen en mutaciones que sufren las células sensibles haciéndolas resistentes a la bacteriocina (Kerr et al., 2002). Cabe resaltar el hecho de que la resistencia a la toxina conlleva un coste metabólico, pero no tan alto como la producción y secreción de la toxina (Neumann & Schuster, 2007). Al incorporarse esta tercera cepa las interacciones entre cepas que se producen recuerdan al clásico juego de niños de “piedra-papel y tijeras” (Riley & Wertz, 2002) (Figura I.5). Ya que tal y como ocurre en el juego, aquí se presenta una estructura cíclica en la que las cepas productoras de la toxina pueden invadir a las cepas sensibles a la toxina, las cuales se han envenenado con ésta. A su vez, las cepas productoras de la toxina pueden ser invadidas por las resistentes a la toxina puesto que estas últimas no requieren de tanto gasto metabólico. Pero, las cepas resistentes a la toxina pueden ser invadidas por las sensibles a la toxina ya que estas últimas no tienen los gastos requeridos para desarrollar la resistencia a la toxina (Neumann & Schuster, 2007).

En ambientes no estructurados y semiestructurados, las cepas resistentes suelen desplazar a las otras dos cepas, mientras que, en ambientes estructurados, se consigue casi un equilibrio coexistiendo, las tres cepas, con abundancias parecidas (Kerr et al., 2002; Riley, 2011).

Si además se complica el ambiente añadiéndose una segunda cepa productora de bacteriocinas, ambas cepas se inducen mutuamente de manera cruzada, sobreviviendo aquella que es superior numéricamente (Majeed et al., 2013). Esto permite que la cepa residente de un ambiente concreto pueda protegerse frente a una invasora bacteriocinógena, mientras que, si ambas cepas están ocupando el mismo nicho, se excluyen mutuamente coexistiendo ambas (Majeed et al., 2011). Aunque más recientemente el estudio de Ghazaryan et al., (2019) ha demostrado que la cepa bacteriocinógena más potente, cuya tasa de producción de bacteriocina es más elevada, independientemente de su frecuencia en la población inicial o entorno en el que se encuentre, desplazará a cepas sensibles y/o bacteriocinógenas cuya tasa de producción sea menor.

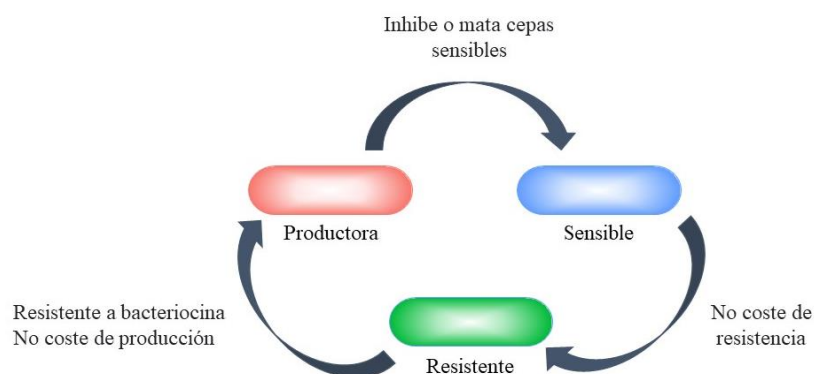


Figura I.5. “Piedra, papel o tijeras” juego de dinámica de competencia en comunidades de tres cepas. Adaptado de Hibbing et al., (2010).

Es frecuente que las bacterias Gram negativas produzcan bacteriocinas, de hecho, las primeras bacteriocinas en caracterizarse fueron las colicinas producidas por *E. coli* (Gratia, 1925); y posteriormente las microcinas, producidas por los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Baquero & Moreno, 1984). Aunque en los últimos años las bacteriocinas más estudiadas son las producidas por las BAL. Estas despiertan gran interés en la industria alimentaria ya que, se consideran buenos conservantes de

alimentos. Su uso como conservante alimenticio permite que se alargue la vida útil del alimento, existe menos riesgo de transmisión de bacterias patógenas y no es necesario añadir conservantes químicos, entre otros beneficios (Florou-Paneri et al., 2013). Por ejemplo, el uso de la enterocina AS-48 inactiva las células de *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* presentes en la fruta y salsas (Montalbán-López et al., 2011). O la bovicina HC5 elimina las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Geobacillus stearothermophilus* ambas causantes del deterioro de jugos ácidos pasteurizados, y de la leche de coco respectivamente (Zimina et al., 2020).

Además de su papel en la conservación de alimentos, las bacteriocinas producidas por BAL se ha visto que son útiles en la cría de animales, controlando el crecimiento excesivo de bacterias potencialmente patógenas. Por ejemplo, se ha observado que la plantaricina (aislada de *Lactobacillus plantarum* F1) es una viable alternativa al uso de antibióticos contra la colibacilosis en pollos de engorde (Ogunbanwet et al., 2017). Y es habitual el uso de bacteriocinas o bacterias productoras de las mismas como aditivos en piensos y agua (Boone et al., 2018).

Quizás uno de los papeles más importantes de las bacteriocinas está relacionado con la salud humana. Durante mucho tiempo se han utilizado cepas no patógenas y no tóxicas como probióticos, que además promueven la salud del hospedador (Garvey & Rowan, 2019). Los probióticos producen muchas sustancias antibacterianas, como las bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de patógenos intestinales reduciendo el número de los mismos y pudiendo cambiar la composición de la microbiota intestinal (Ge et al., 2019).

Actualmente, las bacteriocinas se han postulado como una viable alternativa a los antibióticos, ya que su estrecho espectro de acción convierte a las bacteriocinas en compuestos antibacterianos muy específicos. Esto abre la puerta a más disponibilidad de medicamentos diversos y permite alargar la vida útil de los antibióticos ya existentes. Además, se ha encontrado que las bacteriocinas pueden actuar como agentes terapéuticos, sustancias antivirales alternativas e incluso como posibles agentes anticancerígenos (Drider et al., 2016).

1.5.1. Clases de bacteriocinas producidas por las BAL

Son tantas y tan variadas las bacteriocinas producidas por BAL que se han intentado clasificar en múltiples ocasiones en base a distintos criterios. Una de las

primeras clasificaciones fue dada por Klaenhammer (1993), que clasificaba a las bacteriocinas en cuatro clases principales, en base a su estructura y mecanismo de acción.

Una de las clasificaciones más recientes, completas y válida para incluir otros componentes conocidos de origen microbiano es la propuesta por Alvarez-Siero et al (2016).

En este caso dividen a las bacteriocinas en 3 clases (Figura I.6):

- i. **Clase I.** Péptidos pequeños modificados postraduccionalmente (RiPPs) (menores de 10 KDa)

Dentro de esta clase encontramos aquellos péptidos que sufren algún tipo de modificación enzimática durante su biosíntesis, surgiendo moléculas con aminoácidos y estructuras que influyen en sus propiedades. Estos contienen un péptido líder que sirve para el reconocimiento de enzimas, transporte y mantenimiento del péptido inactivo. Las bacteriocinas englobadas en la Clase I se dividen en 6 subclases: Lantipéptidos (Ia), péptidos circularizados (Ib), sactibioticos, (Ic), péptidos que contienen azol lineal (Id), glicocinas (Ie) y péptidos lazo (If).

Con respecto a los lantipéptidos, estos están subdivididos a su vez en 4 subtipos, siendo los subtipos I y II los únicos que se consideran lantibióticos y tienen actividad antimicrobiana. La nisina, producida por *Lactococcus lactis*, es quizás el lantibiótico (tipo I) mejor estudiado, y es una de las dos bacteriocinas aprobadas como conservante alimenticio, junto con la pediocina PA-1 (Silva et al., 2018). Su actividad antimicrobiana reside en su capacidad de desplazar el lípido II de su ubicación natural, insertándose posteriormente en la membrana generando un poro en la misma (Lubelski et al., 2008).

En el caso de los péptidos circularizados, adquieren esta disposición espacial gracias a la unión mediante enlace peptídico de los extremos amino y carboxilo terminales. Además, todos contienen únicamente segmentos alfa helicoidales y comparte estructuralmente un plegamiento tipo saposina (Montalbán-López et al., 2012). Dentro de los péptidos circulares destacamos la bacteriocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis*, descrita inicialmente como un antibiótico con amplio espectro antibacteriano (Gálvez et al., 1986), aunque, actualmente, se ha convertido en una viable alternativa a los antibióticos en su papel como conservante alimenticio (Grande Burgos et al., 2014). Su modo de acción consiste en la formación de dímeros en solución acuosa que,

posteriormente, impulsados electroestáticamente se reorganizan a nivel de la membrana plasmática culminando en su inserción en la bicapa lipídica (Cebrián et al., 2015).

La estreptolisina, la Glycocina F o la microcina J25 son algunos representantes de las subclases de péptidos que contienen azol lineal (de sus siglas en inglés LAPs), glicocinas y péptidos lazo respectivamente (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

ii. **Clase II.** Bacteriocinas no modificadas menores de 10 kDa

En esta clase se agrupan bacteriocinas que no sufren modificaciones, por tanto, no necesitan enzimas que participen en la maduración. Este grupo está compuesto por 4 subgrupos: bacteriocinas similares a la pediocina (clase IIa), bacteriocinas de dos péptidos (clase IIb), bacteriocinas sin péptido líder (clase IIc) y bacteriocinas de un solo péptido no similares a las pediocinas (clase IId).

Algunas bacteriocinas pertenecientes a esta clase son la pediocina PA-1, similar a pediocina, ampliamente distribuida y muy bien estudiada. Su mecanismo de acción conlleva la unión a receptores del sistema de manosa fosfotransferasa transportadora de azúcar (Man-PTS), posteriormente se inserta en la membrana citoplasmática y termina formando un poro en la misma (Alvarez-Sieiro et al., 2016). La lactococina G producida por *L. lactis* y perteneciente a la clase IIb, requiere de la presencia de ambos péptidos que la componen para funcionar correctamente (Nissen-Meyer et al., 2010). Su modo de acción se basa en la formación de una estructura hélice-hélice que penetra en la membrana, interaccionando con receptores de la misma y formando poros que provocan una permeabilización de la membrana (Rogne et al., 2008).

Una de las bacteriocinas sin péptido líder mejor estudiadas y caracterizadas es la L50 producida por *Enterococcus faecium* muy común entre los enterococos (Ogaki et al., 2016). Estas bacteriocinas no necesitan una molécula receptora para llevar a cabo su acción antimicrobiana. Su mecanismo de acción consiste en la apertura de un gran poro en la membrana gracias a interacciones electroestáticas entre la carga positiva de las bacteriocinas y las negativas de la membrana, provocando una salida masiva de componentes celulares (Perez et al., 2018). Por último, las bacteriocinas lactococcin 972, lactococcin A, y enterocin B son representantes de la clase IId. En este caso son múltiples sus mecanismos de acción pudiendo interaccionar con los receptores tipo Man-PTS o con el lípido II de membrana (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

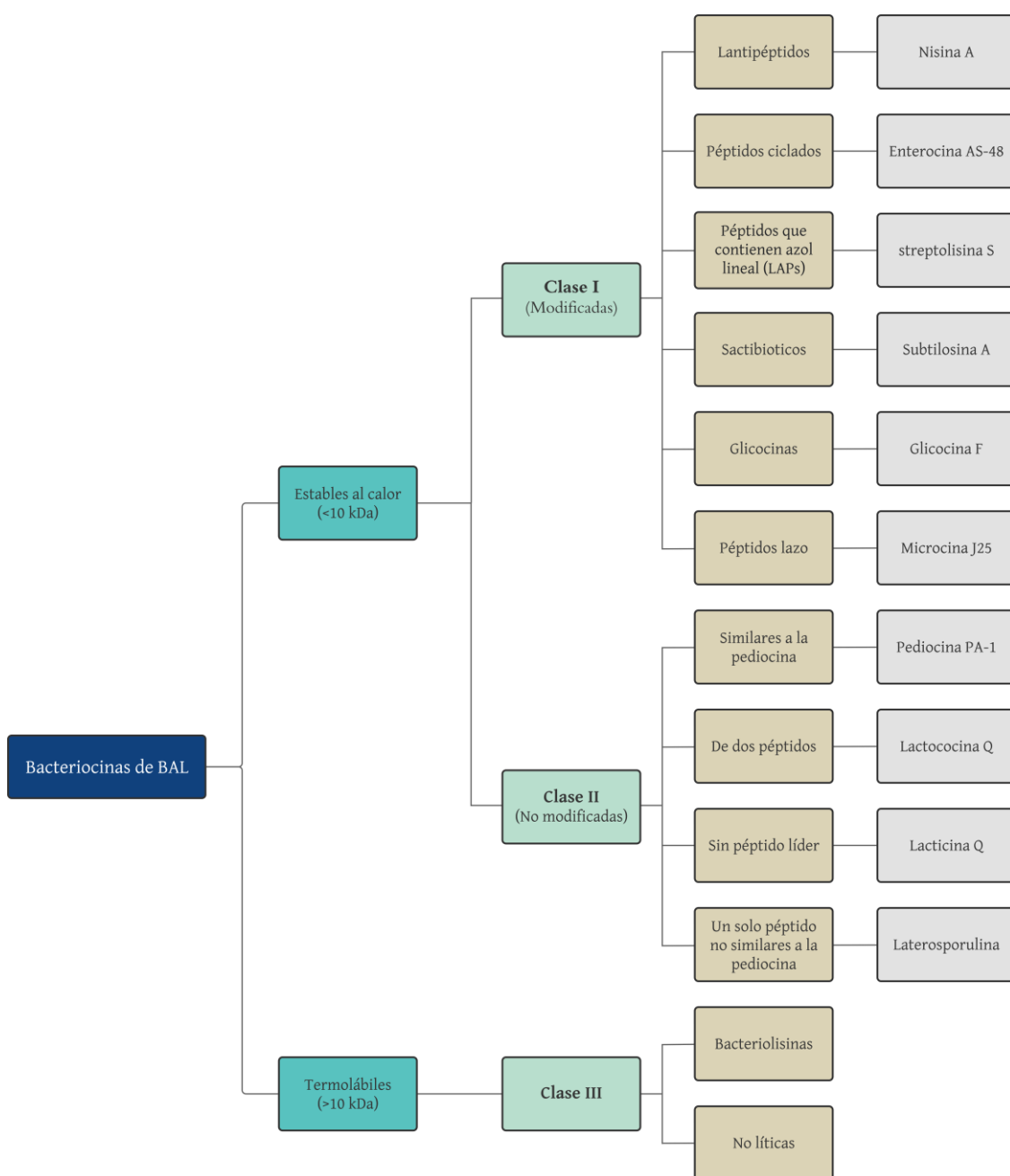


Figura I.6. Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL. Adaptado de Alvarez-Sieiro et al., (2016).

iii. **Clase III.** Bacteriocinas no modificadas mayores de 10 kDa

Estas bacteriocinas no presentan modificaciones, tienen gran peso molecular, son termolábiles y están compuestas por diferentes dominios. Están subdivididas a su vez en bacteriolisinas, como la enterolisina A (Nilsen et al., 2003), la zoocina A (Simmonds et al., 1996) y la Millericin B (Beukes et al., 2000) que actúan escindiendo los enlaces del

peptidoglicano de la pared celular de la célula diana; y las bacteriocinas no líticas como las disgalacticina (Heng et al., 2006) o la caseicina (Müller & Radler, 1993), cuyo mecanismo de acción no siempre va asociado a una lisis celular.

1.5.2. Genética de la biosíntesis de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas varía en función de la cepa bacteriana y de las condiciones del entorno. Generalmente las bacteriocinas se sintetizan inactivas sufriendo posteriores modificaciones que permiten su activación (Mokoena, 2017). Para que una bacteriocina se produzca es necesario que se expresen un grupo de genes. Estos determinantes genéticos de bacteriocinas se agrupan en operones, que pueden estar situados en el cromosoma bacteriano, como en el caso de la mesenterocina de *Leuconostoc mesenteroides* (Osmanagaoglu & Kiran, 2011), en plásmidos, como en la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno et al., 1998), o en elementos trasponibles conjugativos, como en el caso de la nisina (Dimov et al., 2005; Kumariya et al., 2019). El hecho de que muchos de los operones se localicen en plásmidos puede facilitar la propagación de bacteriocinas intra e interespecifica entre las BAL (Dimov et al., 2005).

En el caso de bacterias productoras de múltiples bacteriocinas, los *cluster* genéticos pueden localizarse en el mismo plásmido como ocurre en cepas de *Ligilactobacillus salivarius* donde se ha encontrado un megaplásmido que porta los *clusters* de genes involucrados en la biosíntesis de diferentes bacteriocinas homólogas a la salivaricina (O'Shea et al., 2011); en el cromosoma, como las bacteriocinas NKR-5-3 A, C, D y Z de *E. faecium* NKR-5-3 (Ishibashi et al., 2014); o en el cromosoma y en el plásmido, como la Sakacin X y Sakacin P producidas por *Latilactobacillus sakei* 5 (Vaughan et al., 2003).

Los genes de los operones, de forma general codifican una preforma de la bacteriocina que contiene una secuencia líder en el extremo N-terminal que permite que la bacteriocina no se active mientras esté en la célula productora y funciona como señal de reconocimiento para el sistema transportador (Nes et al., 1996). Los operones donde se encuentran los genes responsables de bacteriocinas son inducibles, pero necesitan de una excreción y acumulación extracelular de péptidos autoinductores para que se produzca la inducción (Kumariya et al., 2019). Existen operones muy sencillos con únicamente dos genes, el gen estructural y el gen que codifica para una proteína que

confiere inmunidad a su propia bacteriocina. Se pueden encontrar otros operones más complejos, como los de las bacteriocinas circulares que contienen genes superpuestos.

Pero de forma general los *clusters* contienen (Cintas et al., 2001; Dimov et al., 2005):

- i) Gen estructural que codifica para una preprobacteriocina.
- ii) Gen encargado de codificar para la proteína de inmunidad.
- iii) Genes encargados del transporte y secreción de la bacteriocina, normalmente relacionados con transportadores de tipo ABC.
- iv) Genes relacionados con la maduración y procesamiento de la bacteriocina.

Los genes estructurales generalmente codifican para una preprobacteriocina inactiva que contienen un extremo N-terminal donde se pueden encontrar secuencias líder de tipo “doble glicina” (Gly-Gly) (Cotter et al., 2005), del tipo FNLDV (o nisina) (Nes & Johnsborg, 2004) o péptidos señales, que permiten el reconocimiento y procesando de la preprobacteriocina por parte de los transportadores tipo ABC o sistemas Sec. Los genes implicados en la modificación y exportación normalmente están ubicados cerca del gen estructural de la bacteriocina. En función del tipo de bacteriocina, la modificación y la exportación puede variar (Kumariya et al., 2019). Algunas bacteriocinas similares a la pediocina, por ejemplo, contienen una secuencia líder formada entre 15 - 30 residuos y un motivo doble de glicina. Esta secuencia es reconocida por el extremo N-terminal de un transportador ABC, provocando la hidrólisis de ATP en el extremo C-terminal del transportador, produciéndose un cambio conformacional del mismo, dando lugar a la escisión del péptido líder por la doble glicina y la traslocación de la proteína madura al exterior celular (Ennahar et al., 2000). Todo este proceso puede estar ayudado por proteínas accesorias implicadas en la secreción o en la inmunidad frente a la bacteriocina. En otras bacteriocinas de la misma clase la exportación se produce por un sistema de translocación dependiente de secuencia (Cui et al., 2012). En el caso de bacteriocinas circulares, es necesario su circularización antes de exportarla al exterior. Dicho proceso está mediado por un complejo proteico localizado en la membrana que también participa en la exportación de la misma (van Belkum et al., 2011). En las proteínas sin péptido líder aún no se conoce bien el mecanismo de biosíntesis, aunque se ha encontrado que comparten un residuo de metionina formilado en su extremo N-terminal que necesita de más estudio (Zhang et al., 2022b). Además, se ha observado que estas bacteriocinas se activan inmediatamente después de su traducción, así como la regulación de la mayoría

de estas bacteriocinas está relacionada con estímulos ambientales, como en el caso de las enterocinas L50, enterocina P y enterocina Q producidas todas ellas por *E. faecium* L50 a diferentes temperaturas (Criado et al., 2006).

Varios estudios han demostrado que la naturaleza y composición del medio de cultivo puede afectar a la capacidad de producción de bacteriocinas por parte de las cepas. Medios enriquecidos en carbono, nitrógeno, extracto de levadura o proteínas favorecen el crecimiento y producción de bacteriocinas (Yang et al., 2018). Otros factores que afectan a la producción son el pH y la temperatura. Por ejemplo, en algunos lactobacilos, un pH inicial del medio en torno a 5-7 induce una mayor producción de bacteriocina (Elayaraja et al., 2014; Mahrous et al., 2013), viéndose inhibida la misma a pH inferior a 4 (Abbasiliasi et al., 2011). Además, la temperatura donde se encuentra mayor producción está estrechamente relacionada con la temperatura óptima de crecimiento, como en el caso de las amilovorins 1471, lactocina S, lactocina A o la nisina Z (Todorov & Dicks, 2006).

En algunos casos la producción de bacteriocinas está mediada por QS, es decir se produce la bacteriocina en caso de que haya un elevado número de células en el medio. De hecho, producir bacteriocinas mediante QS cuando hay elevadas densidades celulares se ha observado que no solo aumenta la eficacia de la bacteriocina, sino que además estas afectan a cepas sensibles más rápidamente, los beneficios de matar a los competidores podrían ser mayores y es más probable que se liberen más recursos que pueden compartirse con sus clones (Maldonado-Barragán & West, 2020). De forma general este sistema está compuesto por un péptido autoinductor, una histidina kinasa (HK) que sirve para captar las señales, y un módulo o regulador de respuesta (RR) que activa la expresión génica (Czárán & Hoekstra, 2007). Estos dos últimos forman un sistema regulador de dos componentes. Cabe indicar que los genes que codifican para estos componentes pueden ubicarse en un operón independiente o formar parte del mismo operón donde se encuentra el gen estructural y de transporte. La producción de la bacteriocina se da solo si hay una concentración suficiente de péptido autoinductor en el espacio extracelular, culminando en una elevada producción de bacteriocinas durante un periodo determinado. En algunos casos la producción de bacteriocinas puede estar regulada por dos RR como en el caso de la plantaricina producida por *Lpb. plantarum* C11, denominados PlnC y PlnD (Straume et al., 2007). En este caso, los genes de estos RR se ubican en el mismo operón que los genes codificantes de la HK y del péptido autoinductor y adyacentes al resto de genes

responsables de la producción de la bacteriocina. El péptido inductor puede ser producido por la propia cepa productora de bacteriocinas. Este péptido puede estar codificado por un gen específico o puede tratarse de la propia bacteriocina (Dimov et al., 2005). Por ejemplo, la producción de la sakacina P por *Lacticaseibacillus sakei* LTH673 se produce gracias a la unión de una feromona (IP-673) codificada por el gen *sppIP* que se cotranscribe con los genes de la HK y del RR. Por otro lado, las bacteriocinas pentocina MQ1, la nisina o la subtilina actúan como péptidos autoinductores. Estas bacteriocinas a elevadas concentraciones se une a su HK y la activan, fosforilando la misma al RR y produciéndose una mayor producción de las bacteriocinas (Dobson et al., 2012; Kleerebezem, 2004; Wayah & Philip, 2018).

1.5.3. Determinantes de inmunidad frente a bacteriocinas

Las cepas productoras de bacteriocinas deben contener mecanismos para evitar que sus propias bacteriocinas las maten, para ello es común que expresen una o varias proteínas de inmunidad específicas. Estas proteínas podrían funcionar mediante la interacción directa con la bacteriocina, evitando la formación de poros, o podría unirse al receptor de membrana y bloquear la unión de la bacteriocina con el mismo (Dridier et al., 2006). Normalmente los genes relacionados con la inmunidad se localizan justo al lado y en la misma orientación que el gen estructural, como en el caso de las proteínas similares a la pediocina, cuyos genes estructurales se ubican en un pequeño operón junto con los genes de inmunidad (Mokoena, 2017). No obstante, existen algunas excepciones como en el caso de los genes estructurales de las bacteriocinas LsbB de *L. lactis* BGM1 (Gajic et al., 2003) o EntB de *E. faecium* BFE 900 (Franz et al., 1999) cuyos genes de inmunidad, aunque sí están próximos al gen estructural, se encuentran en orientación contraria al mismo. En el caso de la mundicitina KS producida por *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto et al., 2002), entre el gen de inmunidad y el estructural se encuentra el gen del transporte. O en proteínas circulares generalmente sus genes de inmunidad suelen estar ubicados en diferentes operones a los del gen estructural (Zhang et al., 2022b). En algunos casos, el éxito de la función protectora se debe a la coexistencia con transportadores ABC, siendo la proteína la responsable de la unión a la bacteriocina y el transportador el encargado de expulsarla hacia el exterior (Smits et al., 2020; Stein et al., 2003).

- **Proteínas inmunitarias**

De forma general se tiene poco conocimiento sobre cómo realmente las proteínas de inmunidad confieren dicha protección a las cepas productoras. Probablemente dentro de las bacteriocinas pertenecientes a la clase II es donde más y mejor descritas están las proteínas de inmunidad. La mayoría de ellas comparten ciertas características como pequeño tamaño molecular, elevado punto isoeléctrico (pI) o segmentos hidrofóbicos que indican la posibilidad de insertarse en las membranas citoplasmáticas (Diep et al., 2007; Nes et al., 2011). En las bacteriocinas similares a las pediocinas, sus proteínas inmunitarias se han clasificado en tres subgrupos (A, B y C) según la similitud de la secuencia aminoacídica (Fimland et al., 2002). Todas ellas comparten en común un haz de cuatro hélices antiparalelo en la región N-terminal con una cola C-terminal flexible (Zhu et al., 2022). Numerosos trabajos han resuelto las estructuras de este tipo de proteínas, como en el caso de EntA-im (grupo A) que confiere inmunidad frente a la enterocina A (Johnsen et al., 2005), PisI (grupo B) que protege frente a la piscicolina-126 (Martin-Visscher et al., 2008) o ImB2 (grupo C) que confiere protección frente a la carnobacteriocina B2 (Sprules et al., 2004). Estas proteínas comparten un haz de cuatro hélices torcido a la izquierda antiparalelo en el extremo N-terminal, una región C-terminal más rígida, un parche cargado positivamente que varía en su localización, pero se encuentra conservado en las tres clases y una región cargada negativamente ubicada en zonas muy similares, cuya función es desconocida (Figura I.7). Normalmente las proteínas inmunitarias de las bacteriocinas similares a las pediocinas están localizadas intracelularmente por lo que deben formar un complejo ternario, que involucra a la bacteriocina, la proteína inmune y el sistema manosa PTS (Diep et al., 2007), para poder actuar. Este complejo se forma una vez la bacteriocina entra en contacto con su receptor, desde el exterior, y posteriormente la proteína desde el interior celular bloquea el canal de entrada y evita la muerte celular.

En el caso de las bacteriocinas de dos péptidos, aún no se ha dilucidado cómo las proteínas de inmunidad protegen a las cepas, pero sí se ha observado que la mayoría de ellas están asociadas a la membrana, conteniendo al menos un dominio putativo transmembrana (Pérez-Ramos et al., 2021).

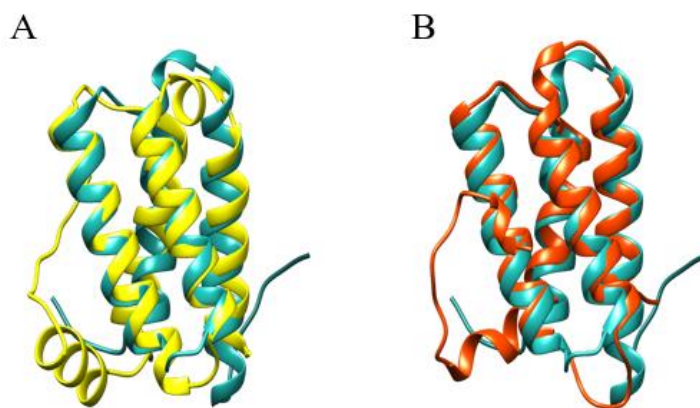


Figura I.7. Superposición de PisI (azul) con EntA-im (naranja) e ImB2 (amarillo). La imagen muestra la superposición helicoidal de las proteínas PisI e ImB2 (A), y de las proteínas PisI y EntA-im (B). Adaptado de (Martin-Visscher et al., 2008).

Por ejemplo, en el caso de las proteínas LagC y LciM, que protegen frente a la lactococina G y lactococina MN respectivamente, se ha observado que contienen cuatro dominios transmembrana, aunque difieren en orientación longitudinal y secuencia (Britton et al., 2020). Las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas plantaricina S, brococina-C y termofilina 13 contienen dos dominios transmembrana (Nissen-Meyer et al., 2009), mientras que la proteína de la carnobacteriocina XY (CbnZ) solo contiene un dominio transmembrana (Britton et al., 2020).

Los mecanismos de inmunidad en las proteínas sin péptido líder no están muy estudiados, habiéndose identificado solo posibles proteínas candidatas que podrían estar implicadas. Este es el caso de la aureocina A53, donde dos proteínas inmunitarias, AucIA y AucIB, podrían actuar, junto con su transportador ABC correspondiente, en la inmunidad (Nascimento et al., 2012). Similar a la aureocina A53, la aureocina A70, contiene una proteína homóloga a AucIA, transmembrana y catiónica implicada en la inmunidad. Sin embargo, el transportador ABC asociado a esta bacteriocina está implicado en la exportación de la misma pero no en la inmunidad (Coelho et al., 2014).

También se han descrito algunas proteínas inmunitarias para las bacteriocinas de clase I, como los lantibióticos. La estructura del primer péptido inmunitario caracterizado se corresponde con la proteína SpaI de la bacteriocina subtilina producida por *B. subtilis* (Christ et al., 2012). En este caso se trata de una proteína con el extremo N-terminal flexible y un núcleo constituido de seis cadenas β , que forman una lámina β antiparalela

torcida, flanqueada por una horquilla β larga y dos hélices α . Esta estructura no se había descrito con anterioridad por tanto se consideró un nuevo motivo estructural en proteínas. Este extremo N-terminal es el que permite a la proteína unirse a la membrana externa de la célula, gracias a interacciones electroestáticas, y desde ahí llevar a cabo su función protectora. Aunque aún no se tiene claro cómo actúa SpaI se han sugerido varias formas de actuación como una posible unión y secuestro de la subtilina, impidiendo la oligomerización de la misma y que se forme el poro, evitando que se forme el complejo subtilina-lípido II o actuando junto con el transportador ABC (SpaFEG) en la unión y exportación de la bacteriocina.

NisI, de *L. lactis*, que confiere inmunidad frente al lantibiótico nisina, se ha demostrado que se trata de dos dominios estructuralmente independientes entre sí (Hacker et al., 2015). Estos dominios se pliegan de forma similar al dominio central de SpaI y entre sí. A pesar de que estructuralmente son similares, ambos dominios tienen propiedades muy diferentes. El dominio donde se encuentra el extremo N-terminal está cargado positivamente, siendo equivalente al extremo N-terminal de SpaI y por tanto el que se une a la membrana; mientras que el dominio con el extremo C-terminal está cargado negativamente y jugaría un papel importante uniéndose a la nisina.

En el caso de las bacteriocinas cíclicas (clase I) se han descrito algunas proteínas de inmunidad por ejemplo la proteína codificada por el gen *as-48D₁* confiere resistencia frente a la bacteriocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* (Martínez-Bueno et al., 1998). Aunque posteriormente se ha postulado que la proteína As-48C también podría jugar un papel importante en la autoprotección (Fernández et al., 2008). Ambas proteínas tienen dos (As-48D₁) o cuatro (As-48C) dominios transmembrana putativos que podrían actuar interactuando con los poros formados por la bacteriocina impidiendo así el paso de la misma, aunque aún es desconocido su modo de actuación. CcII, CirE y GaaI son otras proteínas inmunitarias descritas en las bacteriocinas cíclicas carnociclina A, circularina A y gasericina A, respectivamente (Van Belkum et al., 2011). Todas ellas tienen un pI alto y varios dominios de membrana putativos, lo que indica que podrían estar asociados a la misma. Sin embargo, la actividad de una proteína de inmunidad por sí sola no es suficiente para conseguir una inmunidad total, como se discutirá más adelante.

- **Transportadores ABC**

Los transportadores ABC constituyen una de las superfamilias de proteínas de transporte más grandes. Estas proteínas están localizadas en la membrana y están presentes en todos los dominios de la Vida (Ye et al., 2020), pudiendo transportar una gran variedad de moléculas como pequeños iones o proteínas de hasta 800kDa. De forma general, estos transportadores están formados por 4 dominios estructurales básicos, dos dominios transmembrana (TMDs del inglés Transmembrane Domains) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs del inglés Nucleotide-binding Domains) situados en el citoplasma (Wilkins, 2015). Estos dominios pueden encontrarse como una combinación de subunidades individuales, pueden ser idénticas por pares o una combinación de NBD y/o TMD fusionados. Los NBDs presentan una similitud elevada en todos los transportadores ABC, además es en estos dominios donde se encuentran todos los motivos de secuencia característicos como los motivos Walker A y B, el motivo-C (o LSGGQ) y los A-, H- y Q-loop (Wilkins, 2015). Posteriormente se encontró un nuevo motivo estructural (E-loop) característico de los transportadores ABC de lantibióticos (Okuda et al., 2010). Es en los NBDs donde se produce la hidrólisis de ATP provocando los cambios conformacionales en los TMD (Wilkins, 2015).

En el caso de los TMDs estos pueden contener de entre 6 a 10 hélices alfa transmembrana empaquetadas de tal manera que forman un poro que conecta el exterior celular con el interior (ter Beek et al., 2014). Al contrario que en los NBDs no muestran conservación en la secuencia, probablemente debido a que transportan sustancias de naturaleza muy diversa. Además, es común encontrar residuos específicos en TMD que intervienen en la unión del sustrato (Wilkins, 2015).

En algunos casos son necesarias proteínas de unión periplasmática (PBPs del inglés Periplasmic Binding Proteins) que confieren afinidad, especificidad y direccionalidad al transportador ABC; y proteínas periféricas o accesorias (Higgins, 2001). Normalmente los genes de la proteína accesoria se encuentran contiguos a los del transportador y dichas proteínas suelen poseer el extremo N-terminal ubicado hacia el citoplasma, el extremo C-terminal orientado hacia el medio extracelular y una región transmembrana o TMS (Franke, 1998). Aun no se tiene claro cuál es la función de estas proteínas, pero podrían estar implicadas en la secreción de la bacteriocina (Skaugen et al., 2003).

De forma general los transportadores ABC suelen estar relacionados con la secreción de la bacteriocina, así como con la inmunidad frente a la misma, pudiendo encontrar varios transportadores asociados a un mismo *cluster* de genes como en el caso de los lantipéptidos, que contienen dos transportadores, denominados LanT y LanFEG, en su operón (Smits et al., 2020). LanT se encarga de la secreción del péptido precursor hacia el exterior mientras que LanFEG está involucrado en la inmunidad (Alkhatib et al., 2012). En el caso de la nisina estos transportadores se denominan NisT y NisFEG. NisT exporta la prenisina modificada pero inactiva ya que aún debe escindir la secuencia líder. En el caso del transportador NisFEG, NisF constituiría el NBD, donde se une e hidroliza el ATP, mientras que NisE y NisG forman un complejo de membrana heterodimérico. Se ha visto que este segundo transportador ABC proporciona una inmunidad más completa si se combina con la actividad de una proteína inmunitaria como NisI (Stein et al., 2003). Un mecanismo similar se ha encontrado en *B. subtilis*. La proteína de inmunidad SpaI y el transportador ABC SpaFEG confieren resistencia a la subtilisina (Klein & Entian, 1994).

En el caso de las bacteriocinas circulares, como la enterocina AS-48, su *cluster* de genes también contiene dos transportadores ABC, As-48C₁D y As-48EFGH, además de una proteína inmunitaria denominada As-48D₁. El transportador As-48C₁D es el encargado de expulsar al exterior la bacteriocina recién sintetizada, mientras que el transportador As-48EFGH estaría directamente implicado con la inmunidad a la bacteriocina expulsándola de la membrana (Diaz et al., 2003). Sin embargo, para una protección completa, es necesaria la acción conjunta del segundo transportador ABC junto con la proteína inmunitaria As-48D₁. Se han encontrado otros sistemas inmunitarios iguales al de AS-48 en la circularina A, carnociclina A y garvicina ML (Borrero et al., 2011; Kemperman et al., 2003; van Belkum et al., 2010).

1.5.4. Diversidad de bacteriocinas en el género *Enterococcus*

Al igual que el resto de géneros pertenecientes a las BAL, los enterococos producen gran variedad de bacteriocinas, denominadas enterocinas, la mayoría de ellas aisladas de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* (Nes et al., 2007). Las enterocinas suelen ser de pequeño peso molecular, formadas por entre 20-60 aminoácidos, catiónicas e hidrofóbicas (Ben Braïek & Smaoui, 2019). En la Tabla I.3 se recogen algunas de las enterocinas aisladas de enterococos.

Al igual que otras bacteriocinas producidas por Gram positivas, la principal diana de las enterocinas es la membrana plasmática, en la cual inducen la formación de poros. Estos poros provocan que se agote el potencial de membrana y el gradiente de pH, escapando hacia el medio extracelular sustancias intracelulares y culminando en la inactivación celular (García de Fernando, 2016). Las enterocinas presentan fuerte actividad frente a cepas de *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus spp.*, y *Clostridium spp*, incluso en ocasiones han mostrado actividad frente a algunas bacterias Gram negativas (Ben Braïek & Smaoui, 2019).

Tabla I.3.Principales bacteriocinas aisladas de enterococos. Adaptado de Wu et al., (2022) y Nes et al., (2007).

Organismo	Bacteriocina	Clase	Referencia
<i>E. faecalis</i>	Citolisina	Lantipéptidos/Ia	(Booth et al., 1996)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina AS-48	Péptido circularizado/Ib	(Casaus et al., 1997)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina F4-9	Glicocinas/Ie	(Maky et al., 2015)
<i>E. faecium</i>	Enterocina A		(Aymerich et al., 1996)
<i>E. faecium</i>	Enterocina P		(Cintas et al., 1997)
<i>E. faecium</i>	Bac 32	Similares a la pediocina/IIa	(Inoue et al., 2006)
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina GM-1		(Kang and Lee, 2005)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina SE-K4		(Eguchi et al., 2001)
<i>E. faecium</i>	Enterocina X		(Hu et al., 2010)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina 1071A, enterocina 1071B	De dos péptidos/IIb	(Franz et al., 2002)
<i>E. faecalis</i>	MR10A MR10B		(Martín-Platero et al., 2006)
<i>E. faecium</i>	Enterocina L50; L50A, L50B		(Cintas et al., 1998)
<i>E. faecium</i>	Enterocina Q	Sin péptido líder/IIc	(Cintas et al., 2000)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina EJ97		(Gálvez et al., 1998)
<i>E. faecium</i>	Enterocina RJ-11		(Yamamoto et al., 2003)
<i>E. faecium</i>	Enterocina B	Un solo péptido no similares a la pediocina/IIId	(Casaus et al., 1997)
<i>E. faecalis</i>	Enterolisina A	Termolábiles/Clase III	(Khan et al., 2013)

La enterocina A, fue la primera bacteriocina de *E. faecium* CTC492 en purificarse y caracterizarse a mediados de los años 90 (Hu et al., 2014). Se produce junto con otras bacteriocinas, más frecuentemente junto con la enterocina B y es uno de los péptidos antimicrobianos más potentes, cuyo objetivo suelen ser cepas de *Listeria* (Ness et al., 2014).

La citolisina, codificada en los elementos móviles de las cepas de *E. faecalis* y con actividad hemolítica y antibacteriana, se caracterizó experimentalmente por primera vez en 1934 (Van Tyne et al., 2013). La citolisina se considera un lantibiótico cuya síntesis es un proceso complejo que implica modificación postraduccional, externalización y procesamiento proteolítico (Coburn & Gilmore, 2003). Su espectro de acción es amplio presentando actividad frente a eucariotas y procariotas (Cox et al., 2005).

Situándonos en la clase Ib según la clasificación de Alvarez-Sieiro et al. (2016), encontramos la bacteriocina AS-48, una de las más estudiadas a nivel de estructura, actividad biológica y mecanismo de regulación (Sánchez Hidalgo et al., 2011). Compuesta por 70 residuos y catiónica, AS-48 es una bacteriocina producida por *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 (Gálvez et al., 1989) y presenta actividad frente a bacterias patógenas de los alimentos tales como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* o *Paenibacillus sp* (Sánchez Hidalgo et al., 2011). Se pueden encontrar diversas cepas o especies que produzcan una misma bacteriocina, tratándose de variantes naturales puesto que apenas muestran diferencias en composición aminoacídica, estructura, espectros de actividad o inmunidad (Grande Burgos et al., 2014). En cuanto a la enterocina AS-48 se han encontrado 3 variantes publicadas bajo tres nombres diferentes: enterococcin EFS2 (Maisnier-Patin et al., 1996), enterocin 4 (Joosten et al., 1996) y bacteriocin 21 (Tomita et al., 1997). Más recientemente, se ha determinado que la cepa *E. faecalis* UGRA10 (Cebrián et al., 2012), y las dos cepas de *E. faecium*, 7C5 (Folli et al., 2003) y RJ16 (Abriouel et al., 2005), son también productoras de la enterocina AS-48.

AS-48 presenta una estructura primaria circular gracias al enlace peptídico que une el triptófano de C-terminal y con la metionina del N-terminal y una estructura secundaria globular alfa-helicoidal, compuesta por 5 motivos de hélices alfa, repetidos y quedando hacia el interior las cadenas laterales hidrofóbicas de las hélices (Grande Burgos et al., 2014; Sánchez-Barrena et al., 2003). Cada dominio alfa-helicoidal se le denomina de alfa1-alfa5. Donde los residuos básicos se encuentran localizados en las hélices alfa4 y 5, mientras que el lado hidrofóbico se sitúa en las hélices 1-3. La estructura globular es muy compacta, esto unido a la circularidad confiere, a la enterocina AS-48, una elevada estabilidad frente a pH y temperaturas extremas, así como frente a agentes

desnaturalizantes, otorgándole potencial como bioconservante alimenticio (Sánchez Hidalgo et al., 2011).

Tras la cristalización y el análisis con rayos X, se puso de manifiesto que la proteína muestra dos estados oligoméricos según las propiedades físico-químicas del ambiente en el que se encuentran: Forma dimérica DF-1; soluble en agua y Forma dimérica anfipática unida a la membrana denominada DF-II. Ambos estados son importantes en el mecanismo de acción biológica de AS-48 (Cebrián et al., 2015).

El *cluster* genético que determina para la bacteriocina AS-48, denominado *as-48*, se localiza en el plásmido conjugativo pMB2 de *E. faecalis* S-48 (Martinez-Bueno et al., 1990). Dicho *cluster* está formado por 10 genes (*as-48A, B, C, C1, D, D1, E, F, G y H*) (Tabla I.4) que se deben expresar de manera coordinada para que se produzca la síntesis de la enterocina (Maqueda et al., 2004, 2008).

Tabla I.4. Características de las proteínas predichas codificadas por el grupo de genes *as-48*. Adaptado de Maqueda et al., (2008)

Gen	Características relevantes	Función putativa de la proteína
<i>as-48A</i>	Prepropeptido	Precursor de AS-48
<i>as-48B</i>	Proteína integral de membrana (12 TM)	Maquinaria biosintética
<i>as-48C</i>	Proteína integral de membrana (4 TM)	Proteína auxiliar de inmunidad
<i>as-48C1</i>	Proteína integral de membrana (6 TM)	Transportador ABC putativo relacionado con la secreción de la enterocina
<i>as-48D</i>	Proteína de unión al ATP	Transportador ABC putativo relacionado con la secreción de la enterocina
<i>as-48D1</i>	2 TM	Proteína de inmunidad
<i>as-48E</i>	Proteína integral de membrana (4 TM)	Transportador ABC adicional relacionado con la inmunidad
<i>as-48F</i>	Proteína hidrofílica a excepción del segmento N-terminal. Domino de espiral enrollado.	Proteína auxiliar involucrada en el reciclaje de <i>as-48G</i>
<i>as-48G</i>	Proteína hidrofílica dependiente de ATP	Transportador ABC adicional relacionado con la inmunidad
<i>as-48H</i>	Proteína integral de membrana (4 TM)	Transportador ABC adicional relacionado con la inmunidad

Dichos genes están organizados en dos operones (*as-48ABC* y *as-48C1DD1EFGH*), y cada operón va precedido de dos promotores PA y P2 respectivamente, existiendo un tercer promotor interno, PD1, que podría estar encargado de la transcripción de los últimos 4 genes (*as-48EFGH*) (Cebrián et al., 2014) (Figura I.8). Este operon está relacionado con la adquisición de inmunidad a la enterocina por

parte de la cepa productora. En este caso As-48G supone el dominio de unión al ATP, As-48EH son proteínas hidrofóbicas con unión a la membrana y As-48F, se considera una proteína accesoria que ayuda a alejar la enterocina de la membrana citoplasmática, empujándola hacia el medio de alrededor (Diaz et al., 2003).

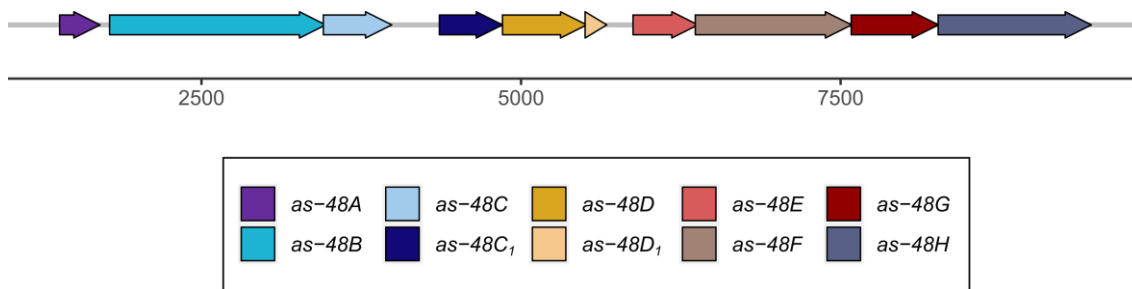


Figura I.8. Organización genética del *cluster* de genes responsable de la enterocina AS-48.

Por otro lado, las enterocinas L50A/B producidas por *E. faecium* L50 (pertenecientes a la clase IIc: sin péptido líder), son muy comunes entre los enterococos habiéndose descrito múltiples variantes como la enterocina entJ/I (Ruiz-Barba et al., 2007), MR10A/B (Martín-Platero et al., 2006) y F58 (Achemchem et al., 2005). Estas bacteriocinas muestran actividad por separado, aunque en ocasiones ejercen un efecto sinérgico. Principalmente son activas frente a patógenos de los alimentos, como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *L. monocytogenes*; patógenos clínicos como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus pneumoniae*; así como frente a algunas otras BAL, como *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, etc (Basanta et al., 2008).

El cluster de genes responsable de las enterocinas L50A/B está situado en el plásmido pCIZ1 de *E. faecium* L50. Este está formado por al menos 6 marcos de lecturas abiertos o de sus siglas en inglés ORF (Open Reading Frame), denominados *orfA*, *orfB*, *orfC*, *orfD*, *orfE* y *orfF*, más un ORF secuenciado de forma incompleta (*orfG*). De los cuales *orfA* y *orfB* se corresponden con los genes estructurales de las bacteriocinas L50A/B. Mientras que *orfE*, *orfF* y *orfG*, situados aguas arriba del gen estructural *orfA*, no se les asignó función alguna (Cintas et al., 1998). Posteriores análisis de la variante

entJ/I, pusieron de manifiesto que las regiones codificantes *L50E*, *L50F* y *L50G* (idénticas a *orfE*, *orfF* y *orfG*) podrían codificar para un transportador ABC (Figura I.9).

De hecho, las proteínas codificadas por *L50F* y *L50G* comparten similitudes con una proteína transportadora de *Staphylococcus saprophyticus* ATCC15305, y con una proteína transmembrana de *Bacillus cereus* ATCC14579 respectivamente. Además, se pudo identificar una región aguas debajo de los genes estructurales, donde se localizaban cuatro ORFs consecutivos que mostraron una elevada similitud con los genes *as-48EFGH* del cluster de genes de la bacteriocina AS-48 (Ruiz-Barba et al., 2007) (Figura I.9).

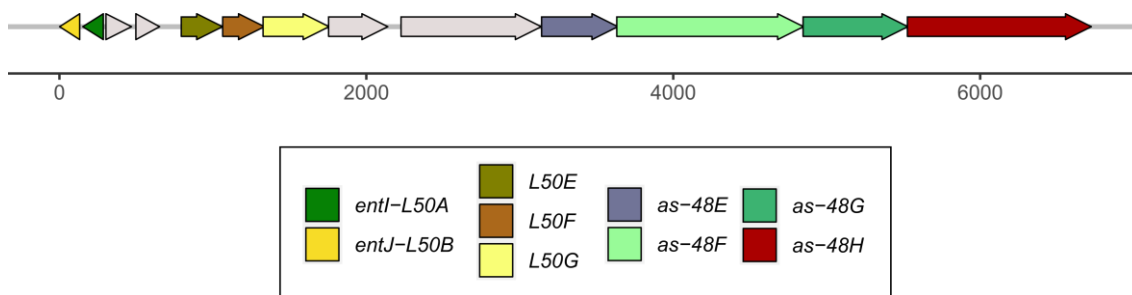


Figura I.9. Organización genética del cluster de genes responsable de las enterocinas entJ/I.

2. Objetivos

Los microorganismos viven en comunidades complejas que están implicadas en procesos vitales de los ecosistemas, tales como la producción primaria, la descomposición, el ciclo de nutrientes, la regulación del clima, el almacenamiento de carbono, la propagación de enfermedades y la transformación de contaminantes, así como en estar implicados en la salud humana o en la producción de alimentos. El efecto positivo de estas comunidades depende en última instancia de la estructura de la misma que, a su vez, está determinada por las interacciones de los miembros de la comunidad. Sin embargo, a pesar de su gran impacto, nuestro conocimiento de los principios que gobiernan la estructuración y funcionamiento de los ecosistemas microbianos es muy limitado, lo que implica una escasa capacidad para un control y optimización racional de las comunidades de microorganismos. Recientemente se han dado avances importantes en conocer los patrones de biodiversidad asociados a gradientes locales y globales. Pero aún son desconocidos los principios mecanicistas que dirigen el ensamblaje de los microorganismos en comunidades, así como los factores que determinan la composición y estructura final de las mismas.

De todas las posibles interacciones (bióticas y abióticas), un elemento clave en configurar las comunidades microbianas es la interacción cruzada entre microorganismos que afectan al ciclo de vida del individuo, y entre estas, las bacteriocinas, constituyen productos de secreción que interfieren directamente en la viabilidad de sus competidores. La producción de bacteriocinas está ampliamente distribuida entre las especies bacterianas, sin embargo, esto contrasta con la alta diversidad de las comunidades de microorganismos, lo que parece contradecir el efecto letal de las bacteriocinas. Adicionalmente, siempre se ha estudiado el efecto de las mismas desde un punto de vista local entre cepa productora y sensible, dejando de lado que suelen vivir en ambientes de diferente grado de complejidad. Los estudios de inmunidad que podrían explicar los patrones de resistencia se han centrado en la propia inmunidad del organismo productor, pero no indagan en los patrones de resistencia de otros individuos que puedan coexistir con los productores. Por ello, nuestra hipótesis general de trabajo es que las bacteriocinas (producción y resistencia) juegan un papel importante en el control del ensamblaje y estructuración de las distintas poblaciones microbianas para formar comunidades que actúen como una unidad ecológica. En la presente tesis se ha estudiado hasta qué punto el papel de las bacteriocinas es a nivel local (intragremio) o a nivel global (comunidad),

así como las bases moleculares de esta acción. Para ello se han tomado como modelo las comunidades de bacterias lácticas presentes en el queso. El queso es un ambiente idóneo donde pueden desarrollarse comunidades microbianas multiespecies interactuantes y de complejidad reducida en comparación a otros sistemas. Además, estas comunidades son fácilmente cultivables y manipulables facilitando el estudio y la comprensión de los patrones y los mecanismos subyacentes del ensamblaje, función y las interacciones de las comunidades microbianas.

El **objetivo general** de esta tesis ha sido discernir los mecanismos moleculares y ecológicos que explican los patrones de producción y resistencia de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) en comunidades de bacterias lácticas. Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1- Identificar los genes responsables de la resistencia cruzada entre cepas productoras de bacteriocinas (**Capítulo III**).
- 2- Identificar patrones genómicos específicos en cepas productoras de bacteriocinas (**Capítulo IV-V**).
- 3- Analizar los efectos de la producción de bacteriocinas en las poblaciones de enterococos de quesos elaborados con leche cruda (**Capítulo VI**).
- 4- Analizar los efectos de la producción de bacteriocinas en las comunidades bacterianas de quesos elaborados con leche cruda (**Capítulo VI**).

3. Referencias

- Aanen, D. K., & Hoekstra, R. F. (2007). The evolution of obligate mutualism: If you can't beat 'em, join 'em. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(10), 506-509. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.007>
- Abbasiliasi, S., Ramanan, R. N., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Mohamad, R., Mohd Daud, H., & Ariff, A. (2011). Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a strain isolated from budu. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25, 2652-2657. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0101>
- Abriouel, H., Lucas, R., Omar, N. B., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2005). Enterocin AS-48RJ: A variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 383-397. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.01.007>
- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 141-150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02586.x>
- Achi, O. K. (2005). The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), Art. 5. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i5.15111>
- Adegboye, M. F., Ojuederie, O. B., Talia, P. M., & Babalola, O. O. (2021). Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: Metabolic engineering, applications, and challenges. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01853-2>
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>
- Ahmed, W., & Katouli, M. (2008). Phenotypic variations of enterococci in surface waters: Analysis of biochemical fingerprinting data from multi-catchments. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 452-458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03763.x>
- Alkhatib, Z., Abts, A., Mavaro, A., Schmitt, L., & Smits, S. H. J. (2012). Lantibiotics: How do producers become self-protected? *Journal of Biotechnology*, 159(3), 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.032>
- Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., Hernández-Barranco, A., & Mayo, B. (2008). Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, 19(1), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.003>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., & Parsek, M. R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3828-3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2005). Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3041-3048. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005>
- Antunes, P., Novais, C., & Peixe, L. (2020). Food-to-Humans Bacterial Transmission. *Microbiology Spectrum*, 8(1), 8.1.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-2016>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Research International*, 2015, e584183. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>

- Arthur, M., & Quintiliani R., J. (2001). Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in *enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(2), 375-381. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.375-381.2001>
- Ashokkumar, V., Venkatkarthick, R., Jayashree, S., Chueter, S., Dharmaraj, S., Kumar, G., Chen, W.-H., & Ngamcharussrivichai, C. (2022). Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts—A critical review. *Bioresource Technology*, 344, 126195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>
- Atkinson, N. J., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2013). Identification of Genes Involved in the Response of *Arabidopsis* to Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, 162(4), 2028-2041. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222372>
- Avershina, E., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Pope, P., & Rudi, K. (2014). Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 280-290. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12223>
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1676-1682. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1676-1682.1996>
- Badgley, B. D., Nayak, B. S., & Harwood, V. J. (2010). The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of *enterococci* in a subtropical watershed. *Water Research*, 44(20), 5857-5866. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.005>
- Badgley, B. D., Thomas, F. I. M., & Harwood, V. J. (2010). The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of *Enterococcus spp.* *Environmental Microbiology*, 12(5), 1271-1281. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02169.x>
- Balagaddé, F. K., Song, H., Ozaki, J., Collins, C. H., Barnet, M., Arnold, F. H., Quake, S. R., & You, L. (2008). A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Molecular Systems Biology*, 4, 187. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.24>
- Bansal, V., & Mishra, S. K. (2020). Reduced-sodium cheeses: Implications of reducing sodium chloride on cheese quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 733-758. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12524>
- Bansal, V., & Veena, N. (2022). Understanding the role of pH in cheese manufacturing: General aspects of cheese quality and safety. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05631-w>
- Baquero, F., & Moreno, F. (1984). The microcins. *FEMS Microbiology Letters*, 23(2-3), 117-124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01046.x>
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6506-6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- Bartlett, A., Padfield, D., Lear, L., Bendall, R., & Vos, M. (2022). A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans. *Microbiology*, 168(12), 001269. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001269>
- Basanta, A., Sánchez, J., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2008). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 293-307. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.011>
- Bassi, D., Gazzola, S., Sattin, E., Dal Bello, F., Simionati, B., & Coconcelli, P. S. (2020). Lactic Acid Bacteria Adjunct Cultures Exert a Mitigation Effect against Spoilage Microbiota in Fresh Cheese. *Microorganisms*, 8(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081199>

- Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C. H., Arnold, F. H., & Weiss, R. (2005). A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, *434*(7037), 1130-1134. <https://doi.org/10.1038/nature03461>
- Bauer, M., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial Cell*, *5*, 215-219. <https://doi.org/10.15698/mic2018.05.628>
- Beman, J. M., Steele, J. A., & Fuhrman, J. A. (2011). Co-occurrence patterns for abundant marine archaeal and bacterial lineages in the deep chlorophyll maximum of coastal California. *The ISME Journal*, *5*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.204>
- Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). *Enterococci*: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed research international*, *2019*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
- Benachour, A., Muller, C., Dabrowski-Coton, M., Le Breton, Y., Giard, J.-C., Rincé, A., Auffray, Y., & Hartke, A. (2005). The *Enterococcus faecalis* sigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. *Journal of Bacteriology*, *187*(3), 1022-1035. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1022-1035.2005>
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, *11*(4), 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *61*(2), 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H.-G., & Hastings, J. W. (2000). Purification and Partial Characterization of a Murein Hydrolase, Millericin B, Produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(1), 23-28. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.23-28.2000>
- Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, *7*(4), 447-470. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027>
- Blanchard, A. E., & Lu, T. (2015). Bacterial social interactions drive the emergence of differential spatial colony structures. *BMC Systems Biology*, *9*, 59. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0188-5>
- Bleicher, A., Stark, T., Hofmann, T., Matijašić, B. B., Rogelj, I., Scherer, S., & Neuhaus, K. (2010). Potent antilisterial cell-free supernatants produced by complex red-smear cheese microbial consortia. *Journal of Dairy Science*, *93*(10), 4497-4505. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3244>
- Boehm, A. B., Grant, S. B., Kim, J. H., Mowbray, S. L., McGee, C. D., Clark, C. D., Foley, D. M., & Wellman, D. E. (2002). Decadal and shorter period variability of surf zone water quality at Huntington Beach, California. *Environmental Science and Technology*, *36*(18), 3885-3892. Scopus. <https://doi.org/10.1021/es020524u>
- Boone, K., Camarda, K., Spencer, P., & Tamerler, C. (2018). Antimicrobial peptide similarity and classification through rough set theory using physicochemical boundaries. *BMC Bioinformatics*, *19*(1), 469. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2514-6>
- Booth, M. C., Bogie, C. P., Sahl, H.-G., Siezen, R. J., Hatter, K. L., & Gilmore, M. S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology*, *21*(6), 1175-1184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.831449.x>
- Börner, R. A., Kandasamy, V., Axelsen, A. M., Nielsen, A. T., & Bosma, E. F. (2019). Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(1), fny291. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny291>
- Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2011). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(1), 369-373. <https://doi.org/10.1128/AEM.01173-10>

- Britton, A. P., van der Ende, S. R., van Belkum, M. J., & Martin-Visscher, L. A. (2020). The membrane topology of immunity proteins for the two-peptide bacteriocins carnobacteriocin XY, lactococcin G, and lactococcin MN shows structural diversity. *MicrobiologyOpen*, 9(1), e00957. <https://doi.org/10.1002/mbo3.957>
- Broadbent, J., & Steele, J. (2005). Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. *ASM News*, 71, 121-128.
- Buňková, L., & Buňka, F. (2017). Microflora of processed cheese and the factors affecting it. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), 2392-2403. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1060939>
- Burganskaya, E. I., Bryantseva, I. A., Gaisin, V. A., Grouzdev, D. S., Rysina, M. S., Barkhutova, D. D., Baslerov, R. V., Gorlenko, V. M., & Kuznetsov, B. B. (2018). Benthic phototrophic community from Kiran soda lake, south-eastern Siberia. *Extremophiles*, 22(2), 211-220. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0989-0>
- Burton, J. P., Chanyi, R. M., & Schultz, M. (2017). Chapter 19 - Common Organisms and Probiotics: *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). En M. H. Floch, Y. Ringel, & W. Allan Walker (Eds.), *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 165-169). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00019-7>
- Butterly, C. R., Bünemann, E. K., McNeill, A. M., Baldock, J. A., & Marschner, P. (2009). Carbon pulses but not phosphorus pulses are related to decreases in microbial biomass during repeated drying and rewetting of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1406-1416. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.018>
- Byappanahalli, M., & Fujioka, R. (2004). Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Science and Technology*, 50(1), 27-32. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0009>
- Byappanahalli, M. N., Roll, B. M., & Fujioka, R. S. (2012a). Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and *enterococci* in Hawaii's soil environments. *Microbes and Environments*, 27(2), 164-170. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me11305>
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012b). *Enterococci* in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 76(4), 685-706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., & Montel, M.-C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(2), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.008>
- Camargo Peralta, I., Gómez Bertel, S., & Salazar Montoya, V. (2009). Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. *Teoría y praxis investigativa*, 4(2), 27-31.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E., & Holo, H. 1997. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143(7), 2287-2294. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2287>
- Castellone, V., Bancalari, E., Rubert, J., Gatti, M., Neviani, E., & Bottari, B. (2021). Eating Fermented: Health Benefits of LAB-Fermented Foods. *Foods*, 10(11), 2639. <https://doi.org/10.3390/foods10112639>
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, 30(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Cebrián, R., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Albert, A., Maqueda, M., & Sánchez-Barrena, M. J. (2015). The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *Journal of Structural Biology*, 190(2), 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>

- Cebrián, R., Rodríguez-Ruano, S., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Montalbán-López, M. (2014). Analysis of the promoters involved in enterocin AS-48 expression. *PLoS ONE*, 9(3), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090603>
- Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant *enterococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686-707. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.686-707.2000>
- Chao, L., & Levin, B. R. (1981). Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10), 6324-6328. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6324>
- Chatterjee, A., Willett, J. L. E., Dunny, G. M., & Duerkop, B. A. (2021). Phage infection and sub-lethal antibiotic exposure mediate *Enterococcus faecalis* type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria. *PLoS Genetics*, 17(1), e1009204. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009204>
- Chen, P. (2021). Chapter 24—Lactic Acid Bacteria in Fermented Food. En D. Dhanasekaran & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Advances in Probiotics* (pp. 397-416). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00024-1>
- Chiller, K., Selkin, B. A., & Murakawa, G. J. (2001). Skin microflora and bacterial infections of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 6(3), 170-174. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>
- Cho, S.-J., Kim, M.-H., & Lee, Y.-O. (2016). Effect of pH on soil bacterial diversity. *Journal of Ecology and Environment*, 40(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s41610-016-0004-1>
- Choudhury, P., Sirohi, S., Puniya, A., & Chaudhary, P. P. (2012). Harnessing the Diversity of Rumen Microbes using Molecular Approaches. En S. K. Sirohi, T. K. Walli, B. Singh, & N. Singh (Eds.), *Livestock Green House Gases: Emission and options for mitigation* (Vol. 19, pp. 65-82). Satish Serial Publishing House.
- Christ, N. A., Bochmann, S., Gottstein, D., Duchardt-Ferner, E., Hellmich, U. A., Düsterhus, S., Kötter, P., Güntert, P., Entian, K.-D., & Wöhnert, J. (2012). The First Structure of a Lantibiotic Immunity Protein, SpaI from *Bacillus subtilis*, Reveals a Novel Fold. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35286-35298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401620>
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4321-4330. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4321-4330.1997>
- Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (2000). Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6806-6814. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6806-6814.2000>
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., & Håvarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are Related to Staphylococcal Hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 1988-1994. <https://doi.org/10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998>
- Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: A novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 5(10), 661-669. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00310.x>
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, 11(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- Coelho, M. L. V., Coutinho, B. G., Cabral da Silva Santos, O., Nes, I. F., & Bastos, M. do C. de F. (2014). Immunity to the *Staphylococcus aureus* leaderless four-peptide bacteriocin

- aureocin A70 is conferred by Aurl, an integral membrane protein. *Research in Microbiology*, 165(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.11.001>
- Cogan, T. M. (2011). Cheese | Microbiology of Cheese. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 625-631). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00076-5>
- Colston, T. J., & Jackson, C. R. (2016). Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: What is known and unknown. *Molecular Ecology*, 25(16), 3776-3800. <https://doi.org/10.1111/mec.13730>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01641>
- Cox, C., Coburn, P., & Gilmore, M. (2005). Enterococcal Cytolysin: A Novel Two Component Peptide System that Serves as a Bacterial Defense Against Eukaryotic and Prokaryotic Cells. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 77-84. <https://doi.org/10.2174/1389203053027557>
- Cox, C. R., & Gilmore, M. S. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 75(4), 1565-1576. <https://doi.org/10.1128/IAI.01496-06>
- Cox, M. J., Huang, Y. J., Fujimura, K. E., Liu, J. T., McKean, M., Boushey, H. A., Segal, M. R., Brodie, E. L., Cabana, M. D., & Lynch, S. V. (2010). *Lactobacillus casei* Abundance Is Associated with Profound Shifts in the Infant Gut Microbiome. *PLoS ONE*, 5(1), e8745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008745>
- Cregger, M. A., Sanders, N. J., Dunn, R. R., & Classen, A. T. (2014). Microbial communities respond to experimental warming, but site matters. *PeerJ*, 2, e358. <https://doi.org/10.7717/peerj.358>
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2006). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7634-7643. <https://doi.org/10.1128/AEM.00983-06>
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., & Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5(8), 855-875. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00036-4)
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., & Cui, H. (2012). Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16668-16707. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>
- Czárán, T., & Hoekstra, R. F. (2007). A spatial model of the evolution of quorum sensing regulating bacteriocin production. *Behavioral Ecology*, 18(5), 866-873. <https://doi.org/10.1093/beheco/arm061>
- Dagli, N., Dagli, R., Darwish, S., & Baroudi, K. (2016). Oral Microbial Shift: Factors affecting the Microbiome and Prevention of Oral Disease. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(1), 90-96. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1808>
- De Freitas, I., Pinon, N., Maubois, J.-L., Lortal, S., & Thierry, A. (2009). The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.026>
- De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., Swings, J., & Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. Nov. From dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 4), 1069-1074. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02549-0>

- De las Rivas, B., Marcobal, Án., & Muñoz, R. (2007). MLST (Multilocus sequence typing): Un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. En Junta de Extremadura (Ed.), *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas: Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector vitivinícola* (M. Ramirez y col., pp. 34-35).
- Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., & Verma, A. K. (2020). Human microbiome: An academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2147-2167. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>
- Deng, J., Yin, Y., Zhu, W., & Zhou, Y. (2018). Variations in Soil Bacterial Community Diversity and Structures Among Different Revegetation Types in the Baishilazi Nature Reserve. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02874>
- Desfossés-Foucault, É., LaPointe, G., & Roy, D. (2014). Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1, 4554-4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.10000871107>
- Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Santos Soler-González, A., Ramírez-Rodrigo, H., & Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1229-1236. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1229-1236.2003>
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 258-266. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y>
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., & Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2384-2389. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608775104>
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S., & West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450(7168), Art. 7168. <https://doi.org/10.1038/nature06279>
- Dimov, S., Ivanova, P., & Harizanova, N. (2005). Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 193. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817270>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H., & Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 7(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin Production: A Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1-6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>
- Doekes, H. M., de Boer, R. J., & Hermsen, R. (2019). Toxin production spontaneously becomes regulated by local cell density in evolving bacterial populations. *PLoS Computational Biology*, 15(8), e1007333. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007333>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dong, Y., Zhang, J., Chen, R., Zhong, L., Lin, X., & Feng, Y. (2022). Microbial Community Composition and Activity in Saline Soils of Coastal Agro-Ecosystems. *Microorganisms*, 10(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040835>

- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dorsey, J. H., Carter, P. M., Bergquist, S., & Sagarin, R. (2010). Reduction of fecal indicator bacteria (FIB) in the Ballona Wetlands saltwater marsh (Los Angeles County, California, USA) with implications for restoration actions. *Water Research*, *44*(15), 4630-4642. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.012>
- Drew, G. C., Stevens, E. J., & King, K. C. (2021). Microbial evolution and transitions along the parasite–mutualist continuum. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(10), Art. 10. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00550-7>
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *8*(4), 177-182. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9223-0>
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *70*(2), 564-582. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>
- Dridi, B., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. Nov., sp. Nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(Pt 8), 1902-1907. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>
- Dubin, K., & Pamer, E. G. (2014). *Enterococci* and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiology spectrum*, *5*(6), 10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016>
- Ducklow, H. (2008). Microbial services: Challenges for microbial ecologists in a changing world. *Aquatic Microbial Ecology*, *53*(1), 13-19. <https://doi.org/10.3354/ame01220>
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., & Bonnarme, P. (2015). Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLOS ONE*, *10*(4), e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>
- Dunny, G. M., Brickman, T. J., & Dworkin, M. (2008). Multicellular behavior in bacteria: Communication, cooperation, competition and cheating. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *30*(4), 296-298. <https://doi.org/10.1002/bies.20740>
- Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S. H., Doi, K., Ohmomo, S., & Ogata, S. (2001). Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic *enterococci*, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(2), 247-253. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.247>
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., & Balasubramanian, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*, S305-S311. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C537>
- El-Bakry, M. (2012). Salt in Cheese: A Review. *Current Research in Dairy Sciences*, *4*(1), 1-5. <https://doi.org/10.3923/crds.2012.1.5>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—Diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(1), 85-106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x>
- Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016). Factors Affecting Microbial Growth in Foods. En *Food Microbiology: Principles into Practice* (pp. 91-106). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch5>

- FAQ: *Microbes Make the Cheese: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in June 2014.* (2015). American Society for Microbiology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562892/>
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Ferguson, D. m., Moore, D. f., Getrich, M. a., & Zhouandai, M. h. (2005). Enumeration and speciation of *enterococci* found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 598-608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02660.x>
- Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., & Maqueda, M. (2008). Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 240-250. <https://doi.org/10.1128/JB.01528-07>
- Ferrera, I., & Sánchez, O. (2016). Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: How far have we come? *Biotechnology Advances*, 34(5), 790-802. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.003>
- Fimland, G., Eijsink, V. G. H., & Nissen-Meyer, J. (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 11), 3661-3670. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3661>
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(4), 247-260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. En M. Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria—R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (pp. 549-614). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/47766>
- Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., & Berni, R. (2003). Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production1. *FEMS Microbiology Letters*, 221(143-149). [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00176-9)
- Forno, E., Onderdonk, A. B., McCracken, J., Litonjua, A. A., Laskey, D., Delaney, M. L., DuBois, A. M., Gold, D. R., Ryan, L. M., Weiss, S. T., & Celedón, J. C. (2008). Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clinical and molecular allergy : CMA*, 6, 11. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-6-11>
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Microbiology of Cheese Ripening. En P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 333-390). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_11
- Frank, S. A. (1994). Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits. *Evolutionary Ecology*, 8(4), 369-386. <https://doi.org/10.1007/BF01238189>
- Franke, C. M. (1998). *Topology of a type I secretion system for bacteriocins of Lactococcus lactis* [Thesis fully internal (DIV)]. s.n.
- Franz, C. M. A. P., Grube, A., Herrmann, A., Abriouel, H., Stärke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., & Holzapfel, W. H. (2002). Biochemical and Genetic Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2550-2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2550-2554.2002>

- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). *Enterococci in foods—A conundrum for food safety*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00174-0)
- Franz, C. M. A. P., Worobo, R. W., Quadri, L. E. N., Schillinger, U., Holzapfel, W. H., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. (1999). Atypical Genetic Locus Associated with Constitutive Production of Enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2170-2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2170-2178.1999>
- Fujioka, R. S., & Byappanahalli, M. N. (2001). - Microbial ecology controls the establishment of fecal bacteria in tropical soil environment. En T. Matsuo, K. Hanaki, S. Takizawa, & H. Satoh (Eds.), *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology* (pp. 273-283). Elsevier Science B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-044450563-7/50211-0>
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2003). Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34291-34298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211100200>
- Gálvez A, Giménez-Gallego G, Maqueda M, & Valdivia E. (1989). Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother*;33(4):437-441. doi:10.1128/AAC.33.4.437
- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(10), 765-771. <https://doi.org/10.1139/m86-141>
- Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of Microbiology*, 171(1), 59-65. <https://doi.org/10.1007/s002030050678>
- García de Fernando, G. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Enterococcus* in Milk and Dairy Products. En J. W. Fuquay, P. L. H. McSweeney, & P. F. Fox (Eds.), *Reference Module in Food Science* (2nd ed., pp. 153-159). Academic Press.
- Garvey, M., & Rowan, N. (2019). Pulsed UV as a potential surface sanitizer in food production processes to ensure consumer safety. *Current Opinion in Food Science*, 26, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.003>
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 573-591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7187>
- Gattinger, A., Ruser, R., Schloter, M., & Munch, J. (2002). Microbial community structure varies in different soil zones of a potato field. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, 421-428. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200208\)165:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-N)
- Ge, J., Kang, J., & Ping, W. (2019). Effect of Acetic Acid on Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1341-1348. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05060>
- Ghazaryan, L., Giladi, I., & Gillor, O. (2019). The effects of colicin production rates on allelopathic interactions in *escherichia coli* populations. *Microorganisms*, 7(11), 564-564. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110564>
- Ghosh, A. R. (2013). Appraisal of Microbial Evolution to Commensalism and Pathogenicity in Humans. *Clinical Medicine Insights. Gastroenterology*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.4137/CGast.S11858>

- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833-845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- Giard, J. C., Rince, A., Capiiaux, H., Auffray, Y., & Hartke, A. (2000). Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4512-4520. <https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4512-4520.2000>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5778), 1355-1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., & Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5053-5065. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5053-5065.2000>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>
- Gorter, F. A., Tabares-Mafla, C., Kassen, R., & Schoustra, S. E. (2021). Experimental Evolution of Interference Competition. *Frontiers in Microbiology*, 12, 613450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.613450>
- Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., López Aguayo, M. del C., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706-22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 93, 1040-1042.
- Grover, M., Ali, Sk. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 99-109. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00145.x>
- Guo, J. H., Liu, X. J., Zhang, Y., Shen, J. L., Han, W. X., Zhang, W. F., Christie, P., Goulding, K. W. T., Vitousek, P. M., & Zhang, F. S. (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 1008-1010. <https://doi.org/10.1126/science.1182570>
- Gupta, A., Gupta, R., & Singh, R. L. (2017). Microbes and Environment. En R. L. Singh (Ed.), *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future* (pp. 43-84). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4_3
- Gupta, R. K., Abrol, I. P., Finkl, C. W., Kirkham, M. B., Arbestain, M. C., Macías, F., Chesworth, W., Germida, J. J., Loeppert, R. H., Cook, M. G., Schwab, G. O., Konstankiewicz, K., Pytko, J., Oertli, J. J., Singer, A., Edmonds, W. J., & Feng, Y. (2008). Soil Microbiology. En W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 673-678). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_544
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013, e329121. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Gustavson, K., Garde, K., Wängberg, S.-Å., & Selmer, J.-S. (2000). Influence of UV-B radiation on bacterial activity in coastal waters. *Journal of Plankton Research*, 22(8), 1501-1511. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.8.1501>

- Hacker, C., Christ, N. A., Duchardt-Ferner, E., Korn, S., Göbl, C., Berninger, L., Düsterhus, S., Hellmich, U. A., Madl, T., Kötter, P., Entian, K.-D., & Wöhnert, J. (2015). The Solution Structure of the Lantibiotic Immunity Protein NisI and Its Interactions with Nisin. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28869-28886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.679969>
- Häder, D.-P., E. Williamson, C., Wängberg, S.-Å., Rautio, M., C. Rose, K., Gao, K., Walter Helbling, E., P. Sinha, R., & Worrest, R. (2015). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 108-126. <https://doi.org/10.1039/C4PP90035A>
- Hall, A. B., Tolonen, A. C., & Xavier, R. J. (2017). Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nature Reviews. Genetics*, 18(11), 690-699. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.63>
- Hammer, T. J., & Moran, N. A. (2019). Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783), 20190068. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0068>
- Hammerum, A. M. (2012). *Enterococci* of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 619-625. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x>
- Hanson, C. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., & Martiny, J. B. H. (2012). Beyond biogeographic patterns: Processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2795>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365(20). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
- Hayaloglu, A. A. (2016). Cheese: Microbiology of Cheese. En *Reference Module in Food Science* (3rd Edition, pp. 225-237). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00675-2>
- Heim, S., Del Mar Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C. A., & Canepari, P. (2002). The Viable but Nonculturable State and Starvation Are Different Stress Responses of *Enterococcus faecalis*, as Determined by Proteome Analysis. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6739-6745. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6739-6745.2002>
- Heng, N. C. K., Ragland, N. L., Swe, P. M., Baird, H. J., Inglis, M. A., Tagg, J. R., & Jack, R. W. (2006). Dysgalacticin: A novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 7), 1991-2001. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28823-0>
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. En M. A. Riley & M. A. Chavan (Eds.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (pp. 45-92). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_4
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E., & Rul, F. (2009). Postgenomic Analysis of *Streptococcus thermophilus* Cocultivated in Milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2062-2073. <https://doi.org/10.1128/AEM.01984-08>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: Physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in Microbiology*, 152(3), 205-210. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01193-7)
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., & O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, 49(4), 905-918. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x>

- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), 878-887. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.019>
- Højer, E., Janzen, T., Rattray, F., Sørensen, K., Børsting, M. W., Brockmann, E., & Johansen, E. (2010). The Production, Application and Action of Lactic Cheese Starter Cultures. En B. A. Law & A. Y. Tamime (Eds.), *Technology of Cheesemaking* (pp. 166-192). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch5>
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22, 283-307. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
- Hu, C.-B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a Novel Two-Peptide Bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, Has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from Those of Its Component Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4542-4545. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264-09>
- Hu, X., Mao, R., Zhang, Y., Teng, D., Wang, X., Xi, D., Huang, J., & Wang, J. (2014). Biotechnical paving of recombinant enterocin A as the candidate of anti-*Listeria* agent. *BMC Microbiology*, 14(220), 1471-2180. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0220-8>
- Hu, Y., Zhang, L., Wen, R., Chen, Q., & Kong, B. (2022). Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2741-2755. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1858269>
- Inoue, T., Tomita, H., & Ike, Y. (2006). Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1202-1212. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1202-1212.2006>
- Irlinger, F., Helinck, S., & Jany, J. L. (2017). Chapter 11—Secondary and Adjunct Cultures. En P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 273-300). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00011-9>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Ishibashi, N., Himeno, K., Masuda, Y., Perez, R. H., Iwatani, S., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2014). Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6647-6655. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-14>
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., & Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: Microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural Product Reports*, 35(5), 434-454. <https://doi.org/10.1039/C7NP00051K>
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, 63(4), 559-566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Jang, S., & Kikuchi, Y. (2020). Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Current Opinion in Insect Science*, 41, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.06.004>
- Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I., & Nissen-Meyer, J. (2005). 1.6-Angstroms crystal structure of EntA-im. A bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19045-19050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501386200>
- Johnson, D. (2003). Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. *Research in Microbiology*, 154(5), 315-320. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00078-0)

- Joosten, H. M. L. J., Nuñez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Marugg, J. D. (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4220-4223. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4220-4223.1996>
- Kang, J. H., & Lee, M. S. (2005). Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1169-1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02556.x>
- Kao, P. H. N., & Kline, K. A. (2019). Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), 2932-2945. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.030>
- Kaukas, A., Hinton, M., & Linton, A. H. (1987). The effect of ampicillin and tylosin on the faecal enterococci of healthy young chickens. *Journal of Applied Bacteriology*, 62(5), 441-447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02674.x>
- Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., & Sameshima, T. (2002). Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3830-3840. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3830-3840.2002>
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2003). Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5839-5848. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5839-5848.2003>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418, 171-174. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1-13.
- Khan, H., Flint, S. h., & Yu, P.-L. (2013). Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 484-494. <https://doi.org/10.1111/jam.12240>
- Kim, W., Racimo, F., Schluter, J., Levy, S. B., & Foster, K. R. (2014). Importance of positioning for microbial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), E1639-E1647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323632111>
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-G)
- Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25(9), 1405-1414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.021>
- Klein, C., & Entian, K. D. (1994). Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2793-2801. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2793-2801.1994>
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., & Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-493. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655>
- Kodera, S. M., Das, P., Gilbert, J. A., & Lutz, H. L. (2022). Conceptual strategies for characterizing interactions in microbial communities. *IScience*, 25(2), 103775. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103775>
- Kongo, J. M. (2013). Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. En *Lactic Acid Bacteria—R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55937>
- Kouzuma, A., Kato, S., & Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: Recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in Microbiology*, 6, 477.
- Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2014). Microbial Ecology Pushes Frontiers in Biotechnology. *Microbes and Environments*, 29(1), 1-3. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME2901rh>

- Kristich, C. J., Rice, L. B., Arias, C. A., Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. En *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* (pp. 123-184). Eye and Ear Infirmary.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Kumar, V. B. N., Kampe, B., Rösch, P., & Popp, J. (2015). Characterization of carotenoids in soil bacteria and investigation of their photodegradation by UVA radiation via resonance Raman spectroscopy. *The Analyst*, 140(13), 4584-4593. <https://doi.org/10.1039/c5an00438a>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lahou, E., & Uyttendaele, M. (2017). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments. *Food Control*, 76, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.033>
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegård, M., & Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry*, 111, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.015>
- Langenheder, S., & Jürgens, K. (2001). Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*, 46(1), 121-134. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.1.0121>
- Layton, B. A., Walters, S. P., Lam, L. H., & Boehm, A. B. (2010). *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 539-547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x>
- Le Quéré, C., Andrew, R. M., Friedlingstein, P., Sitch, S., Pongratz, J., Manning, A. C., Korsbakken, J. I., Peters, G. P., Canadell, J. G., Jackson, R. B., Boden, T. A., Tans, P. P., Andrews, O. D., Arora, V. K., Bakker, D. C. E., Barbero, L., Becker, M., Betts, R. A., Bopp, L., ... Zhu, D. (2018). Global Carbon Budget 2017. *Earth System Science Data*, 10(1), 405-448. <https://doi.org/10.5194/essd-10-405-2018>
- Lebreton, F., Willems, R. J. L., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. En M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
- LeRoux, M., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2015). Bacterial danger sensing. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3744-3753. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.018>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Levin, B. R., Antonovics, J., Sharma, H., Clarke, B. C., Partridge, L., Robertson, A., Clarke, B. C., & Partridge, L. (1988). Frequency-dependent selection in bacterial populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 319(1196), 459-472. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0059>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.-B., Valence, F., Coton, E., & Thierry, A. (2019). Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. *Food Chemistry*, 301, 125260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>
- Li, L., Wu, H., Gestel, C., Peijnenburg, W., & Allen, H. (2014). Soil acidification increases metal extractability and bioavailability in old orchard soils of Northeast Jiaodong Peninsula in China. *Environmental Pollution*, 188, 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.003>

- Licitra, G., Ogier, J. C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T. M., Falentin, H., Madec, M. N., Carpino, S., & Lortal, S. (2007). Variability of bacterial biofilms of the «tina» wood vats used in the ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6980-6987. <https://doi.org/10.1128/AEM.00835-07>
- Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., & Stackebrandt, E. (1997). Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. En J. D. van Elsas, J. T. Trevors, & E. M. H. Wellington (Eds.), *Modern soil microbiology*. (pp. 375-439). Marcel Dekker Inc. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19971913420>
- Little, A. E. F., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2008). Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 375-401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Liu, C., Fu, X., Liu, L., Ren, X., Chau, C. K. L., Li, S., Xiang, L., Zeng, H., Chen, G., Tang, L.-H., Lenz, P., Cui, X., Huang, W., Hwa, T., & Huang, J.-D. (2011). Sequential establishment of stripe patterns in an expanding cell population. *Science*, 334(6053), 238-241. <https://doi.org/10.1126/science.1209042>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Chapter 11—Microbial Enzymes of Use in Industry. En G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 267-298). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104>
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., & Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(3), 455-476. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7171-2>
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7)
- Ma, S. K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W., & Sheldon, R. A. (2010). A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chemistry*, 12(1), 81-86. <https://doi.org/10.1039/B919115C>
- MacLean, R. C., & Gudelj, I. (2006). Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature*, 441(7092), Art. 7092. <https://doi.org/10.1038/nature04624>
- Mahrous, H., Bayoume, A., AbdEl-Mongy, M., el-batal, A., & Hamza, H. (2013). Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of *Lactobacillus spp.* Isolated from Some Dairy Products under Different Culture Conditions. *Food and Nutrition Sciences*, 04, 342-356. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.43045>
- Maisnier-Patin, S., Forni, E., & Richard, J. (1996). Purification, partial characterisation and mode of action of enterococin EFS2, an antilisterial bacteriocin, produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 255-270. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00950-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00950-6)
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., & Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: The role of bacteriocins. *ISME Journal*, 5, 71-81. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.90>
- Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., & Gillor, O. (2013). The Weak Shall Inherit: Bacteriocin-Mediated Interactions in Bacterial Populations. *PLoS ONE*, 8(5), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063837>

- Maksimova, Yu. G. (2014). Microbial biofilms in biotechnological processes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(8), 750-760. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080043>
- Maky, M. A., Ishibashi, N., Zendo, T., Perez, R. H., Doud, J. R., Karmi, M., & Sonomoto, K. (2015). Enterocin F4-9, a Novel O-Linked Glycosylated Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4819-4826. <https://doi.org/10.1128/AEM.00940-15>
- Maldonado-Barragán, A., & West, S. A. (2020). The cost and benefit of quorum sensing-controlled bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(1), 101-111. <https://doi.org/10.1111/jeb.13551>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205-211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M., Sanchez-Barrena, M., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., & Valdivia, E. (2004). Peptide AS-48: Prototype of a New Class of Cyclic Bacteriocins. *Current Protein & Peptide Science*, 5(5), 399-416. <https://doi.org/10.2174/1389203043379567>
- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 2-22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x>
- Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., & Maqueda, M. (1990). A transferable plasmid associated with AS-48 production in enterococcus faecalis. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2817-2818. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2817-2818.1990>
- Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., & Maqueda, M. (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 27(2), 347-358. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00682.x>
- Martinez-Guryn, K., Leone, V., & Chang, E. B. (2019). Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell host & microbe*, 26(3), 314-324. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.011>
- Martino, C., Dilmore, A. H., Burcham, Z. M., Metcalf, J. L., Jeste, D., & Knight, R. (2022). Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nature Reviews Microbiology*, 20(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00768-z>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- Martin-Visscher, L. A., Sprules, T., Gursky, L. J., & Vederas, J. C. (2008). Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of PisI, a Group B Immunity Protein that Provides Protection Against the Type IIa Bacteriocin Piscicolin 126, PisA. *Biochemistry*, 47(24), 6427-6436. <https://doi.org/10.1021/bi8004076>
- McSweeney, P. L. H. (Ed.). (2007). The microbiology of cheese ripening. En *Cheese Problems Solved* (pp. 117-132). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.117>
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2004). Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. En P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *General Aspects* (Vol. 1, pp. 361-371). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80074-5](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80074-5)
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., & Ciocia, F. (2017). Chapter 16—Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. En P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 411-421). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00016-8>

- Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(10), 1221-1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Cebrián, R., & Maqueda, M. (2012). Discovering the Bacterial Circular Proteins: Bacteriocins, Cyanobactins, and Pilins. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27007-27013. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.354688>
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 1205-1220. <https://doi.org/10.2174/138920111796117364>
- Moran, M. A. (2015). The global ocean microbiome. *Science*, 350(6266), aac8455. <https://doi.org/10.1126/science.aac8455>
- Morris, A., Meyer, K., & Bohannan, B. (2020). Linking microbial communities to ecosystem functions: What we can learn from genotype-phenotype mapping in organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 375(1798), 20190244. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0244>
- Mortaz, E., Adcock, I. M., Folkerts, G., Barnes, P. J., Paul Vos, A., & Garssen, J. (2013). Probiotics in the Management of Lung Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2013, 751068. <https://doi.org/10.1155/2013/751068>
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>
- Müller, E., & Radler, F. (1993). Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiologica*, 38(6), 441-446. <https://doi.org/10.1007/BF02814392>
- Müller, T., Ulrich, A., Ott, E. M., & Müller, M. (2001). Identification of plant-associated *enterococci*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 268-278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>
- Murase, J., Noll, M., & Frenzel, P. (2006). Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5436-5444. <https://doi.org/10.1128/AEM.00207-06>
- Mushegian, A. A., & Ebert, D. (2016). Rethinking “mutualism” in diverse host-symbiont communities. *BioEssays*, 38(1), 100-108. <https://doi.org/10.1002/bies.201500074>
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(4), 267-285. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Nam, J. H., Cho, Y. S., Rackerby, B., Goddik, L., & Park, S. H. (2021). Shifts of microbiota during cheese production: Impact on production and quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2307-2318. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5>
- Narisawa, N., Haruta, S., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2008). Coexistence of Antibiotic-Producing and Antibiotic-Sensitive Bacteria in Biofilms Is Mediated by Resistant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3887-3894. <https://doi.org/10.1128/AEM.02497-07>
- Nascimento, J. D. S., Coelho, M. L. V., Ceotto, H., Potter, A., Fleming, L. R., Salehian, Z., Nes, I. F., & Bastos, M. do C. de F. (2012). Genes involved in immunity to and secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *Journal of Bacteriology*, 194(4), 875-883. <https://doi.org/10.1128/JB.06203-11>
- Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Švec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., & Swings, J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 5), 2177-2182.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63752-0>
- Nes, F. I., Kjos, M., & Diep, D. (2011). Antimicrobial Components of Lactic Acid Bacteria. En S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (4th ed., pp. 285-329). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/b11503-16>
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 113-128.
<https://doi.org/10.1007/BF00395929>
- Nes, I. F., Diep, D. B., & Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189, 1189-1198.
<https://doi.org/10.1128/JB.01254-06>
- Nes, I. F., & Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 100-104.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.02.001>
- Ness, I. F., Diep, D. B., & Ike, Y. (2014). Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. En M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>
- Neumann, G., & Schuster, S. (2007). Continuous model for the rock-scissors-paper game between bacteriocin producing bacteria. *Journal of Mathematical Biology*.
<https://doi.org/10.1007/s00285-006-0065-3>
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14-49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- N'Guessan, A. L., Vrionis, H. A., Resch, C. T., Long, P. E., & Lovley, D. R. (2008). Sustained Removal of Uranium From Contaminated Groundwater Following Stimulation of Dissimilatory Metal Reduction. *Environmental Science & Technology*, 42(8), 2999-3004. <https://doi.org/10.1021/es071960p>
- Nguyen, J., Lara-Gutiérrez, J., & Stocker, R. (2021). Environmental fluctuations and their effects on microbial communities, populations and individuals. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4), fuaa068. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa068>
- Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2003). Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2975-2984. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003>
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2010). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 52-60. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 19-37. <https://doi.org/10.2174/138920109787048661>
- Noordman, W. h., Reissbrodt, R., Bongers, R. s., Rademaker, J. l. w., Bockelmann, W., & Smit, G. (2006). Growth stimulation of *Brevibacterium sp.* by siderophores. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 637-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02928.x>
- Ogaki, M. B., Rocha, K. R., Terra, M. R., Furlaneto, M. C., & Furlaneto-Maia, L. (2016). Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1026-1034.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09020>
- Ogier, J. C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>

- Ogunbanwo, S., Sanni, A. & Onilude, A. Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 51–56 (2004).
<https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013311.43842.74>
- Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., & Olasehinde, G. I. (2020). The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International Journal of Microbiology*, 2020, e8045646. <https://doi.org/10.1155/2020/8045646>
- Okuda, K., Yanagihara, S., Sugayama, T., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Functional Significance of the E Loop, a Novel Motif Conserved in the Lantibiotic Immunity ATP-Binding Cassette Transport Systems. *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2801-2808. <https://doi.org/10.1128/JB.00003-10>
- O'Malley, M. A., & Dupré, J. (2007). Size doesn't matter: Towards a more inclusive philosophy of biology. *Biology & Philosophy*, 22(2), 155-191. <https://doi.org/10.1007/s10539-006-9031-0>
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 56-63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2023). *FAOSTAT statistical database*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2022). The Role of Beneficial Microorganisms in Soil Quality and Plant Health. *Sustainability*, 14(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/su14095358>
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 189-205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>
- O'Shea, E. F., O'Connor, P. M., Raftis, E. J., O'Toole, P. W., Stanton, C., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2011). Production of Multiple Bacteriocins from a Single Locus by Gastrointestinal Strains of *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6973-6982. <https://doi.org/10.1128/JB.06221-11>
- Osmanagaoglu, O., & Kiran, F. (2011). Evidence for a chromosomally determined mesenterocin, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* OZ. *Journal of Basic Microbiology*, 51(3), 279-288.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201000240>
- Ott, E. M., Müller, T., Müller, M., Franz, C. M., Ulrich, A., Gabel, M., & Seyfarth, W. (2001). Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 54-66.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01334.x>
- Ottesen, E. A., Young, C. R., Gifford, S. M., Eppley, J. M., Marin, R., Schuster, S. C., Scholin, C. A., & DeLong, E. F. (2014). Multispecies diel transcriptional oscillations in open ocean heterotrophic bacterial assemblages. *Science*, 345(6193), 207-212.
<https://doi.org/10.1126/science.1252476>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Panagiota Florou-Paneri. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. En Efterpi Christaki (Ed.), *Lactic Acid Bacteria* (p. Ch. 25). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/47766>
- Parente, E., Cogan, T. M., & Powell, I. B. (2017). Chapter 8 - Starter Cultures: General Aspects. En P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 201-226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Paul, K. I., Polglase, P. J., O'Connell, A. M., Carlyle, J. C., Smethurst, P. J., & Khanna, P. K. (2003). Defining the relation between soil water content and net nitrogen mineralization. *European Journal of Soil Science*, 54(1), 39-48.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00502.x>

- Pereira, P. (2020). Ecosystem services in a changing environment. *The Science of the Total Environment*, 702, 135008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135008>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02085>
- Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms*, 9(10), 2107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102107>
- Peterson, S. B., Dunn, A. K., Klimowicz, A. K., & Handelsman, J. (2006). Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalism with rhizosphere bacteria from the Cytophaga-*Flavobacterium* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5421-5427. <https://doi.org/10.1128/AEM.02928-05>
- Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2012). Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology*, 7, 99-122. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421>
- Piggot, A. M., Klaus, J. S., Johnson, S., Phillips, M. C., & Solo-Gabriele, H. M. (2012). Relationship between Enterococcal Levels and Sediment Biofilms at Recreational Beaches in South Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 5973-5982. <https://doi.org/10.1128/AEM.00603-12>
- Pomeroy, L. R., leB. WILLIAMS, P. J., Azam, F., & Hobbie, J. E. (2007). The Microbial Loop. *Oceanography*, 20(2), 28-33.
- Possas, A., Bonilla-Luque, O. M., & Valero, A. (2021). From Cheese-Making to Consumption: Exploring the Microbial Safety of Cheeses through Predictive Microbiology Models. *Foods*, 10(2), 355. <https://doi.org/10.3390/foods10020355>
- Preidis, G. A., Saulnier, D. M., Blutt, S. E., Mistretta, T.-A., Riehle, K. P., Major, A. M., Venable, S. F., Finegold, M. J., Petrosino, J. F., Conner, M. E., & Versalovic, J. (2012). Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. *The FASEB Journal*, 26(5), 1960-1969. <https://doi.org/10.1096/fj.10-177980>
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), Art. 18. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190>
- Raina, J.-B., Eme, L., Pollock, F. J., Spang, A., Archibald, J. M., & Williams, T. A. (2018). Symbiosis in the microbial world: From ecology to genome evolution. *Biology Open*, 7(2), bio032524. <https://doi.org/10.1242/bio.032524>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., & Kim, S.-H. (2022). Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), 14-40. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>
- Ran, Q., Badgley, B. D., Dillon, N., Dunny, G. M., & Sadowsky, M. J. (2013). Occurrence, genetic diversity, and persistence of *enterococci* in a Lake Superior watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 3067-3075. <https://doi.org/10.1128/AEM.03908-12>
- Rautava, S., Arvilommi, H., & Isolauri, E. (2006). Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatric Research*, 60(2), 221-224. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000228317.72933.db>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Reuben, R. C., Langer, D., Eisenhauer, N., & Jurburg, S. D. (2023). Universal drivers of cheese microbiomes. *IScience*, 26(1), 105744. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105744>
- Richter, R., & Vedamuthu, E. (2001). Milk and Milk Products. En F. P. Downes & K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods* (4th ed., pp. 483-495). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/9780875531755ch47>

- Rietz, D. N., & Haynes, R. J. (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 845-854. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00125-1)
- Riley, M. A. (2011). Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities. En D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* (pp. 13-26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_2
- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., & Kristiansen, P. E. (2008). Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1784(3), 543-554. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.12.002>
- Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2013). Vancomycin-resistant *enterococci*. *Critical Care Clinics*, 29(4), 841-852. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.06.006>
- Ruiz-Barba, J. L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A., & Jiménez-Díaz, R. (2007). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid*, 57(2), 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.06.003>
- Ruiz-Rodríguez, M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Valdivia, E., & Soler, J. J. (2013). Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 495-502. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12138>
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014). Type VI secretion system effectors: Poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
- Sánchez Hidalgo, M., Montalbán López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: Close to perfection. *Cellular and Molecular Life Science*, 68, 2845-2857.
- Sánchez-Barrena, M. J., Martínez-Ripoll, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V., & Albert, A. (2003). Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state. *Journal of Molecular Biology*, 334, 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.060>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), Art. 10. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1970). Microbially induced flavors and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(4), 557-562. <https://doi.org/10.1021/jf60170a023>
- Sassoubre, L. M., Ramsey, M. M., Gilmore, M. S., & Boehm, A. B. (2014). Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* to sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 130, 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.12.013>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>

- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(2), 262-280. <https://doi.org/10.1128/membr.61.2.262-280.1997>
- Schluter, J., Nadell, C. D., Bassler, B. L., & Foster, K. R. (2015). Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME Journal*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.174>
- Schwan, R. F., & Ramos, C. L. (2014). Role of Microbes and Their Diversity in Fermented Foods. En *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (1st Edition, pp. 524-547). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17912-33>
- Sedláček, I., Holochová, P., Mašláňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., & Švec, P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. Nov. And *Enterococcus rotai* sp. Nov., two urease-producing enterococci from the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 2), 502-510. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.041152-0>
- Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, 135(3), 1411-1418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.025>
- Shade, A., Jones, S. E., Caporaso, J. G., Handelsman, J., Knight, R., Fierer, N., & Gilbert, J. A. (2014). Conditionally Rare Taxa Disproportionately Contribute to Temporal Changes in Microbial Diversity. *mBio*, 5(4), e01371-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01371-14>
- Sharma, I. (2020). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. En *Trace Metals in the Environment—New Approaches and Recent Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90453>
- Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: From Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997-5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Gonçalves, A., Felgar, A. C., Pacheco, R., Gonçalves, D., Cunha, R., & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 40(5), 473-479. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.599061>
- Simmonds, R. S., Pearson, L., Kennedy, R. C., & Tagg, J. R. (1996). Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4536-4541. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4536-4541.1996>
- Singh, B. K. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.006>
- Singh, R., Singh, P., & Sharma, R. (2014). Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4, 1-6.
- Singh, S., & Bajaj, B. K. (2016). Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(7), 717-724. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455>
- Skaugen, M., Cintas, L. M., & Nes, I. F. (2003). Genetics of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria. En B. J. B. Wood & P. J. Warner (Eds.), *Genetics of Lactic Acid Bacteria* (pp. 225-260). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0191-6_8
- Smits, S. H. J., Schmitt, L., & Beis, K. (2020). Self-immunity to antibacterial peptides by ABC transporters. *FEBS Letters*, 594(23), 3920-3942. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13953>

- Snider, J. R., Goin, C., Miller, R., Boston, P. J., & Northup, D. (2009). Ultraviolet Radiation Sensitivity in Cave Bacteria: Evidence of Adaptation to the Subsurface? *International Journal of Speleology*, 38. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.38.1.2>
- Song, M., Wu, D., Hu, Y., Luo, H., & Li, G. (2021). Characterization of an *Enterococcus faecalis* Bacteriophage vB_EfaM_LG1 and Its Synergistic Effect With Antibiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.698807>
- Song, T., Liang, Q., Du, Z., Wang, X., Chen, G., Du, Z., & Mu, D. (2022). Salinity Gradient Controls Microbial Community Structure and Assembly in Coastal Solar Salterns. *Genes*, 13(2), 385. <https://doi.org/10.3390/genes13020385>
- Sorensen, P. O., Germino, M. J., & Feris, K. P. (2013). Microbial community responses to 17 years of altered precipitation are seasonally dependent and coupled to co-varying effects of water content on vegetation and soil C. *Soil Biology and Biochemistry*, 64, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.04.014>
- Sprules, T., Kawulka, K. E., & Vederas, J. C. (2004). NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*, 43(37), 11740-11749. <https://doi.org/10.1021/bi048854+>
- Staley, C., Reckhow, K. H., Lukasik, J., & Harwood, V. J. (2012). Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. *Water Research*, 46(17), 5799-5812. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.012>
- Steele, J. A., Countway, P. D., Xia, L., Vigil, P. D., Beman, J. M., Kim, D. Y., Chow, C.-E. T., Sachdeva, R., Jones, A. C., Schwalbach, M. S., Rose, J. M., Hewson, I., Patel, A., Sun, F., Caron, D. A., & Fuhrman, J. A. (2011). Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *The ISME Journal*, 5(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.24>
- Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I., & Entian, K.-D. (2003). Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes nisI and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 89-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207237200>
- Straume, D., Kjos, M., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2007). Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 278(3), 283-293. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0251-z>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C., & Straight, P. D. (2016). Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
- Sun, F., Chen, J., Liu, K., Tang, M., & Yang, Y. (2022). The avian gut microbiota: Diversity, influencing factors, and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.934272>
- Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., & Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. Nov. And *Enterococcus termitis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 3), 577-581. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63937-0>
- Szatraj, K., Szczepankowska, A. K., & Chmielewska-Jeznach, M. (2017). Lactic acid bacteria — promising vaccine vectors: Possibilities, limitations, doubts. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 325-339. <https://doi.org/10.1111/jam.13446>
- Tanaka, N., Traisman, E., Plantinga, P., Finn, L., Flom, W., Meske, L., & Guggisberg, J. (1986). Evaluation of Factors Involved in Antibotulinal Properties of Pasteurized Process Cheese Spreads. *Journal of Food Protection*, 49(7), 526-531. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.7.526>

- Teixeira, L., Carvalho, M. da gloria, Facklam, R., & Shewmaker, P. (2015). *Enterococcus* (pp. 403-421). <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch23>
- Teixeira, L. M., & Merquior, V. L. C. (2013). *Enterococcus*. En I. de Filippis & M. L. McKee (Eds.), *Molecular Typing in Bacterial Infections* (pp. 17-26). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-185-1_2
- ter Beek, J., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*, 143(4), 419-435. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>
- Thakur, M., Medintz, I. L., & Walper, S. A. (2019). Enzymatic Bioremediation of Organophosphate Compounds-Progress and Remaining Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 289. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00289>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research*, 161(2), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.006>
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., & Ike, Y. (1997). Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *Journal of Bacteriology*, 179, 7843-7855. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7843-7855.1997>
- Torres-Henderson, C., Summers, S., Suchodolski, J., & Lappin, M. R. (2017). Effect of *Enterococcus Faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats Administered Amoxicillin-Clavulanate. *Topics in Companion Animal Medicine*, 32(3), 104-108. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2017.11.002>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the Human Microbiome. *Nutrition reviews*, 70(Suppl 1), S38-S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., & Vederas, J. C. (2010). Cloning and Characterization of the Gene Cluster Involved in the Production of the Circular Bacteriocin Carnocyclin A. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(4), 218-225. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9056-1>
- Van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., & Vederas, J. C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, 9(8), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.004>
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., & Vederas, J. C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, 19(8), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.004>
- van Groenigen, K. J., Osenberg, C. W., & Hungate, B. A. (2011). Increased soil emissions of potent greenhouse gases under increased atmospheric CO₂. *Nature*, 475(7355), Art. 7355. <https://doi.org/10.1038/nature10176>
- Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2014). Friend Turned Foe: Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. *Annual Review of Microbiology*, 68, 337-356. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113003>
- Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5, 895-911. <https://doi.org/10.3390/toxins5050895>
- Vaughan, A., Eijsink, V. G. H., & van Sinderen, D. (2003). Functional Characterization of a Composite Bacteriocin Locus from Malt Isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7194-7203. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7194-7203.2003>
- Verdaguer, D., Jansen, M. A. K., Llorens, L., Morales, L. O., & Neugart, S. (2017). UV-A radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 255, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.014>

- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Viau, E. J., Goodwin, K. D., Yamahara, K. M., Layton, B. A., Sassoubre, L. M., Burns, S. L., Tong, H.-I., Wong, S. H. C., Lu, Y., & Boehm, A. B. (2011). Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams—Associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Research*, 45(11), 3279-3290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.033>
- Volpato, G., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010). Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 17(32), 3855-3873. <https://doi.org/10.2174/092986710793205435>
- Wachsmann, M. B., Castilla, V., de Ruiz Holgado, A. P., de Torres, R. A., Sesma, F., & Coto, C. E. (2003). Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Research*, 58(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00099-2](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00099-2)
- Waite, D., & Taylor, M. (2015). Exploring the avian gut microbiota: Current trends and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00673>
- Waite, D. W., & Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: Membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, 5, 223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00223>
- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., & Wehrmüller, K. (2008). Cheese in nutrition and health. *Dairy Science & Technology*, 88(4), 389-405. <https://doi.org/10.1051/dst:2008012>
- Wang, M., Noor, S., Huan, R., Liu, C., Li, J., Shi, Q., Zhang, Y.-J., Wu, C., & He, H. (2020). Comparison of the diversity of cultured and total bacterial communities in marine sediment using culture-dependent and sequencing methods. *PeerJ*, 8, e10060. <https://doi.org/10.7717/peerj.10060>
- Wang, Y., Wang, B., Wu, J., Jiang, X., Tang, H., & Nielsen, O. H. (2017). Modulation of Gut Microbiota in Pathological States. *Engineering*, 3(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.013>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wanjugi, P., & Harwood, V. J. (2013). The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. *Environmental Microbiology*, 15(2), 517-526. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02877.x>
- Wayah, S. B., & Philip, K. (2018). Pentocin MQ1: A Novel, Broad-Spectrum, Pore-Forming Bacteriocin From *Lactobacillus pentosus* CS2 With Quorum Sensing Regulatory Mechanism and Biopreservative Potential. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00564>
- Wells, J., & Varel, V. (2011). Symbiosis of plants, animals, and microbes. En W. G. Pond & F. W. Bazer (Eds.), *Animal Welfare in Animal Agriculture: Husbandry, Stewardship, and Sustainability in Animal Production* (pp. 185-203). CRC Press.
- Wemmenhove, E., van Valenberg, H. J. F., van Hooijdonk, A. C. M., Wells-Bennik, M. H. J., & Zwietering, M. H. (2018). Factors that inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in nature-ripened Gouda cheese: A major role for undissociated lactic acid. *Food Control*, 84, 413-418. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.028>
- Wienemann, T., Schmitt-Wagner, D., Meuser, K., Segelbacher, G., Schink, B., Brune, A., & Berthold, P. (2011). The bacterial microbiota in the ceca of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) differs between wild and captive birds. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(7), 542-551. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.06.003>
- Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7, 14. <https://doi.org/10.12703/P7-14>

- Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., & Prescott, L. M. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology / Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton* (7th ed.). McGraw-Hill.
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., & Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, *158*(2), 422-433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2013). Towards an Ecosystem Approach to Cheese Microbiology. *Microbiology Spectrum*, *1*(1), 1.1.14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0012-12>
- Wong, V. N. L., Dalal, R. C., & Greene, R. S. B. (2008). Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. *Biology and Fertility of Soils*, *44*(7), 943-953. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0279-1>
- Wong, V. N. L., Greene, R. S. B., Dalal, R. C., & Murphy, B. W. (2010). Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: A review. *Soil Use and Management*, *26*(1), 2-11. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2009.00251.x>
- Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., & Zhang, X. (2022). Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules*, *27*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/molecules27072258>
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., & Okazaki, M. (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(10), 5746-5753. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5546-5553.2003>
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, *3*(4), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, *8*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yang, J., Jiang, H., Dong, H., & Liu, Y. (2019). A comprehensive census of lake microbial diversity on a global scale. *Science China Life Sciences*, *62*(10), 1320-1331. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9525-9>
- Yap, M., Ercolini, D., Álvarez-Ordóñez, A., O'Toole, P. W., O'Sullivan, O., & Cotter, P. D. (2022). Next-Generation Food Research: Use of Meta-Omic Approaches for Characterizing Microbial Communities Along the Food Chain. *Annual Review of Food Science and Technology*, *13*(1), 361-384. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-052720-010751>
- Yarwood, S. A. (2021). 10—Microbial ecology. En T. J. Gentry, J. J. Fuhrmann, & D. A. Zuberer (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology (Third Edition)* (Third Edition, pp. 239-267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00010-1>
- Yuan, B.-C., Li, Z.-Z., Liu, H., Gao, M., & Zhang, Y.-Y. (2007). Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. *Applied Soil Ecology*, *35*(2), 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.07.004>
- Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., Kim, J.-Y., Shin, N.-R., Kim, S.-H., Lee, W.-J., & Bae, J.-W. (2014). Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(17), 5254-5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zapién-Campos, R., Olmedo-Álvarez, G., & Santillán, M. (2015). Antagonistic interactions are sufficient to explain self-assembly of bacterial communities in a homogeneous environment: A computational modeling approach. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 489. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00489>
- Zhang, R., Weinbauer, M. G., & Qian, P.-Y. (2007). Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters.

- Environmental Microbiology*, 9(12), 3008-3018. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01410.x>
- Zhang, T., Zhang, Y., Li, L., Jiang, X., Chen, Z., Zhao, F., & Yi, Y. (2022b). Biosynthesis and Production of Class II Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Fermentation*, 8, 217. <https://doi.org/10.3390/fermentation8050217>
- Zhang, W., Wang, C., Xue, R., & Wang, L. (2019). Effects of salinity on the soil microbial community and soil fertility. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1360-1368. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62077-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62077-5)
- Zhang, Y., Ding, Y., & Guo, Q. (2022a). Probiotic Species in the Management of Periodontal Diseases: An Overview. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.806463>
- Zhao, Y., Zeng, Y., Zeng, D., Wang, H., Zhou, M., Sun, N., Xin, J., Khalique, A., Rajput, D. S., Pan, K., Shu, G., Jing, B., & Ni, X. (2021). Probiotics and MicroRNA: Their Roles in the Host–Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.604462>
- Zheng, Y., Ji, N.-N., Wu, B.-W., Wang, J.-T., Hu, H.-W., Guo, L.-D., & He, J.-Z. (2020). Climatic factors have unexpectedly strong impacts on soil bacterial β -diversity in 12 forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107699. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107699>
- Zhong, Z.-P., Liu, Y., Miao, L.-L., Wang, F., Chu, L.-M., Wang, J.-L., & Liu, Z.-P. (2016). Prokaryotic Community Structure Driven by Salinity and Ionic Concentrations in Plateau Lakes of the Tibetan Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1846-1858. <https://doi.org/10.1128/AEM.03332-15>
- Zhu, L., Zeng, J., & Wang, J. (2022). Structural Basis of the Immunity Mechanisms of Pediocin-like Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(13), e00481-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00481-22>
- Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed Research International*, 2018, 5063185. <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>
- Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., & Noskova, S. (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics*, 9(9), 553. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>
- Zinger, L., Gobet, A., & Pommier, T. (2012). Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*, 21(8), 1878-1896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05362.x>

CAPÍTULO II. Materiales y Métodos

1. Medios de cultivo

La composición de todos los medios de cultivo utilizados se expresa en gramos por litro de agua destilada o tampón, a excepción de que se indique lo contrario. Cuando fue preciso el uso de medios sólidos se adicionó agar al 1,5 % (p/v). Los medios se esterilizaron en autoclave siguiendo las instrucciones de la casa comercial, de forma general fue a 121 °C durante 15 min.

1.1. Medios de crecimiento y producción de bacteriocinas

- **Medio Tryptic Soy Broth (TSB)**

Este medio se utilizó tanto en caldo (TSB) como en sólido (TSA). En ambos casos el medio (Tabla II.1) fue empleado para el crecimiento de la mayoría de microorganismos usados. En el caso de las cepas mutantes Tn5 se adicionó, tras el autoclavado, cloranfenicol (20 µg/ml). Este antibiótico selecciona a los mutantes que llevan insertado el gen de resistencia al cloranfenicol, evitando el crecimiento de otras posibles bacterias.

Tabla II.1. Composición general del medio de cultivo TSB.

Compuesto	Concentración
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soja	3,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,5

- **Medio Brain Heart Infusion (BHI)**

El medio se utilizó tanto en forma sólida (BHA) como en caldo (Tabla II.2). para el crecimiento de los enterococos, así como para el crecimiento de las bacterias productoras de bacteriocina en los ensayos de antagonismo.

Tabla II.2. Composición general del medio de cultivo BHI.

Compuesto	Concentración
Infusión de cerebro de ternera	12,5
Infusión de corazón de ternera	5,0
Peptonas	10,0
Glucosas	2,0
Cloruro sódico	5,0
Hidrogenofosfato disódico	2,5

- **Medio Kenner Fecal (KF)**

El presente medio fue empleado en sólido para el crecimiento y aislamiento de cepas de enterococos. Tras su esterilización se adicionó cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TCC) al 1% asépticamente (Tabla II.3).

Tabla II.3. Composición general del medio de cultivo KF.

Compuesto	Concentración
Proteasa peptona	10
Extracto de levadura	10
Cloruro sódico	5
Glicerofosfato sódico	10
Maltosa	20
Lactosa	1
Azida sódica	0,4
Púrpura de bromocresol	0,05

1.2. Medios para ensayo de actividad bacteriana

- **Brain Heart Infusion-Agar (BHA)**

Este medio, además de lo comentado anteriormente, se utilizó como capa base de las placas en los ensayos de producción en medio sólido, así como sobrecapa para inocular la cepa indicadora (Tabla II.5). Se preparó con tampón fosfato 0,1M pH7, y en el caso de la sobrecapa, a la mitad de concentración de lo indicado con anterioridad así como con agar al 0,7%.

- **Mueller-Hinton Agar (MHA)**

El medio Mueller-Hinton se empleó como capa base de las placas de ensayos de actividad antibacteriana de las bacteriocinas purificadas. Se preparó con tampón fosfato 0,1 M pH 7 (Tabla II.4).

Tabla II.4. Composición general del medio de cultivo MHA.

Compuesto	Concentración
Infusión de carne	2,0
Peptonas	17,5
Almidón	1,5

1.3. Medios empleados para la conservación de microorganismos

Las cepas empleadas en esta tesis se conservaron congeladas en glicerol al 20 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y/o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, según necesidad. Para ello, se parte de cultivos en medio líquido con microorganismos en fase logarítmica de crecimiento, para evitar la pérdida de caracteres genéticos que pueden ocurrir debido a las sucesivas resiembras.

1.4. Tampones

El tampón fosfato se utilizó tanto para amortiguar los cambios de pH en los medios de cultivo como para la purificación de bacteriocinas. Se prepararon mezclando diferentes proporciones de solución A (Na_2HPO_4 2M) y solución B (NaH_2PO_4 0,2 M) según pH deseado y completando con agua hasta un volumen final de 1L en caso de ser necesario (Gomori, 1955)

Tampón fosfato sódico 0,2 M pH 7

Se mezclaron 610 ml de la solución A con 390 ml de la solución B para tener un volumen de 1000 ml.

Tampón fosfato sódico 0,02M pH 6,5

Se tomaron 68,5ml de la solución A y 31,5ml de la solución B y se completaron con agua destilada hasta llegar al litro, obteniendo una concentración final de 0,02M.

2. Microorganismos, titulación y aislamiento.

En este trabajo se analizaron 15 quesos elaborados con leche proveniente de 3 animales lecheros diferentes: 5 quesos de leche de oveja, 5 de leche de cabra y 5 de leche de vaca (Tabla II.5).

2.1. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios sólidos

Para el análisis microbiológico se tomaron 5 g de queso en condiciones asépticas que posteriormente fueron homogeneizados durante 2 min en una bolsa estéril de plástico con filtro lateral junto con 45 ml de citrato sódico al 2% precalentado a 37°C . Para la homogeneización se empleó un homogeneizador de paletas (Masticador, IUL Instruments, Barcelona). Para el recuento y aislamiento de enterococos, se tomaron alícuotas de 100 μL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron por triplicado en medio KF. Las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 3 días. De los

enterococos aislados, se seleccionaron 67 cepas utilizadas posteriormente para analizar los efectos de la producción de bacteriocinas en las poblaciones de enterococos.

Tabla II.5. Muestras de quesos analizadas.

ID	Queso	Animal lechero
AM1901QU01	Idiazabal	Oveja
AM1901QU02	Pago de los Vivales	Oveja
AM1902QU03	Pata de Mulo	Oveja
AM1902QU04	Ardi Gazta Ekia	Oveja
AM1902QU05	Comté, queso graso	Vaca
AM1902QU07	Quesería Cortijo Júrtiga	Cabra
AM1902QU08	Quesería 3 RRR	Cabra
AM1902QU09	Granja Maravillas	Vaca
AM1902QU10	Granja Maravillas	Vaca
AM1902QU11	Emmental	Vaca
AM1902QU12	Le moulis	Vaca
AM1903QU14	Las R.R.R.	Cabra
AM1903QU15	Cueva de la Magaha	Cabra
AM1903QU16	Mariscal	Oveja
AM1903QU17	Las Abadías	Cabra

2.2. Microorganismos de colección

Para poner de manifiesto la actividad antimicrobiana en los diferentes ensayos de antagonismo se emplearon diversas cepas de la colección de nuestro laboratorio. De forma general, como cepas indicadoras, se emplearon principalmente las cepas *E. faecalis* S-47, *E. faecalis* JH2-2, y *L. innocua* CECT4030.

Por otro lado, para los experimentos de inmunidad cruzada se utilizó la cepa *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 y una colección de mutantes provenientes de la misma, con diversas mutaciones relacionadas con el *cluster* de genes de la enterocina AS-48. Esta colección de mutantes del laboratorio se construyó mediante inserción del transposón Tn5, y por delección y clonación de fragmentos. En la Tabla II.6 se recoge la colección de mutantes utilizados, las cepas controles y sus características.

El mutante D1Pst1 se construyó mediante digestión con Pst I del plásmido 401-81::Tn5D. Un fragmento de 14 kb fue purificado, religado y utilizado para transformar *E. faecalis* JH2-2, como se describió previamente por Martínez-Bueno et.al., (1998).

Tabla II.6. Mutantes del *cluster* de genes de AS-48 y cepas controles.

Mutante	Construcción	Referencia
JH2-2 (pAM401-81)	grupo de genes <i>as-48ABCC₁DD₁EFGH</i> clonado en el vector pAM401	(Diaz et al., 2003)
D1Pst1 (<i>as-48DEFGH</i> clonado del mutante 401-81::Tn5D1)	<i>as-48D₁EFGH</i>	Presente Tesis
JH2-2 (pAM401-81::Tn5D1-E)	<i>as-48ABCC₁DD₁*EFGH</i>	(Diaz et al., 2003)
JH2-2 (pAM401-81::Tn5C)	<i>as-48ABC*C₁DD₁EFGH</i>	(Fernández et al., 2008)
JH2-2 (pAM401-81::Tn5B)	<i>as-48AB*CC₁DD₁EFGH</i>	(Fernández et al., 2008)
JH2-2 (pAM401-81:: <i>as-48AB-</i>)	<i>as-48CC₁DD₁EFGH</i>	(Diaz et al., 2003)
JH2-2 (pAM401-52)	<i>as-48ABCC₁DD₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5F)	<i>as-48ABCC₁DD₁EF*</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52:: Tn5E)	<i>as-48ABCC₁DD₁E*F</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5D)	<i>as-48ABCC₁D*D₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2(pAM401-52::Tn5B-C 401-52-40)	<i>as-48AB*CC₁DD₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5B)	<i>as-48AB*CC₁DD₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
pAM401-58 (pAM401-52:: <i>as48A-</i>)	<i>as-48BCC₁DD₁EF</i>	(Fernández et al., 2008)
pAM401-64	Transportador ABC clonado en pAM401 <i>as-48CC₁DD₁</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
<i>E. faecalis</i> MRR10-3	Fenotipo salvaje	(Martín-Platero et al., 2006)
<i>E. faecium</i> F58	Fenotipo salvaje	(Achemchem et al., 2006)
<i>E. faecalis</i> A-48-32	Fenotipo salvaje productor de AS-48	(Martínez-Bueno et al., 1990)
JH2-2 (pAM401)	Control negativo	(Wirth et al., 1986)
<i>L. innocua</i> 4030	Fenotipo salvaje, cepa indicadora	CECT ^a
<i>E. faecalis</i> S-47	Fenotipo salvaje, cepa indicadora	(Gálvez et al., 1985)

(*): Tn5 insertado en gen.^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis funcional de las cepas *E. faecalis* MRR10-3, productora de las enterocinas MR10A/B; *E. faecalis* S-48 y *E. faecalis* UGRA10, productoras de la enterocina AS-48. Todas las cepas empleadas se cultivaron en TSA o TSB a 37 °C. En el caso de los mutantes Tn5 se adicionó cloranfenicol (20 µg/mL) para evitar el curado del plásmido durante su crecimiento (Martínez-Bueno et al., 1998).

3. Ensayos de antagonismo microbiano

3.1. Ensayos de producción en medio sólido

Para detectar la producción de bacteriocinas en medio sólido se empleó la técnica de la doble capa (Gratia & Fredericq, 1946), utilizando como medio base BHA-tamponado (BHA-T) a un pH de 7. Sobre esta base se sembraron las estirpes productoras a ensayar y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se cubrieron con 7 ml de sobrecapa de BHA-T blando, previamente fundido y atemperado a 50°C, inoculada al 2% con un cultivo de una noche de la cepa indicadora. La placa con la sobrecapa se volvió a incubar a 37°C para permitir el crecimiento de la bacteria indicadora. Transcurridas 24h se observaron la posible aparición de halos de inhibición del crecimiento en torno a las bacterias productoras crecidas en la placa base.

3.2. Ensayos de producción en medio líquido

Para detectar la producción de bacteriocinas en medio líquido se empleó la técnica de difusión en pocillos. Esta técnica incluye la técnica de la doble capa descrita con anterioridad, pero en este caso, sobre una placa con medio MHA-Tamponado se colocaron torres Oxford de acero inoxidable y estériles. Posteriormente se vertió una sobrecapa de medio BHA-T blando, previamente fundido y atemperado a 50°C, inoculado con un cultivo de la bacteria indicadora al 2%. Tras solidificar se retiraron las torres y se procedió a depositar 70 µl de la muestra a ensayar. Para finalizar se incubó a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se midieron los halos de inhibición generados. Mediante esta técnica se ensayaron sobrenadantes de cultivos en medio líquido de diferentes aislados, así como de los eluidos de cromatografía durante la purificación de las enterocinas.

Adicionalmente, para detectar la producción de bacteriocinas en medio líquido se empleó la técnica de las gotas. Sobre placas con medio MHA-Tamponado o BHA-T se vertieron 7 ml de sobrecapa de BHA-T inoculada al 2% con la bacteria indicadora. Tras solidificar la sobrecapa se dispusieron gotas de 3 µl de la muestra a ensayar. Para finalizar, se incubaron 24h a 37°C para permitir el crecimiento de la cepa indicadora.

4. Producción y purificación de bacteriocinas

Para la producción de las enterocinas MR10A/B se partió de la cepa *E. faecalis* MRR10-3. Se tomó una colonia y se sembró en 3 ml de medio líquido BHI-Tamponado (BHI-T). Tras 24 h de crecimiento se pasaron 800 µl a un matraz con 20 ml de BHI-T. Se dejó crecer durante 8 h, inoculando posteriormente estos 20 ml a un bote de 1L de BHI-T (inóculo al 2%). Se dejó crecer toda la noche y al día siguiente se procedió a purificar la bacteriocina.

4.1. Cromatografía de intercambio catiónico

La cromatografía de intercambio catiónico es una variante de intercambio iónico utilizada principalmente para separar moléculas en función de su carga superficial (Smoluch et al., 2016). Concretamente se utiliza una resina cargada negativamente que presenta afinidad por moléculas cargadas positivamente. En este caso las enterocinas MR10A/B se recuperaron empleando el intercambiador catiónico débil Carboximetil-Sephadex CM-25 (Amersham).

La resina CM-25 se reconstituyó adicionándole tampón fosfato sódico 0,02 M pH 6,5, y posteriormente se mantuvo a 4 °C durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, el gel se lavó con dos volúmenes de NaCl 1,5 M y tres volúmenes de tampón fosfato 0,02M pH 6,5. Un gramo del producto en polvo originó de 9 a 10 ml de gel.

Se partió de 1L de cultivo de la bacteria productora al que se le retiraron las células mediante centrifugación. Tras conservar una alícuota de sobrenadante como control de la producción de bacteriocina, el sobrenadante se mezcla con el gel CM-25 en proporción 1:10, y se mantienen en agitación suave durante una hora para permitir la interacción iónica entre gel y bacteriocina.

Posteriormente se pasó la mezcla de gel y sobrenadante por una columna de vidrio de cromatografía y se recoge el sobrenadante, tomando una alícuota (S) para posteriores pruebas. Seguidamente, se procede a lavar el gel con 2 volúmenes de agua destilada, tomando igualmente una alícuota de dicho lavado (R) para probar con posterioridad que la bacteriocina se ha quedado retenida en el gel. Para finalizar la elución se llevó a cabo añadiendo 1 volumen de NaCl 0,5 M y 2 volúmenes de NaCl 1,5 M. El eluido se recogió en tubos a razón de 45-50 ml por tubo y mantenido a -20°C.

4.2. Cromatografía de fase reversa sobre soporte sólido C-18

Las fracciones con actividad obtenidas del intercambio catiónico se purificaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa. La cromatografía de fase reversa permite separar moléculas en función de su hidrofobicidad, quedando retenidos aquellas moléculas que son más hidrofóbicas y eluyéndose posteriormente al exponerlo a concentraciones crecientes de solventes orgánicos (Schlüter, 2000). Para ello se utilizó una columna de plástico (2,5 cm de diámetro x 10 cm de altura) Water WAT036975 donde se añadieron 5g de la resina C-18. Dicha resina una vez en la columna se lavó con solvente B (Ácido trifluoroacético (TFA) 4 mM en isopropanol:acetonitrilo (2:1)) y se equilibró con solvente A (1ml de TFA en 999 ml de Agua MilliQ). Las muestras (en torno a 160ml) se pasaron por la resina a flujo moderado y se volvieron a recoger para posteriores ensayos, y se lavó con agua destilada para eliminar el material no absorbido. Tanto de los lavados como del equilibrado se realizaron ensayos de actividad para controlar el intercambio hidrofóbico.

Para la elución del material retenido en el gel se pasó por la columna 3 volúmenes de solvente A; 3 volúmenes de solvente B al 30% en A; 3 volúmenes de solvente B al 60% en A, 3 volúmenes de solvente B al 90% en A y 3 volúmenes de solvente B al 100%. Los eluidos fueron recogidos a razón de 5ml por tubo para comprobar la actividad antimicrobiana. Las muestras con actividad se mantuvieron congeladas a -70° C.

5. Técnicas de aislamiento de ADN

5.1. Obtención de células totales de muestras de queso

De cada muestra de queso, a partir de 50 ml de la dilución 10^{-1} se recolectaron células por centrifugación mediante 3 lavados con citrato sódico 2% a 5000 rpm por 15 min a 12°C. El sedimento que se obtuvo fue resuspendido en 1 mL de citrato sódico 2% y dividido en dos tubos eppendorf a razón de 500 μ L por tubo. Estos se centrifugaron 5 min a 13 000 rpm y el sedimento de células (correspondiente a 2.5 g de queso) se conservó a -20°C.

5.2. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN de células totales y aislados de los quesos se siguió el protocolo MSOP (del inglés Modification of the protein Salting-Out Procedure) desarrollado por Martin-Platero et al., (2007). Para ello, el sedimento de células

procedente de 2,5 g de queso fue resuspendido en 100 μ L de solución I (10% sacarosa, 25 mM Tris pH 8, 10 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), adicionada con lisozima (a 10 mg/mL). Tras una incubación de 1 h a 37 °C para permitir la digestión de la pared celular, se lisaron las células mediante adición de 600 μ L de la solución II (100 mM Tris, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS) agitando por inversión suave. Posteriormente, para favorecer la lisis celular se incubó por 10 min a 55°C y posteriormente por 10 min a 80°C. Tras atemperar las muestras, para precipitar las proteínas se añadieron 200 μ L de la solución III (AcNa 3 M pH 5,2) agitando 20 segundos por vórtex e incubando en hielo 5 min. A continuación, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm a 12 °C durante 5 min para sedimentar proteínas y restos celulares. Enconces, para precipitar el ADN, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se adicionaron 600 μ L de isopropanol, mezclando por inversión hasta ver el precipitado del ADN genómico. Finalmente, el ADN genómico precipitado se lavó (2x) con 500 μ L de etanol al 70%. Tras la centrifugación a 13.000 rpm de 5 min del último lavado, se secó el ADN a vacío (Concentrator Plus EPPENDORF). Una vez seco, se resuspendió en 200 μ L de TE 0,5X (Tris-CIH 10 mM pH8, EDTA 1 mM) y se conservaron a -20°C.

5.3. Determinación de la concentración de ADN cromosómico

Para determinar la concentración y pureza del ADN genómico, tras la extracción, se empleó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), que permite determinar la absorbancia de la solución de ADN a 260 y 280 nm. Como blanco se utilizó TE 0,5X ya que fue el vehículo utilizado en la disolución del ácido nucleico.

6. Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Secuencias Multilocus

El análisis de secuencias multilocus (MLSA del inglés Multilocus Sequence Analysis) consiste en un análisis filogenético de múltiples fragmentos internos de genes conservados dentro del taxón de estudio, permitiendo diferenciar así poblaciones estrechamente relacionadas. Además, estos genes se presentan como una sola copia dentro del genoma y no están sujetos a presión selectiva (Hanage et al., 2006). El enfoque habitual en la taxonomía bacteriana es concatenar las secuencias de varios (normalmente de cuatro a ocho) genes de mantenimiento. Las secuencias concatenadas luego se utilizan para evaluar los patrones de agrupamiento entre un gran número de cepas dentro de un género o parte de un género. En nuestro caso se utilizaron 5 genes *adk* (adenylate kinase);

atpA (ATP synthase, alpha subunit); *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase (Homan et al., 2002) y *groEL* (chaperonin GroEL) (Tabla II.7). Los cebadores para este último gen fueron diseñados en la presente Tesis, utilizando el software Hyden (Linhart & Shamir, 2007), que permite construir cebadores degenerados. Para su diseño, se especificó que los cebadores tuvieran una longitud de 20 nucleótidos, con máximo dos degeneraciones y 2 mismatches. Además, se buscaba que amplificaran un tamaño de amplicón en torno a 400-600pb. En la Tabla II.8 se recoge la composición general de la muestra utilizada en esta amplificación.

Tabla II.7. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados.

Cebadores	Amplificado	Secuencia cebador (5' -> 3')	Referencia
adk adk2	Adenilato kinasa	TATGAACCTCATTTTAATGGG GTGACTGCCAAACGATTTT´	
atpA1 atpA2	ATP sintasa, subunidad alfa	CGGTTTCATACGGAATGGCACA AAGTTCACGATAAGCCACGG	(Homan et al., 2002)
gyd1 gyd2	Gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenada	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	
gdh1 gdh2	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	GGCGCACTAAAAGATATGGT CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCC A	
GroELF GroELR	groL chaperonina GroEL	GYGAAAAATTWCAAGAACG ACGACWGCTTCAGTYGTTAA	Presente estudio

Tabla II.8. Composición general de la reacción de amplificación para MLSA.

Compuesto	Concentración
Primer forward	0,5µM
Primer reverso	0,5µM
Ibian-Taq MasterMix	1x
Agua MilliQ	Hasta completar 50µl
ADN molde	100ng
Volumen total	50 µl

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador Biometra Tone Series (Analytik jena). Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR fueron suministrados por StabVida. En el caso de la ADN polimera, se utilizó la PCR Master Mix (2x) de Thermo Scientific™.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- 1) Desnaturalización inicial: 94 °C, 2 min.
- 2) Desnaturalización: 94 °C, 30 seg.
- 3) Hibridación: 50 °C 30 seg.
- 4) Extensión: 72 °C, 30 seg.
- 5) El número de ciclos fue de 35 (incluidos 1 al 3).
- 6) Terminación: 72 °C, 5 min.

Para la asignación de secuencias tipo de los genomas de *E. faecalis* S48 y UGRA10 y MRR10-3 analizados en el Capítulo V, se empleó la base de Public Databases for Molecular Typing (PubMLST) (Jolley et al., 2018), que genera un perfil alélico utilizando siete genes *houskeeping-gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* y *yqiL*. Los tipos de secuencia se asignaron utilizando la misma base de datos mediante la búsqueda de combinaciones de locus en secuencias tipo conocidas de *E. faecalis*.

Para la búsqueda y asignación de secuencias tipo entre las cepas aisladas de las muestras de quesos utilizadas en el Capítulo VI, se empleó el programa USEARCH (versión 11.0.66; identidad = 100%) (Robert C., 2010) que permite agrupar secuencias únicas de cada gen. Para determinar las cepas que contenían el mismo perfil alelo, se utilizó el software PHYLOViZ (versión 2.0) (Nascimento et al., 2017). Aquellas cepas que se agruparon en el mismo grupo en cuatro de los cinco genes se consideraron la misma población.

7. Identificación de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva

7.1. Preparación de librerías

Para identificar la composición microbiana de los quesos analizados se prepararon librerías para secuenciación masiva en la plataforma Illumina MiSeq empleando la región V4 del gen del ARN ribosómico 16S como inserto. Estas librerías se prepararon mediante amplificación por PCR de nuestro gen diana. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador iCycler 170-8720 (Bio-Rad), empleando la ADN polimerasa utilizada fue la polimerasa Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™) y los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por StabVida y/o Metabion.

El proceso consistió en la construcción de librerías mediante un enfoque de amplificación de dos pasos. En la primera PCR se utilizaron los cebadores Mi_U515F (5'- TCGTC GGCAG CGTCA GATGT GTATA AGAGA CAGGT GCCAG CMGCC GCGGT AA -3') y Mi_E786R (5'- GTCTC GTGGG CTCGG AGATG TGTAT AAGAG ACAGG GACTA CHVGG GTWTC TAAT -3') que contenía las secuencias de cebadores de U515F y E786R dirigidos a la región V4 del gen 16S rRNA con extremos parciales de los adaptadores de Illumina, siguiendo la aproximación de Preheim y colaboradores (2013). La composición de la mezcla de PCR se muestra en la Tabla II.9.

Tabla II.9. Composición general de la mezcla de la primera PCR de construcción de librerías V4.

Compuesto	Cantidad o concentración
Mix PCR (Phusion Flash High-Fidelity)	1x
U515-F (3 μ M)	0.3 μ M
E786-R (3 μ M)	0.3 μ M
Agua	Hasta completar 25 μ l
ADN (4 ng/ μ L)	100ng
Volumen total	25 μL

El producto de esta PCR se utilizó como molde para la segunda PCR donde se agregaron cebadores que contienen la secuencia completa de los adaptadores de Illumina, incluyendo un código de barras (index) específico de cada muestra, de forma que la combinación de los códigos de barras forward y reverso fue única para cada librería. De esta modo, el tamaño final de la construcción fue de 428 pb, de los cuales 292 pb se corresponden con el inserto de la región V4 amplificada.

Las secuencias de los códigos de barras de los cebadores se encuentran en la Tabla II.10, la composición de la mezcla se recoge en la Tabla II.11, y las diferentes condiciones de PCR utilizadas para cada par de cebadores se muestran en la Tabla II.12.

Finalmente, se determinó la concentración de cada una de las librerías mediante fluorescencia a través del sistema Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific™) para multiplexar las librerías con las mismas concentraciones ADN y minimizar así sesgos en el número de secuencias por muestra tras la secuenciación.

Tabla II.10. Secuencias de los adaptadores index (Illumina, 2016).

Index 1 (i7)	Secuencia	Index 2 (i5)	Secuencia
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT		
N706	TAGGCATG		
N707	CTCTCTAC		
N708	CAGAGAGG		
N709	GCTACGCT		

Tabla II.11. Composición general de la mezcla de la segunda PCR.

Compuesto	Concentración
Mix PCR (Phusion Flash High-Fidelity)	1x
N70(X)-F (3 μ M)	0.4 μ M
S50(X)-R (3 μ M)	0,4 μ M
Agua	Hasta completar 25 μ l
ADN	100ng
Volumen total	25 μ L

Tabla II.12. Condiciones de PCR para cada par de cebadores.

Condiciones PCR	U515-F/E786-R	N70(X)-F/s50(X)
1)Desnaturalización inicial	98°C, 10 seg	98°C, 10 seg
2) Desnaturalización	98°C, 1 seg	98°C, 1 seg
3) Hibridación	52°C, 5 seg	55°C, 5 seg
4) Extensión	72°C, 5 seg	72°C, 5 seg
5)Números de ciclos (incluidos C ₁ a C ₃)	20	9
6) Terminación	72°C, 1 min	72°C, 1 min

7.2. Análisis de secuencias

Tras la secuenciación de la comunidad bacteriana con Illumina, las secuencias obtenidas se analizaron mediante el paquete informático QIIME 2.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Bolyen et al., 2019). QIIME implementa diversos flujos de trabajo habituales en el análisis de secuencias de diversidad microbiana obtenidas por secuenciación masiva, así como la realización de comparaciones de las muestras de estudio, análisis estadísticos y visualizaciones gráficas de los datos (Caporaso et al., 2012; Kuczynski et al., 2011). Este software “envuelve” los algoritmos y

herramientas producidos por investigadores en una única línea para el análisis de secuencias (Navas-Molina et al., 2013). Además, QIIME utiliza paquetes como IPython y R, lo que permite realizar análisis adicionales.

En primer lugar, tras la secuenciación se eliminaron los cebadores a través del plugin cutadapt (Martin, 2011) con parámetros por defecto. Seguidamente se filtró por calidad en base a los Phred scores (Q) de cada posición, estableciendo una Q mínima de 20, cortando hacia 3' en la posición que se producía un descenso de calidad por debajo de este umbral.

Posteriormente se unieron las lecturas pareadas y se agruparon las secuencias en ASVs (Amplicon Sequence Variants) mediante el plugin DADA2 (Callahan et al., 2016) implementado en QIIME2. DADA2 modela y corrige errores de secuenciación para inferir secuencias exactas sin agrupar por ningún umbral de similitud. Las secuencias representativas de los ASVs obtenidos se alinearon con *mafft* (Kato et al., 2002) para posteriormente construir un árbol filogenético. Las secuencias representativas se anotaron taxonómicamente utilizando la base de datos de ARN riboómico Silva (versión 138) con una similitud del 99 % (Quast et al., 2013), mediante el método classify-sklearn (Pedregosa et al., 2011).

Finalmente se calcularon diversos índices de diversidad alfa, tales como riqueza de ASV, abundancia de especies (índice de Shannon) (Shannon, 1948) e índice de diversidad filogenética de Faith (Faith & Baker, 2006) utilizando la tabla de ASV rarificada a 17000 secuencias por muestra.

8. Secuenciación

Para obtener la secuencia de los distintos genes amplificados para el análisis MLSA se purificaron los productos de PCR mediante el kit “*PCR clean up NucleoFast 96 PCR*” (Macherey-Nagel). Tras las correspondientes purificaciones, la secuenciación de los mismos se realizó mediante secuenciación de Sanger (Sanger et al., 1977) a través de la empresa StabVida (Universidad de Nova de Lisboa).

Los productos de PCR obtenidos de la primera y segunda amplificación en el proceso de construcción de librerías, se purificaron mediante el "MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit" (iNtRON Biotechnology)

Para la secuenciación del genoma de la cepa MRR10-3 se utilizó el kit de preparación de librerías TruSeq DNA PCR-free (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) con un tamaño de inserción de 350 pb secuenciado en Macrogen, Inc. (Seúl, República de Corea) con una plataforma HiSeq Illumina mediante secuenciación de extremos pareados de 2×101 pb de longitud de lectura. Para la secuenciación de los genomas de las cepas *E. faecalis* S-48 y UGRA10 se utilizó el kit de preparación de librerías TruSeq DNA PCR-free (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) con un tamaño de inserción de 300 pb secuenciado por StabVida (Caparica, Portugal) con una plataforma HiSeq4000 Illumina mediante secuenciación de extremos pareados de 2×150 pb de longitud de lectura.

La secuenciación masiva de las librerías V4 del gen 16S se realizó mediante la plataforma MiSeq de Illumina. Para las secuenciaciones se utilizaron los cartuchos Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), obteniendo lecturas pareadas de 2×300 pares de bases de longitud de lectura. La secuenciación de las muestras de los distintos experimentos se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR). Previamente, la integridad de las librerías se comprobó mediante la utilización de Bioanalyzer 2100 o D1000 ScreenTape (Agilent Technologies) para cuantificar con precisión el tamaño de los amplicones.

9. Electroforesis en geles de agarosa

La separación y visualización del ADN genómico y los productos de PCR, se llevó a cabo mediante electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa de baja electroendósmosis (Molecular Biology Grade, Bio-Rad), a una concentración variable entre 0,8-1% según el fragmento a resolver. El tampón de la electroforesis empleado fue TAE 1× (Tabla II.13).

Tabla II.13. Composición del tampón de electroforesis TAE 1x.

Tampon TAE (50×)	
Tris Base	242,0g
Ácido acético	57,1ml
EDTA-Na 0,5M, pH8	100ml
Agua destilada	Completar hasta 1L

Las muestras fueron mezcladas con solución de carga (1/10 de su volumen)(Tabla II.14) y fueron depositadas en los pocillos del gel, aplicándoles una corriente constante de hasta 85 V hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (0,5 µg/ml en agua destilada) durante 15 min. Posteriormente se lava en agua durante aproximadamente 20 min para eliminar el exceso de bromuro. Por último, el ADN se visualizó por exposición a la luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (GelDoc Go Imaging System, Bio-Rad).

Tabla II.14. Composición de la solución de carga.

Solución de carga (10×)	
Glicerol	50% (v/v)
TE (10 mM Tris-HCl pH 8; EDTA 1 mM pH 8)	49,75% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25%

En algunos casos se utilizó el reactivo fluorescente no mutagénico EZ-VISION™. Este reactivo se suministró junto con el tampón de carga. Además de permitir visualizar las bandas de ADN de manera instantánea al exponer el gel de agarosa a iluminación UV, es una viable y segura alternativa al bromuro de etidio.

Para conocer el tamaño aproximado de los ADNs presentes en las muestras sometidas a electroforesis, se utilizaron como patrones de tamaño molecular los fragmentos de restricción HindIII del fago λ (BioRad) y los marcadores 100 bp ladder y 1 kbp ladder (Biotools).

10. Análisis estadísticos

Para comprobar el efecto de la presencia y producción de bacteriocinas en las comunidades y poblaciones se realizaron Modelos Lineales Generalizados (GLM del inglés General Linear Model), ejecutados en el programa Statistica 10.0 (StatSoft). Para las variables que siguieron una distribución gaussiana (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) se utilizaron pruebas paramétricas; para aquellas que no cumplían el principio de normalidad se utilizaron la prueba no paramétrica de Kluskal-Wallis. Adicionalmente, para determinar la relación entre entre variables, se empleó la correlación de Pearson.

Para la construcción de dendrogramas se utilizó el software Rstudio (RStudio Team, 2022), y diversos paquetes incluidos en el mismo como ComplexHeatmap (Gu et al., 2016), viridis (Garnier et al., 2021), Stats (R Core Team, 2021), dendextend (Galili, 2015) RColorBrewer (Neuwirth, 2022).

11. Búsqueda de homologías

Para la búsqueda de similitudes entre secuencias aminoacídicas y nucleotídicas se utilizó el programa BLAST +, tanto en la interfaz web como en línea de comandos, y sus variantes tales como blastn (versión 2.12.0+) (Zhang et al., 2000) o blastp (versión 2.12.0+) (Altschul et al., 1997) o tblastn (versión 2.12.0+) (Altschul et al., 1990). La construcción de bases de datos se realizó a través del comando makeblastdb (blast 2.12.0+) (Camacho et al., 2009) igualmente implementado en BLAST+.

Cuando la búsqueda de homologías se realizó entre contigs, éstas se realizaron y representaron gráficamente mediante el programa EasyFig (versión 2.1) (Sullivan et al., 2011), el cual permite crear figuras de comparación lineal de múltiples *loci* genómicos con una interfaz gráfica de usuario fácil de usar. Igualmente se usó el software Artemis (versión 18.1.0) y Artemis Comparison Tool (ACT) (Carver et al., 2012), que también permiten visualizar de forma integrada diferentes tipos de conjuntos de datos HTS (*High-throughput sequencing*) en el contexto de un genoma de referencia y su anotación correspondiente.

Las bases de datos utilizadas como referencia fueron NCBI RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) (O’Leary et al., 2016) para identificación de cepas y construcción de bases de datos; y BACTIBASE (Hammami et al., 2010), para la búsqueda de bacteriocinas homólogas.

12. Análisis filogenéticos

Para llevar a cabo los correspondientes análisis filogenéticos, en primer lugar, se realizó una alineación de secuencia múltiple mediante el algoritmo clustalW (Thompson et al., 1994) incluido en MEGA-X (versión 10.1.8) (Kumar et al., 2018) o mediante Clustal Omega (Sievers et al., 2011) de EMBL-EBI (Madeira et al., 2022), utilizando de igual forma el algoritmo clustalW. Posteriormente se construyeron árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud igualmente con el programa MEGA-X (versión 10.1.8; n° de Replicaciones Bootstrap: 1000; modelo de evolución: Tamura-Nei) (Tamura & Nei,

1993). Para conjuntos de datos de mayor tamaño, se utilizó el software FastTree (versión 2.1.11) (Price et al., 2010) que permite construir de igual forma árboles de máxima verosimilitud utilizando el modelo General Time Invariant (GTR).

Para visualizar los árboles filogenéticos se utilizó la herramienta en línea Interactive Tree Of Life (iTOL; versión 6.5.8) (Letunic & Bork, 2021) que además de la visualización permite la anotación y gestión de árboles filogenéticos.

13. Ensamblaje, anotación y análisis de genomas

Cuando fue preciso el ensamblaje de genomas este se llevó a cabo *de novo* mediante el software SPAdes (versión 3.13) (Bankevich et al., 2012), que emplea grafos de *De Bruijn* sobre *k-mers* (*k-mers* empleados: 21-33-55-77) para el ensamblado. Para la anotación de genomas se utilizó el software Prokka (versión 1.12) (Seemann, 2014) que integra diversos recursos para la anotación de genomas, tales como: Prodigal (Hyatt et al., 2010) para la anotación de secuencias codificantes de proteínas, RNAmmer (Lagesen et al., 2007) para genes ribosomales, ARAGORN (Laslett & Canback, 2004) para RNA de transferencia, SignalP (Teufel et al., 2022) para péptidos señal, o Infernal (Nawrocki & Eddy, 2013) para RNAs no codificantes. En el caso de ser necesario el cálculo del pan-genoma, se utilizó el programa Roary (versión 3.11.2) (Page et al., 2015) para estimar la frecuencia de las distintas anotaciones en los diferentes genomas, así como un alineamiento multi-FASTA de todos los genes del *core genome* para su análisis filogenético.

Para la realización del análisis funcional de genomas se utilizó el software InterProScan-5.60-92.0 (Paysan-Lafosse et al., 2023), que permite clasificar las proteínas en familias y predice dominios importantes. Este utiliza modelos predictivos, proporcionados por varias bases de datos diferentes. InterproScan genera términos de ontología de genes asociados a cada gen. Posteriormente, se utilizó la base de datos Gene Ontology (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology Consortium, 2021) para realizar un análisis funcional de los genes y sus productos.

Por último, se buscaron diferentes características de los genomas como los posibles factores de virulencia utilizando la base de datos VFDB (del inglés Virulence Factor Database) con parámetros predeterminados (Liu et al., 2019). Los genes de resistencia a antibióticos utilizando el Identificador de Genes de Resistencia (RGI) disponible en la base de datos CARD (de sus siglas en inglés Comprehensive Antibiotic Resistance

Database) (McArthur et al., 2013). El software MobileElementFinder (versión 1.1.2) se empleó para encontrar elementos genéticos móviles (Johansson et al., 2021). Las secuencias de inserción se identificaron mediante el servicio web ISfinder (Siguier et al., 2006). La presencia de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) se evaluó con la herramienta web CRISPR-Cas++ (Grissa et al., 2007), que clasifica las secuencias CRISPR , un nivel de evidencia, calificado de 1 a 4, donde 1 incluye CRISPR pequeños y 2 a 4 se clasifican según la similitud de repetición y espaciador.

14. Referencias

- Achemchem, F., Abrini, J., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *Journal of Food Protection*, *69*(10), 2370-2376. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.10.2370>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, *6*(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, *28*(4), 464-469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Santos Soler-González, A., Ramírez-Rodrigo, H., & Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 1229-1236. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1229-1236.2003>
- Faith, D. P., & Baker, A. M. (2006). Phylogenetic Diversity (PD) and Biodiversity Conservation: Some Bioinformatics Challenges. *Evolutionary Bioinformatics*, *2*, 121-128. <https://doi.org/10.1177/117693430600200007>
- Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., & Maqueda, M. (2008). Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin

- production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 240-250.
<https://doi.org/10.1128/JB.01528-07>
- Galili, T. (2015). dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 31(22), 3718-3720.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv428>
- Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., & Montoya, E. (1985). Production of bacteriocin-like substances by group D *streptococci* of human origin. *Microbios*, 43(176S), 223-232.
- Garnier, S., Ross, N., Rudis, R., Camargo, A. P., Sciaini, M., & Scherer, C. (2021). *Rvision—Colorblind-Friendly Color Maps for R* (0.6.2.). <https://sjmgarnier.github.io/viridis/>
- Gene Ontology Consortium. (2021). The Gene Ontology resource: Enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D325-D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
- Gomori, G. (1955). [16] Preparation of buffers for use in enzyme studies. En *Methods in Enzymology* (Vol. 1, pp. 138-146). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01020-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01020-3)
- Gratia, J., & Fredericq, P. (1946). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 93, 1040-1042.
- Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W52-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: A database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-22>
- Hanage, W. P., Fraser, C., & Spratt, B. G. (2006). Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1917-1927. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1917>
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J. D. A., & Willems, R. J. L. (2002). Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1963-1971.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002>
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Illumina, Inc. (2016). *Nextera DNA Library Prep Reference Guide*.
https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nexteraDNA/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101-109.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 10, 10.7.1-10.7.20.
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H.-H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAMmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100-3108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm160>
- Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11-16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh152>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Linhart, C., & Shamir, R. (2007). Degenerate primer design: Theoretical analysis and the HYDEN program. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 402, 221-244. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_11
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687-D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276-W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), Art. 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., & Maqueda, M. (1990). A transferable plasmid associated with AS-48 production in *enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2817-2818. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2817-2818.1990>
- Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., & Maqueda, M. (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 27(2), 347-358. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00682.x>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein «salting-out» procedure. *Analytical Biochemistry*, 366(1), 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J. V., Spanogiannopoulos, P., ... Wright, G. D. (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- Nascimento, M., Sousa, A., Ramirez, M., Francisco, A. P., Carriço, J. A., & Vaz, C. (2017). PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, 33(1), 128-129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw582>
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., Ursell, L. K., Lauber, C., Zhou, H., Song, S. J., Huntley, J., Ackermann, G. L., Berg-Lyons, D., Holmes, S., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in Enzymology*, 531, 371-444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407863-5.00019-8>
- Nawrocki, E. P., & Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(22), 2933-2935. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509>

- Neuwirth, E. (2022). *RColorBrewer: ColorBrewer Palettes* (1.1-3). <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, *12*(null), 2825-2830.
- Preheim, S. P., Perrotta, A. R., Martin-Platero, A. M., Gupta, A., & Alm, E. J. (2013). Distribution-Based Clustering: Using Ecology To Refine the Operational Taxonomic Unit. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(21), 6593-6603. <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-13>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, *5*(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Robert C., E. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- RStudio Team. (2022). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (4.1.2). RStudio, PBC. <http://www.rstudio.com/>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467.
- Schlüter, H. (2000). Chapter 3—Reversed-Phase Chromatography. En M. Kastner (Ed.), *Journal of Chromatography Library* (Vol. 61, pp. 147-234). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60531-X](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60531-X)
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, *27*(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Siguié, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, *34*(Database issue), D32-36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

- Smoluch, M., Mielczarek, P., Drabik, A., & Silberring, J. (2016). 5—Online and Offline Sample Fractionation. En P. Ciborowski & J. Silberring (Eds.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)* (pp. 63-99). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00005-7>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(7), 1009-1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Wirth, R., An, F. Y., & Clewell, D. B. (1986). Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *Journal of Bacteriology*, 165(3), 831-836. <https://doi.org/10.1128/jb.165.3.831-836.1986>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

CAPÍTULO III. Enterocin cross-resistance mediated by ABC transport systems

Claudia Teso-Pérez^{1,*}, Manuel Martínez-Bueno¹, Juan Manuel Peralta-Sánchez¹, Eva Valdivia¹, Mercedes Maqueda¹, M. Esther Fárez-Vidal^{2,3,*} and Antonio M. Martín-Platero^{1,*}

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18016 Granada, Spain

³ Instituto de Investigación Biomédica IBS, Granada, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Este capítulo ha sido publicado en *Microorganisms* 2021:

Teso-Pérez, C.; Martínez-Bueno, M.; Peralta-Sánchez, J.M.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Fárez-Vidal, M.E.; Martín-Platero, A.M. Enterocin Cross-Resistance Mediated by ABC Transport Systems. Microorganisms 2021, 9, 1411. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071411>

Abstract

In their struggle for life, bacteria frequently produce antagonistic substances against competitors. Antimicrobial peptides produced by bacteria (known as bacteriocins) are active against other bacteria, but harmless to their producer due to an associated immunity gene that prevents self-inhibition. However, knowledge of cross-resistance between different types of bacteriocin producer remains very limited. The immune function of certain bacteriocins produced by the *Enterococcus* genus (known as enterocins) is mediated by an ABC transporter. This is the case for enterocin AS-48, a gene cluster that includes two ABC transporter-like systems (Transporter-1 and 2) and an immunity protein. Transporter-2 in this cluster shows a high similarity to the ABC transporter-like system in MR10A and MR10B enterocin gene clusters. The aim of our study was to determine the possible role of this ABC transporter in cross-resistance between these two different types of enterocin. To this end, we designed different mutants (Tn5 derivative and deletion mutants) of the *as-48* gene cluster in *Enterococcus faecalis* and cloned them into the pAM401 shuttle vector. Antimicrobial activity assays showed that enterocin AS-48 Transporter-2 is responsible for cross-resistance between AS-48 and MR10A/B enterocin producers and allowed identification of the MR10A/B immunity gene system. These findings open the way to the investigation of resistance beyond homologous bacteriocins.

Keywords: enterocin; ABC transporter; bacteriocin immunity; MR10A/B; AS-48

1. Introduction

Most bacteria live within complex microbial communities in which they must compete for biotic and abiotic resources to ensure their survival. This competition can be passive, when one strain harms another through resource consumption, or active, when strains damage each other through chemical warfare (antagonistic interaction) (Ghoul & Mitri, 2016). An important antagonistic mechanism in bacteria involves the production of antimicrobial peptides (bacteriocins), a widely observed phenomenon (Dobson et al., 2012). Bacteriocin production has been observed in cyanobacteria (Wang et al., 2011), enterobacteria (Rebuffat, 2011), and lactic acid bacteria (LAB) (Zacharof & Lovitt, 2012), among many other prokaryotes and *Archaea*. Bacteriocin production allows bacteria to improve the stability of their communities by competing against closely related bacterial species to establish a stable niche for the producer strain (Kommineni et al., 2015).

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides (Soltani et al., 2020; Meade et al., 2020) that can have a broad spectrum of activity, as in the case of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria such as bifidocin A (Liu et al., 2016), lactacin 3147 (Fallico et al., 2011), and nisin (Jozala et al., 2015). Bacteriocins are a heterogeneous group of peptides that vary in size, structure, mode of action, and/or target cell receptor (Dobson et al., 2012). These differences give rise to three classes of bacteriocins: class I, small (less than 10KDa) heat-stable peptides that undergo post-translational modifications; class II, small (less than 10KDa) heat-stable, non-modified peptides; and class III, large thermolabile peptides (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Kumariya et al., 2019).

Bacteriocin production involves the coordinated expression of several groups of genes distributed in one or more operons located either on the chromosome or on plasmids. Producers must carry their own immunity gene in the gene cluster to avoid self-inhibition. Bacteriocin gene clusters usually include genes encoding (i) the bacteriocin structure; (ii) bacteriocin maturation and processing; (iii) bacteriocin transport and/or secretion; and (iv) self-immunity (Figure III.1) (Cintas et al., 2001; Dimov et al., 2005). Immunity mechanisms can involve a single small protein, a complex of proteins, a membrane-bound metalloprotease, multi-drug transporter proteins, or the combined action of a cognate immunity protein and ABC transporter (de Freire Bastos et al., 2015).

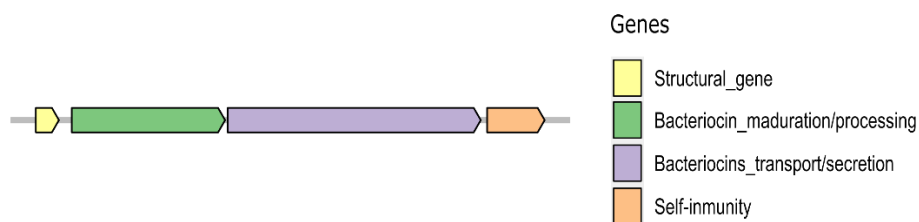


Figure III.1. Common bacteriocin-gene cluster organization. The general genetic organization for bacteriocin production involves four main types of genes: structural genes; genes involved in maturation, processing; genes involved in the transport, secretion of bacteriocin; and genes that confer self-immunity to the bacteriocin.

One of the best-characterized enterocinogenic systems is the cyclic peptide AS-48 (Class I) produced by *Enterococcus faecalis* (Maqueda et al., 2004). The *as-48* gene cluster (Figure III.2a) is located in the conjugative plasmid pMB2 (Martinez-Bueno et al., 1990) and comprises at least ten genes (*as-48A, B, C, C₁, D, D₁, E, F, G* and *H*); their transcriptional analysis revealed two polycistronic mRNAs that correspond to the expression of *as-48ABC* and *as-48C₁DD₁EFGH* operons, respectively (Maqueda et al., 2004). This analysis also identified an internal P_{D1} promoter involved in the transcription of *as-48D₁EFGH* genes (Cebrián et al., 2014). The structural gene *as-48A* encodes a protein of 105 amino acids, of which the first 35 constitute a signal peptide preceded by a strong promoter (P_A) that also directs the expression of *as-48BC* genes, which are separated from the structural gene by a short but important inverted repeat (IR) (Cebrián et al., 2014; Maqueda et al., 2004). The *as-48B* gene encodes a protein that may participate in the biosynthetic machinery, *as-48C* appears to encode an accessory immunity protein, and *as-48D₁* encodes an immunity determinant protein (Martínez-Bueno et al., 1998). This cluster also contains two ABC transporters: *as-48C₁D* (Transporter-1), responsible for secretion of the enterocin, and *as-48EFGH* (Transporter-2), which provides additional self-protection against the enterocin (Maqueda et al., 2004). This type of Transporter-2 has been described in bacteriocins that produce pores in the cytoplasmic membrane, removing the bacteriocin from producer cells and keeping the bacteriocin concentration in the cytoplasmic membrane below the critical level necessary for pore formation (Diaz et al., 2003).

The *as-48EFGH* genes comprise an ABC transport system observed in a different class of bacteriocins such as enterocins L50A/B. These bacteriocins (L50A/B) are

frequent among enterococci (Toit et al., 2000; De Vuyst et al., 2003; Guerra et al., 2003; Ogaki et al., 2016), and several variants have been identified, including EntJ/I (Ruiz-Barba et al., 2007), F58 (Achemchem et al., 2005), and MR10A/B (Martín-Platero et al., 2006). Ruiz-Barba et al. (Ruiz-Barba et al., 2007) sequenced the plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1, which is responsible for ENT I/J production. In addition to the structural genes *ent I/J*, they described three additional downstream genes of unknown function that are virtually identical to *L50 EFG* and a set of genes similar to the As-48EFGH ABC transport system in the *as-48* gene cluster (Figure III.2b).

Bacteria possess mechanisms to protect themselves from their own bacteriocins; for most bacteriocins, however, the mechanisms involved in immunity remain poorly understood (de Freire Bastos et al., 2015). Our group has observed cross-resistance between enterococcal strains carrying the *as-48* gene cluster, and other bacteriocins such as MR10A/B (unpublished data). Cross-resistance arises in various situations: when the two cells have a common receptor for the antimicrobial substance, when the antimicrobial agent initiates a common pathway to cell death, or when they share a common route of access to their respective targets (Chapman, 2003). Evidence is emerging of cross-resistance between bacteriocins (Gravesen et al., 2002; Kaur et al., 2013; Vignolo et al., 2000) although cross-resistance has only been observed between closely related bacteriocins to date (Fimland et al., 2002; Oppegård et al., 2010), and nothing is known about cross-resistance between different classes of bacteriocins. Consequently, the aim of the present study was to elucidate the mechanisms underlying cross-resistance between different classes of antimicrobial peptides based on the AS-48 Transporter-2 system. The study hypothesis was that the ABC Transporter-2 system in the *as-48* gene cluster could be responsible for cross-resistance with other classes of bacteriocins, bestowing this system with resistance beyond its own antimicrobial peptide.

This study was designed to elucidate the role of the As-48EFGH ABC transporter in cross-resistance to the bacteriocins MR10A/B by analyzing the sensitivity to this bacteriocin of a collection of different mutants of the AS-48 bacteriocin gene cluster. In addition, analysis of the *mr10A/B* gene cluster revealed a degree of similarity between AS-48 Transporter-2 and MR10A/B ABC transporter.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Culture Media

The bacterial collection used in the study encompasses 21 strains (Table III.1). *E. faecalis* MRR 10-3, A-48-32, and *E. faecium* F58 were grown on Trypticase Soy Agar (TSA) at 37 °C. *E. faecalis* strains JH2-2 (pAM401) and JH2-2 (pAM401-81), and the set of Tn5 mutants were cultured in Trypticase Soy Broth (TSB) or TSA with chloramphenicol (20 µg/mL) to avoid plasmid curing during their growth

Brain Heart Infusion Agar (BHA) and Mueller–Hinton Agar (MHA) were used for inhibition assays, buffering the media in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.9 to avoid interference from any inhibitory effect of organic acids produced in their fermentative metabolism.

Mutant D1Pst1 was constructed by *Pst* I digestion of plasmid 401-81::Tn5_D. A fragment of 14 kb was purified, religated, and used to transform *E. faecalis* JH2-2, as previously described (Martínez-Bueno et al., 1998).

2.2. Inhibitory-Activity Assays

The agar well diffusion method was used to follow the antimicrobial substance during the purification process (Abriouel et al., 2002; Balouiri et al., 2016). Briefly, stainless steel cylinders with outer diameter of 8 mm were placed on the agar plate surface and then overlaid with 6 mL of soft BHA inoculated with 2% of the indicator strain culture. After this overlay solidified, cylinders were removed, and 70 µL of the solution to be tested was introduced into the well.

The drop-plating technique was also used to determine the sensitivity of the different mutants to the purified bacteriocin. Briefly, an overlay of soft BHA inoculated with a 2% indicator strain was poured onto the surface of the BHA plate. After this overlay solidified, 5 µL drops of the purified bacteriocin, two-fold diluted up to 1/16, were placed onto the plates. Inhibition halo diameters were measured after 24 h of incubation at 37 °C

Table III.1. Bacterial strains used in the present study.

Strain **	Mutation	Reference or Source ^a
JH2-2 (pAM401-81)	<i>as-48ABCC₁DD₁EFGH</i> gene cluster cloned in pAM401 vector	(Diaz et al., 2003)
D1Pst1 (<i>as-48DEFGH</i> cloned from 401-81::Tn5 _{D1} mutant)	<i>as-48D₁EFGH</i>	This study
JH2-2 (pAM401-81::Tn5 _{D1-E})	<i>as-48ABCC₁DD₁*EFGH</i>	(Diaz et al., 2003)
JH2-2 (pAM401-81::Tn5 _C)	<i>as-48ABC*C₁DD₁EFGH</i>	(Fernández et al., 2008)
JH2-2 (pAM401-81::Tn5 _B)	<i>as-48AB*CC₁DD₁EFGH</i>	(Fernández et al., 2008)
JH2-2 (pAM401-81:: <i>as-48AB</i>)	<i>as-48CC₁DD₁EFGH</i>	(Diaz et al., 2003)
JH2-2 (pAM401-52)	<i>as-48ABCC₁DD₁EF</i>	
JH2-2 (pAM401-52::Tn5 _F)	<i>as-48ABCC₁DD₁EF*</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52:: Tn5 _E)	<i>as-48ABCC₁DD₁E*F</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5 _D)	<i>as-48ABCC₁D*D₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5 _{B-C})	<i>as-48AB*CC₁DD₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
JH2-2 (pAM401-52::Tn5 _B)	<i>as-48AB*CC₁DD₁EF</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
pAM401-58(pAM401-52:: <i>as48A</i>)	<i>as-48BCC₁DD₁EF</i>	(Fernández et al., 2008)
pAM401-64	ABC transporter cloned into pAM401 <i>as-48CC₁DD₁</i>	(Martínez-Bueno et al., 1998)
<i>E. faecalis</i> MRR10-3	Wild type	(Martín-Platero et al., 2006)
<i>E. faecium</i> F58	Wild type	(Achemchem et al., 2006)
<i>E. faecalis</i> A-48-32	Wild type AS-48 producer	(Martinez-Bueno et al., 1990)
JH2-2 (pAM401)	Negative control	(Wirth et al., 1986)
<i>L. innocua</i> 4030	Wild type Indicator strain	CECT
<i>E. faecalis</i> S-47	Wild type Indicator strain	(Gálvez et al., 1985)

(*) Tn5 inserted in gene. (**) All species correspond to *E. faecalis* unless otherwise indicated. ^a CECT, Spanish Type Culture Collection.

2.3. Bacteriocin Production and Purification

Enterocins MR10A/B were purified from 1 L of buffered BHI inoculated with an overnight culture of MRR 10-3 strain and incubated at 37 °C for 10 h. Bacteriocins were recovered by cation-exchange chromatography on carboxymethyl-Sephadex CM-25 (Amersham). Active fractions were identified using *Listeria innocua* as indicator strain and concentrated through reversed-phase chromatography by hydrophobic interaction with a C18 column (Waters Corporation, Milford, MA, USA) (Martín-Platero et al., 2006). Finally, active fractions from the column were lyophilized, dissolved in 1.5 mL of 0.05% acetic acid, and stored at -20 °C. By this procedure, the bacteriocin was concentrated up to 600× with respect to the initial culture concentration.

2.4. *mr10A/B* Gene Cluster Sequencing and Annotation, and Genetic Data

The *mr10A/B* gene cluster (accession no. MW689545) was obtained from the partial sequencing of the *E. faecalis* MRR10-3 genome. The genome library was constructed using a TruSeq DNA PCR-free library preparation kit (Illumina, Inc., San Diego, CA) with an insert size of 350 bp sequenced at Macrogen, Inc. (Seoul, Republic of Korea) with a HiSeq Illumina platform by paired-end sequencing of 2×101 bp read lengths. The genomes were assembled with SPAdes 3.13 (Bankevich et al., 2012) and annotated with Prokka 1.13.3 (Seemann, 2014).

When necessary, the function of *mr10A/B* cluster genes was assigned by searching for homologies with the protein sequence using BLASTP (version 2.11.0+) on an NCBI server with a non-redundant database.

Homologies between *mr10A/B*, *l50*, and *as-48* gene clusters were revealed by aligning in pairs using Blastn suit-2 sequences (Zhang et al., 2000).

Comparisons between MR10A/B and AS-48 pump-forming proteins and between *mr10A/B* and *l50* gene cluster proteins were performed by comparing pairs using Blastp suit-2 sequences (Altschul et al., 1997, 2005).

2.5. Cluster Analyses

Mutants were grouped according to their sensitivity to MR10A/B by performing K-means clustering in R (version 3.6.3) (R Core Team, 2020) using Rstudio (version 1.1.447) (RStudio Team, 2016). First, K-means functioning was used to calculate the optimal number of clusters by the Elbow method. Next, the sensitivity of each group of mutants was exhibited in a heatmap, constructing a dendrogram by the complete-linkage method with ComplexHeatmap (Gu et al., 2016), viridis (Garnier et al., 2021), Stats (R Core Team, 2020), and dendextend (Galili, 2015) packages.

3. Results

3.1. *mr10A/B* Gene Cluster

The *mr10A/B* gene cluster is formed by at least 10 genes (*mr10A*, *mr10B*, *mr10E1*, *mr10F1*, *mr10G1*, *mr10H1*, *as48E*, *as48F*, *as48G*, *mr10H*) (Figure III.2c). Structural genes *mr10A* and *mr10B* encode two leaderless proteins of 134 and 131 amino acid residues, respectively. The putative gene *mr10E1* encodes a Domain of Unknown

Function (DUF) protein family. The putative genes *mr10F1* and *mr10G1* also encode two proteins of unknown function (90 and 141 aa, respectively). The putative *mr10H1* gene encodes a Pleckstrin Homology (PH) domain-containing protein (458 aa). Additionally, the *mr10EFGH* gene cluster constitutes an ABC transport system in which *mr10E* encodes a protein of 163 amino acid residues of unknown function, *mr10F* (406 aa) encodes an efflux Resistance-Nodulation-Division (RND) transporter periplasmic adaptor subunit, *mr10G* (227 aa) encodes an ATP-binding protein, and finally, *mr10H* encodes the ABC transporter permease.

3.2. Homologies between the ABC Transporters

Given the presence of the AS-48 ABC Transporter-2 in the *mr10A/B* gene cluster, the DNA coding sequences for AS-48 (accession no. Y12234 and AJ438950) and MR10A/B genes were compared to quantify their similarity. Blast alignment showed 95.978% identity in the DNA region that includes the *as-48EFGH* genes. Individually, each protein of the ABC transporter showed a high similarity (>95%) except for As-48E and Mr10E, which evidenced 46% identity (Table III.2).

Table III.2. Comparison between MR10A/B and AS-48 pump-forming proteins. The table represents the similarity observed between the ABC transporter proteins of MR10A/B and AS-48.

As-48EFGH	Percentage Identity (%)	Mr10EFGH
As-48E	46.01	Mr10E
As-48F	97.74	Mr10F
As-48G	99.56	Mr10G
As-48H	95.55	Mr10H

In addition, the two gene clusters were compared to analyze differences between the homologous bacteriocins MR10A/B and L50A/B. Both gene clusters had 83% identity at DNA level, although there was an inversion in the structural genes (Figure III.3). High similarities (around 70–87%) were obtained in comparisons of the protein sequence of each individual gene (Supplementary Table SIII.1). However, the *l50* gene cluster described by Ruiz-Barba et al. (Ruiz-Barba et al., 2007) (accession no. DQ198088.1) contains some additional genes. Nevertheless, the *l50* gene cluster re-annotated in RefSeq (accession no. NC_010880.1) matched our annotation of the *mr10A/B* gene cluster, showing the same percentage identity as previously obtained.

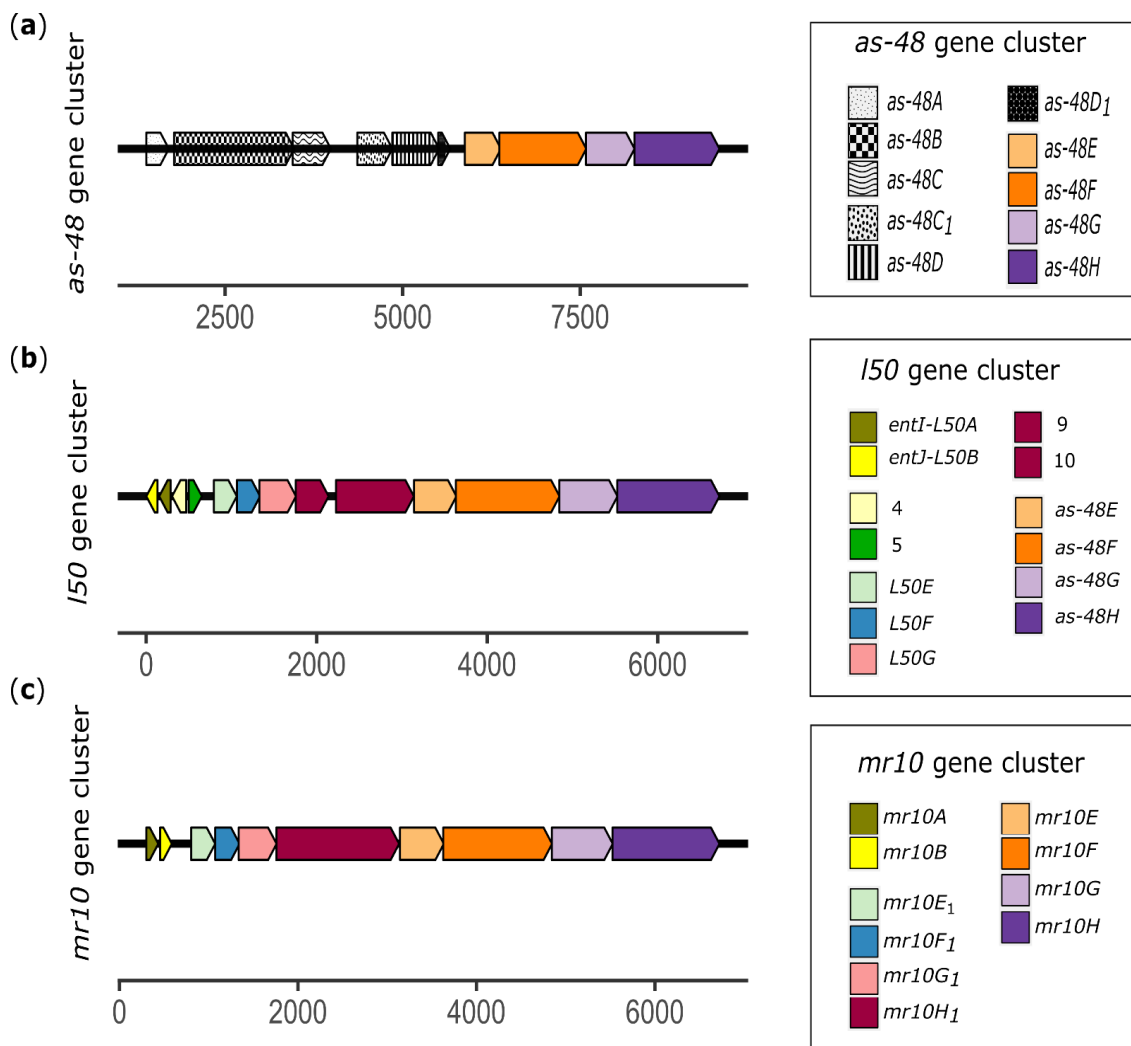


Figure III.2. Genetic organization of AS-48, MR10A/B and L50A/B enterocins. (a) Ten identified open reading frames (ORFs) are depicted in the *as-48* gene cluster, all running in the same direction: *as-48A* (dotted pattern) is the structural gene; *as-48B* (squared pattern) appears to be involved in biosynthetic machinery; *as-48C* (wavy pattern) may encode an auxiliary immunity protein; *as-48C₁* (large dotted pattern) and *as-48D* (striped pattern) form the first pump involved in bacteriocin secretion; *as-48D₁* (black) encodes an immunity protein; *as-48E* (light orange), *as-48F* (dark orange), *as-48G* (light violet), and *as-48H* (dark violet) form a second pump constituted by an ABC transporter-2 involved in self-immunity. (b) Gene cluster of L50A/B enterocins. A total of 13 identified ORFs (Ruiz-Barba et al., 2007) are depicted. *l50A* and *l50B* are the structural genes for enterocins (yellow and olive-green arrows), which are arranged in the opposite orientation to the remaining genes. *orf4* and *orf5* (beige and green arrows) with unknown functions. *L50E*, *L50F*, and *L50G* (light blue, blue and pink arrows, respectively) may encode transporters of the ABC type *orf9* and *orf10* (maroon arrows) with unknown function. Finally, *as-48E* (light orange), *as-48F* (dark orange), *as-48G* (light violet), and *as-48H* (dark violet) constitute a second pump formed by an ABC transporter-2. (c) Gene cluster of MR10A/B enterocins. Ten identified ORFs are depicted, all running in the same direction. *mr10A* and *mr10B* (olive green and yellow arrows) are the structural genes for MR10A and MR10B enterocins; *mr10E₁* (light blue arrow) encodes a DUF (domain of unknown function) protein family; *mr10F₁* and *mr10G₁* (blue and pink arrows) encode two proteins of unknown function. *mr10H₁* gene (maroon arrow) encodes a PH domain-containing protein, and *mr10E*, *mr10F*, *mr10G*, and *mr10H* (light orange, dark orange, light violet, and dark violet arrows, respectively) represent a pump constituted by an ABC transporter.

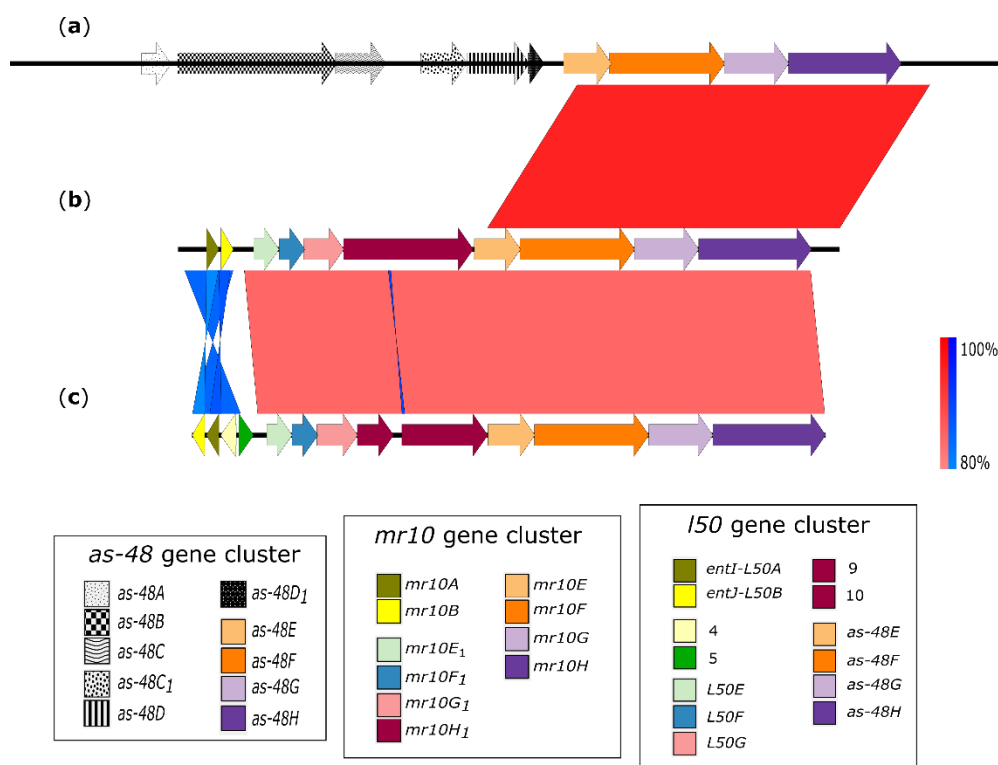


Figure III.3. Homology between gene clusters of enterocins AS-48 (a), MR10A/B (b), and L50A/B (c). The color scale represents the similarity between the different genes: light red and blue = 80% similarity, dark red and blue = up to 100% similarity; red corresponds to direct similarity and blue to inverse similarity. Homologies between *mr10A/B* and *as-48* clusters appear in the last four genes corresponding to ABC Transporter-2.

3.3. Mutant Sensitivity to Enterocins MR10A/B

After MR10A/B bacteriocin purification and concentration, inhibitory assays were performed using several mutants of *as-48* gene cluster as indicator strains. The inhibition halo around the colony was measured to determine the degree of sensitivity of each strain (Figure III.4 and Supplementary Figure SIII.1, Supplementary Table SIII.1 and Supplementary Table SIII.2).

Analysis of the sensitivity of AS-48 mutants to MR10A/B clusters yielded two well-differentiated phenotypic clusters: resistant and sensitive. The common characteristic of resistant mutants was that *as-48EFGH* genes, which encode ABC transporter-2, were intact. Resistance persisted even when other genes of cluster *as-48* were interrupted by Tn5. In fact, the resistance to bacteriocin was even maintained when all genes in the cluster were deleted except for *as-48D₁EFGH*, as in the mutant D1Pst1 (Figure III.4). Conversely, all sensitive strains evidenced a deletion of one or more *as-48EFGH* genes. The main deletions involved *as-48G* and *as-48H* genes

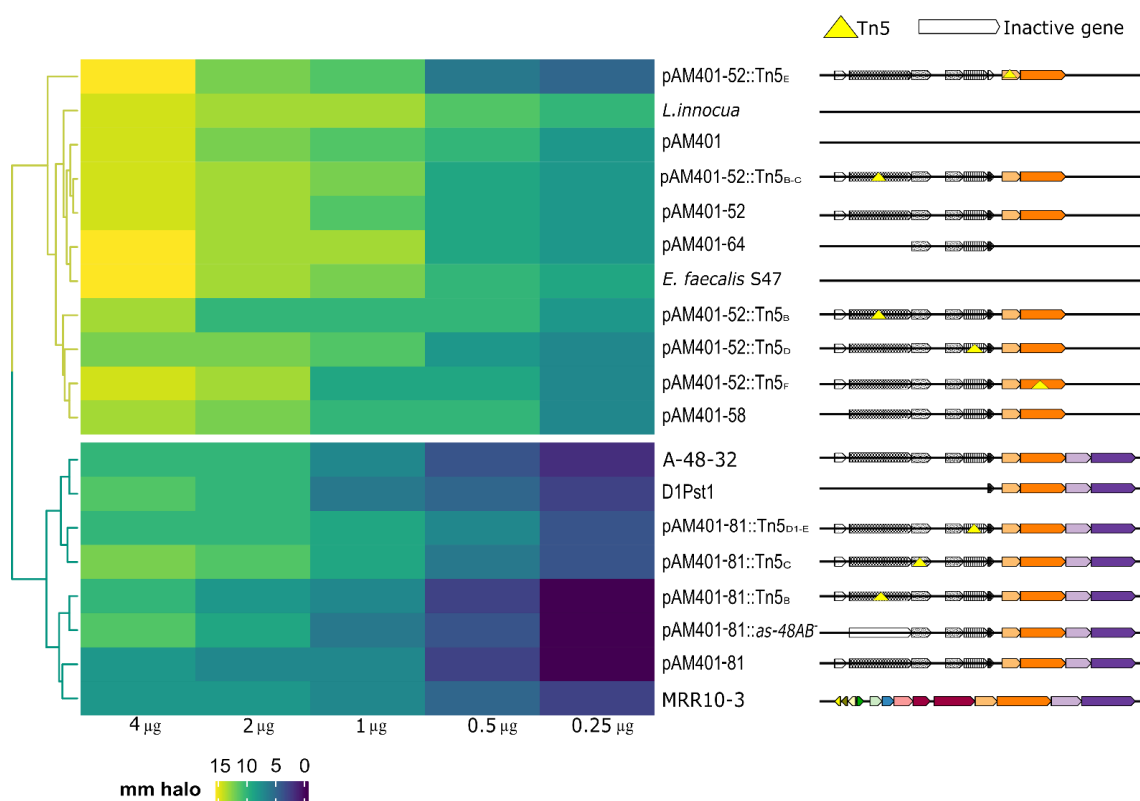


Figure III.4. Sensitivity of AS-48 mutants to MR10A/B. Heatmap depicting the cluster analysis of mutant sensitivity against MR10A/B. Two main clusters emerge: sensitive strains (yellow branches) and resistant strains (blue branches). The sensitive cluster includes all strains without a complete functional ABC Transporter-2, whereas the resistant cluster includes all strains with a complete functional ABC transporter-2. The dendrogram shows the sensitivity of the mutant strains (rows) to different concentrations of MR10A/B (columns). The color scale represents the millimeters of halo around the colony, from dark blue (absence of halo) to yellow (largest halo (15 mm)). The righthand side shows the gene cluster for each mutant: *as-48A*, dotted arrow; *as-48B*, squared arrow; *as-48C*, wavy arrow; *as-48C*, large, dotted arrow; *as-48D*, striped arrow; *as-48D*, black arrow; *as-48E*, light orange arrow; *as-48F*, dark orange arrow; *as-48G*, light violet arrow; and *as-48H*, dark violet arrow. We used 401-81; MRR10-3 and A48-32 (wild phenotypes) served as positive controls and *L. innocua*, *E. faecalis* S-47, and *E. faecalis* 401 as negative controls (non-producers of AS-48 or MR10A/B). *Tn5* is represented by a yellow triangle and an inactivated gene by a white arrow.

4. Discussion

Antimicrobial assays of MR10A/B enterocins against a mutant collection of the *as-48* gene cluster showed that ABC transporters play a role in cross-resistance between bacteriocins of different classes. Although defined as antimicrobial peptides active against close relatives, a wide range of bacteriocins possess activity against more distantly related bacteria (Kommineni et al., 2015). In addition to the role of the resistance genes in self-immunity, the present results show that they can act against several types of antimicrobials and may therefore produce different degrees of resistance to both closely and distantly related bacteria.

Enterocins MR10A/B are variants of L50A/B (Martín-Platero et al., 2006), i.e., class II bacteriocins. A previous study only characterized the structural genes of MR10A/B (Martín-Platero et al., 2006), whereas the present investigation reveals the genetic composition of the whole *mr10A/B* gene cluster, which contains the following 10 genes: two structural genes (*mr10A* and *mr10B*), corresponding to MR10A and MR10B enterocins; four genes (*mr10E1*, *mr10F1*, *mr10G1*, and *mr10H1*) with unknown function and four genes (*mr10EFGH*) that form an ABC transport system. Comparison between *mr10A/B* and the *l50* gene clusters revealed the presence of two additional genes (*orf4*, *orf5*). In addition, *mr10H1* appears split into the open reading frames (ORFs) *orf9* and *orf10* (Ruiz-Barba et al., 2007) (Figure III.3.), and each protein of these two ORFs has a similarity greater than 70% with our annotated protein Mr10H1. Nevertheless, our annotation fits the re-annotation of the *l50* gene cluster included in RefSeq of the NCBI (Figure III.3).

Bacteriocins constitute an active mechanism used by bacteria to antagonize competitors and promote their own survival (Todorov et al., 2019). Bacteriocins produced by LAB are important natural food preservatives and also act against bacterial pathogens, representing a viable alternative to antibiotics (Cotter et al., 2013). Several studies have demonstrated the possibility of cross-resistance between bacteriocins produced by closely related bacterial strains. Fimland et al. (Fimland et al., 2002) studied curvacin A, enterocin A and enterocin B, enterocin P, leucocins A and C, pediocin PA-1 and Sakacin P, which are classified as class II bacteriocins, and reported that a strain transformed with the specific immunity gene for one bacteriocin could show resistance to others in the same class. Oppengård et al. (Oppengård et al., 2010) studied the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071, which are homologous and belong to the same Class (Class II); they found that *Lactococcus* sp. transformed with the enterocin 1071 immunity gene are protected against both enterocin 1071 and lactococcin G, whereas lactococci transformed with the lactococcin G immunity gene were not protected against enterocin 1071. Neither of these immunity proteins protected the lactococci against the two-peptide bacteriocin plantaricin EF, a bacteriocin which is not homologous to lactococcin G or enterocin 1071 (Oppengård et al., 2010).

In this study, cross-resistance was observed between MR10A/B and AS-48 bacteriocins, which belong to different classes (Class II and I, respectively). Antimicrobial activity assays of our *as-48* mutant collection against MR10A/B revealed

the functional role of ABC Transporter-2 (*as-48EFGH*) in this phenomenon. It was found that resistance was retained by mutants with a complete ABC transporter but not by those with absent or incomplete ABC transporter, which were sensitive to the enterocin. This finding suggests that the cross-resistance mechanism of AS-48 and MR10A/B producer strains is based on the presence of functional efflux pumps (ABC transport). The presence of these pumps in the bacterial membrane help to expel antibacterial substances before they reach their target, thereby providing immunity (Reygaert, 2018; Tenover, 2006). Furthermore, in addition to its own specific immunity protein, the ABC Transporter-2 was found to provide the producer with resistance to other enterocins, even to those in a different bacteriocin class. Another explanation may be that AS-48 and MR10A/B share the following structural characteristics: i) a three-dimensional structure similar to a saposin-like fold or α -helical bundle (Towle & Vederas, 2017); ii) a hydrophobic core formed by the helices (typically 4 or 5), with an outer surface that is predominantly hydrophobic and has solvent-exposed tryptophan or tyrosine residues close to the N or C-termini (Towle & Vederas, 2017). These characteristics may favor the recognition by ABC Transporter-2 of both peptides and their expulsion to the extracellular medium, conferring resistance. Nevertheless, we observed that the ABC transport present in the *mr10A/B* gene cluster confers lesser resistance to enterocin AS-48 (data not shown).

The long misuse of antibiotics has increased the number of multidrug-resistant pathogens (Ventola, 2015), generating a high-priority health problem (WHO, 2015). Various alternatives to classic antibiotics are currently under study, including antimicrobial peptides of microbial origin (e.g., bacteriocins) or those from host cells (Lei et al., 2019). However, it is critical to examine the mechanisms and dynamics of resistance associated with an alternative approach. Unlike traditional antibiotics, antimicrobial peptides can interact with the microbial membrane by neutralizing the membrane charge and/or enter the cytoplasm of the cell, producing bacterial death (Lei et al., 2019). They can kill germs rapidly at low concentrations and have even proven effective against antibiotic-resistant strains (Lei et al., 2019). Their mechanisms of action involve multiple low-affinity targets rather than a single high-affinity target, which is the objective of antibiotics (Mahlapu et al., 2016). For this reason, bacteriocins have been considered at low risk of developing resistance. However, *in vivo* and *in vitro* studies have reported that bacteria exposed to therapeutic antimicrobial peptides can select antimicrobial peptide-resistant strains (Dobson et al., 2013; Lofton et al., 2013; Saleh-

Mghir et al., 2011). It is therefore crucial to determine potential patterns of cross-resistance in order to predict cross-resistance between bacteriocins. This knowledge can also help to prevent bacterial cross-resistance to the microbicidal action of human antimicrobial peptides, on which the innate immune system depends. These results also have major implications for the modeling of production/resistance patterns in wild populations and open the way to investigating this cross-resistance in other antimicrobial peptide systems.

5. References

- Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2002). Inhibition of Bacterial Growth, Enterotoxin Production, and Spore Outgrowth in Strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1473-1477. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1473-1477.2002>
- Achemchem, F., Abrini, J., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2370-2376. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.10.2370>
- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 141-150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02586.x>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A. A., & Yu, Y.-K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS Journal*, 272(20), 5101-5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Cebrián, R., Rodríguez-Ruano, S., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Montalbán-López, M. (2014). Analysis of the promoters involved in enterocin AS-48 expression. *PLoS ONE*, 9(3), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090603>
- Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 271-276. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00044-1)
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- de Freire Bastos, M. do C., Coelho, M. L. V., & Santos, O. C. da S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 161(4), 683-700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M. R., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00425-7)
- Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Santos Soler-González, A., Ramírez-Rodrigo, H., & Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48.

- Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1229-1236.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1229-1236.2003>
- Dimov, S., Ivanova, P., & Harizanova, N. (2005). Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 193.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817270>
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin Production: A Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1-6.
<https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>
- Dobson, A. J., Purves, J., Kamysz, W., & Rolff, J. (2013). Comparing Selection on *S. aureus* between Antimicrobial Peptides and Common Antibiotics. *PLoS ONE*, 8(10), e76521-e76521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076521>
- Fallico, V., McAuliffe, O., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Hill, C. (2011). The potential of lactacin 3147, enterocin AS-48, lactacin 481, variacin and sakacin P for food biopreservation. En *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp. 100-121). <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-669-6.50004-2>
- Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., & Maqueda, M. (2008). Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 240-250.
<https://doi.org/10.1128/JB.01528-07>
- Fimland, G., Eijsink, V. G. H., & Nissen-Meyer, J. (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*, 148(11), 3661-3670.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3661>
- Galili, T. (2015). dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 31(22), 3718-3720.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv428>
- Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., & Montoya, E. (1985). Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios*, 43(176S), 223-232.
- Garnier, S., Ross, N., Rudis, R., Camargo, A. P., Sciaini, M., & Scherer, C. (2021). *Rvision—Colorblind-Friendly Color Maps for R (0.6.2.)*. <https://sjmgarnier.github.io/viridis/>
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833-845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K. B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchar, Y., Hastings, J. W., & Knøchel, S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 148, 2361-2369.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2361>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., & Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 489-492. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg362>
- Jozala, A. F., Novaes LC, L., & Pessoa A, J. (2015). Nisin. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. <https://doi.org/10.5772/60932>
- Kaur, G., Singh, T. P., & Malik, R. K. (2013). Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 63-71. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000025>
- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C. J., & Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575), Art. 7575. <https://doi.org/10.1038/nature15524>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development

- in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lei, J., Sun, L. C., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. Y. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919-3931.
- Liu, G., Song, Z., Yang, X., Gao, Y., Wang, C., & Sun, B. (2016). Antibacterial mechanism of bifidocin A, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04. *Food Control*, 62, 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.033>
- Lofton, H., Pránting, M., Thulin, E., & Andersson, D. I. (2013). Mechanisms and Fitness Costs of Resistance to Antimicrobial Peptides LL-37, CNY100HL and Wheat Germ Histones. *PLoS ONE*, 8(7), e68875-e68875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068875>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M., Sanchez-Barrena, M., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., & Valdivia, E. (2004). Peptide AS-48: Prototype of a New Class of Cyclic Bacteriocins. *Current Protein & Peptide Science*, 5(5), 399-416.
<https://doi.org/10.2174/1389203043379567>
- Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., & Maqueda, M. (1990). A transferable plasmid associated with AS-48 production in *enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2817-2818. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2817-2818.1990>
- Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., & Maqueda, M. (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 27(2), 347-358.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00682.x>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010032>
- Ogaki, M. B., Rocha, K. R., Terra, M. R., Furlaneto, M. C., & Furlaneto-Maia, L. (2016). Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1026-1034.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09020>
- Oppegård, C., Emanuelsen, L., Thorbek, L., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2010). The Lactococcin G Immunity Protein Recognizes Specific Regions in Both Peptides Constituting the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1267-1273. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-09>
- R Core Team. (2020). *A Language and Environment for Statistical Computing* (4.0.2). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rebuffat, S. (2011). Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification? En D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* (pp. 55-72). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_4
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- RStudio Team. (2016). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (3.6). RStudio, Inc. <http://www.rstudio.com/>
- Ruiz-Barba, J. L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A., & Jiménez-Díaz, R. (2007). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid*, 57(2), 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.06.003>
- Saleh-Mghir, A., Muller-Serieys, C., Dinh, A., Massias, L., & Crémieux, A. C. (2011). Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit

- prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4589-4593.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00675-11>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2020). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, fuaa039, 1-24. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 34(5), S3-S10. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., & Tagg, J. R. (2019). Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial Microbes*. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0126>
- Toit, M., Franz, C. M., Dicks, L. M., & Holzapfel, W. H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 482-494.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00986.x>
- Towle, K. M., & Vederas, J. C. (2017). Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *MedChemComm*, 8(2), 276-285. <https://doi.org/10.1039/C6MD00607H>
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farías, M. E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W., & Oliver, G. (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology*, 41, 410-416.
<https://doi.org/10.1007/s002840010159>
- Wang, H., Fewer, D. P., & Sivonen, K. (2011). Genome mining demonstrates the widespread occurrence of gene clusters encoding bacteriocins in cyanobacteria. *PloS One*, 6(7), e22384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022384>
- WHO. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*.
<https://www.who.int/publications-detail-redirect/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance>
- Wirth, R., An, F. Y., & Clewell, D. B. (1986). Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *Journal of Bacteriology*, 165(3), 831-836. <https://doi.org/10.1128/jb.165.3.831-836.1986>
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
<https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

6. Supplementary material

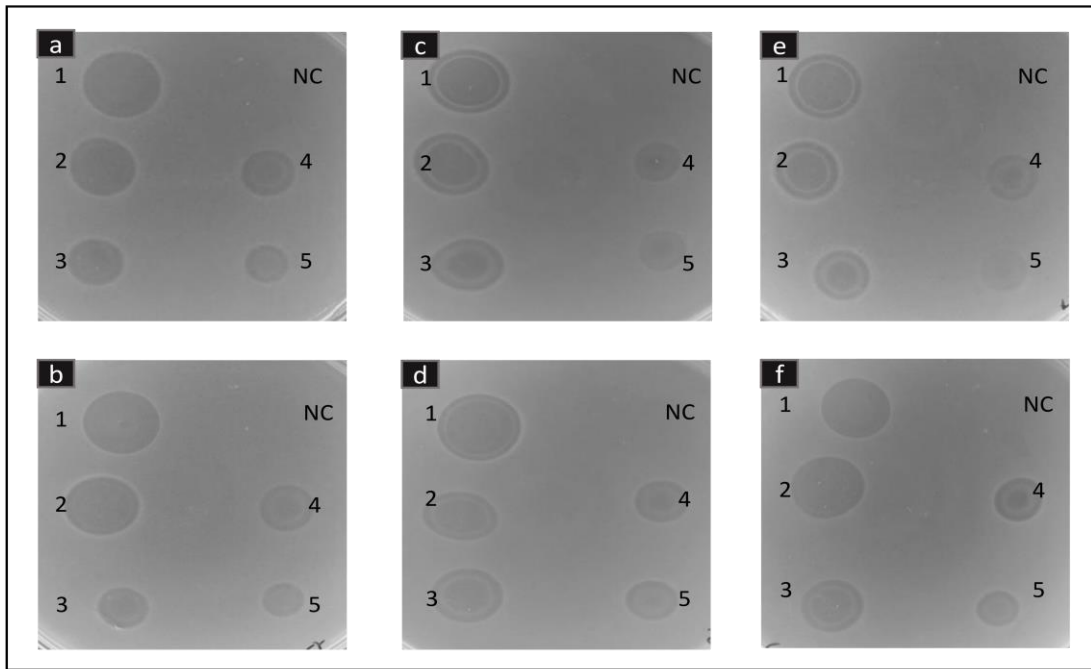
Supplementary Table SIII.1. Comparison between putative proteins of *mr10* and *l50* gene clusters. Table shows similarity between the proteins of the *mr10* cluster (MW689545) and the *l50* cluster deposited in Refseq (accession no. NC_010880.1) and in Genbank (accession no. DQ198088.1).

<i>l50</i> cluster Refseq	Per.Ident (%)	<i>mr10</i> cluster	Per.Ident (%)	<i>l50</i> cluster Genbank
L50E	87.64%	Mr10E1	87.64%	L50E
Orf7	74.44%	Mr10F1	74.44%	L50F
Orf8	79.02%	Mr10G1	79.02%	L50G
Orf9	77.60%	Mr10H1	77.60%	Orf9
-	-	Mr10H1	74.09%	Orf10
As-48E	73.62%	Mr10E	73.62%	As-48E
As-48F	75.68%	Mr10F	75.68%	As-48F
As-48G	92.51%	Mr10G	92.51%	As-48G
As-48H	89.22%	Mr10H	89.22%	As-48H

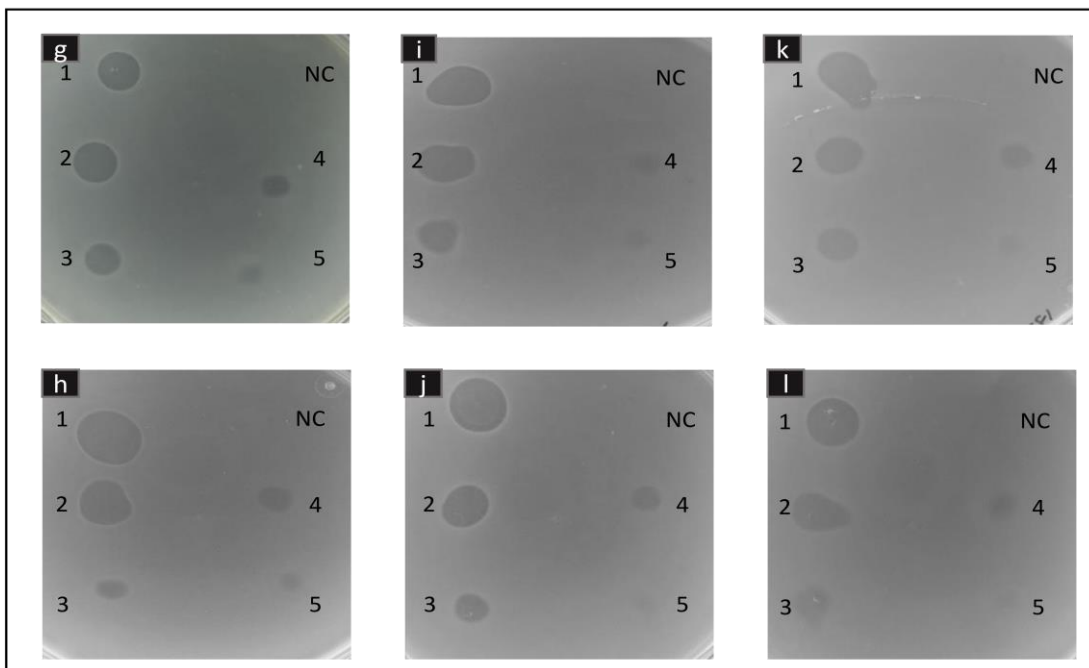
Supplementary Table SIII.2. Inhibition halo (expressed in mm) of each *E. faecalis* strain against different concentrations of MR10A/B bacteriocin.

	4 µg	2 µg	1 µg	0.5 µg	0.25 µg
(a) JH2-2 (pAM401)	14	12	11	10	8
(b) pAM401-64	15	13	13	9	8
(c) JH2-2(pAM401-52)	14	13	11	9	8
(d) JH2-2(pAM401-52::Tn5F)	14	13	9	9	7
(e) JH2-2(pAM401-52::Tn5B-C)	14	13	12	9	8
(f) JH2-2(pAM401-52::Tn5D)	12	12	11	8	7
(g) <i>E. faecalis</i> MRR10-3	8	8	7	5	3
(h) <i>E. faecalis</i> A-48-32	10	10	7	4	2
(i) JH2-2(pAM401-81)	8	7	6	3	0
(j) DIPst1	11	10	6	5	3
(k) JH2-2 (pAM401-81:: as-48AB-)	11	9	6	4	0
(l) JH2-2(pAM401-81::Tn5B)	10	8	7	3	0

(I)



(II)



Supplementary Figure SIII.1. Antibacterial activity assays. (I) *E. faecalis* AS-48 strains without a functional AS-48 Transporter-2 against different concentrations of MR10A/B bacteriocin. (II) *E. faecalis* AS-48 strains with a functional AS-48 Transporter-2 against different concentrations of MR10A/B bacteriocin. Letters (a) to (l) represent each mutant: (a) JH2-2(pAM401), (b) JH2-2(pAM401-52::Tn5_F), (c) pAM401-64, (d) JH2-2(pAM401-52::Tn5_{B-C}), (e) JH2-2(pAM401-52), (f) JH2-2(pAM401-52::Tn5_D), (g) *E. faecalis* MRR10-3, (h) D1Pst1, (i) *E. faecalis* A-48-32, (j) JH2-2(pAM401-81::as-48AB-), (k) JH2-2(pAM401-81) and (l) JH2-2(pAM401-81::Tn5_B). Numbers 1 to 5 represent amount of bacteriocin available in each spot, where: (1) 4 µg, (2) 2 µg, (3) 1 µg, (4) 0.5 µg and (5) 0.25 µg. (NC) Negative control (Bacteriocin dilution solution (acetic acid 0.05 %)). The size of each inhibition halo are shown in Supplementary Table SIII.2.

CAPÍTULO IV. Cross-resistance groups in enterococcal populations by means of ABC-transporter immunity

Claudia Teso-Pérez¹, Manuel Martínez-Bueno¹, Juan M. Peralta-Sánchez¹, Eva Valdivia¹, M. Esther Fárez-Vidal^{2, 3*}, Antonio M. Martín-Platero^{1*}

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18016 Granada, Spain

³ Instituto de Investigación Biomédica IBS, Granada, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Abstract

Microbes live within complex communities of interacting populations, either free-living in waters and soils or symbionts of animals and plants. Their interactions include the production of antimicrobial peptides (bacteriocins) to antagonize competitors, and these producers must carry their own immunity gene for self-protection. Cross-resistance between different bacteriocins has been reported in ABC transporter-mediated immunity, but the spread of cross-resistance in wild populations has not been evaluated. The study aim was to determine whether the immunity or resistance genes of a bacteriocin spread further into multiple bacterial populations. The ABC transporter of the enterocin MR10A/B gene cluster of *Enterococcus faecalis* MRR10-3 served as cross-resistance model. Our group previously observed that this transporter participates in cross-resistance with enterocin AS-48, a different class of enterocin produced by *E. faecalis* S-48. The present study explored whether the homologous ABC transporter encoded by this gene cluster was associated with other bacteriocins or enterococcal populations. Thus, by screening the MR10A/B-ABC transporter in microbial genomes, and analyzing sequence homologies and distribution, we have mainly found: i) the MR10A/B-ABC transporter is associated to multiple enterocin gene clusters; ii) the enterocins associated to this transporter have in common a saposin-like fold; iii) the Mr10E component of the transporter is more conserved within its enterocin rather than its carrying species. Taking into account the presence of a common resistance system among different populations will be crucial to develop more precise models of production/resistance dynamics in the wild. Further research will have to investigate the specific evolutionary mechanisms involved in the transference of the immunity transporter.

Keywords: *Enterococcus*, ABC transporter, cross-resistance, enterocin L50, enterocin AS-48, carnocyclin.

1. Introduction

Microbes usually live in complex communities composed of numerous interacting populations (Whitman et al., 1998; Widder et al., 2016), and thousands of microbial species can be found in the human gut (Claesson et al., 2009) or in a single drop of water (Azam & Malfatti, 2007). A complex network of interactions drives the community structure in this crowded scenario (Martin-Platero et al., 2018), including antagonisms (Faust & Raes, 2012), which play a major role in shaping the balance between populations. In the case of human and animal symbionts, the nature of the population established is crucial to its effect on the host. In this way, the Gram-positive *Enterococcus faecalis*, a habitual component of the human microbiota (Lebreton et al., 2014) can have a positive (commensal) or negative (pathogenic) effect on the host according to the enterococcal population. Some strains can improve the health of the host (Krawczyk et al., 2021), but others are recognized as important opportunistic pathogens (Raven et al., 2016) For instance, strains that produce cytolysin (an antimicrobial peptide) have been associated with greater hepatic damage in patients with alcoholic hepatitis (Duan et al., 2019).

The production of bacterial antimicrobial peptides (bacteriocins) is a common trait of *enterococci* (also referred to as enterocins) (Ness et al., 2014). These antimicrobials generally act against close relatives, although some show a wide antimicrobial spectrum (Jack et al., 1995) and may therefore play an important role in driving niche colonization by specific populations and in establishing the final community structure. In this way, enterocin-producing *E. faecalis* populations have been found to outcompete other enterococcal populations in colonizing mammal gut microbiota. Kommineni and coworkers (2015) reported that an *E. faecalis* producer of bacteriocin 21 (identical to AS-48 enterocin) was able to replace indigenous enterococcal populations in mice. This competitive exclusion implies that indigenous populations are susceptible to the bacteriocin produced. However, elucidation of the population dynamics and production/resistance patterns among wild populations requires knowledge of patterns of resistance to bacteriocins, which is currently very limited.

Bacteriocin producers must carry their own immunity gene to avoid self-inhibition (Riley & Wertz, 2002). It is usually grouped within the gene cluster for bacteriocin

production, located at chromosome, plasmid, or other mobile genetic elements (Kumariya et al., 2019). Various immunity mechanisms are involved in self-protection, such as specific membrane immunity proteins or proteases or multi-drug transporters (de Freire Bastos et al., 2015), including multi-component ATP-binding cassette (ABC) transporters, which form part of the immunity/resistance system in several bacteriocins. This is the case of circular bacteriocins (such as the aforementioned AS-48), in which the immunity plays a role in resistance, as well as the ABC transporter that expels the bacteriocin from the cell (van Belkum et al., 2011). Besides their producers, non-producers can also display resistance to bacteriocins, which can be broadly classified as acquired or innate resistance. The latter is intrinsic to particular genera or species and is due to the presence of ‘orphan immunity genes’, bacteriocin degradation mechanisms D-alanylation of teichoic acids of cell-wall, L-lysinylation of cell-membrane phospholipids, or the growth phase in which the bacteria are found (Cotter et al., 2013; Gradisteanu Pircalabioru et al., 2021; Kumariya et al., 2019). For its part, acquired resistance can be generated by the spontaneous mutation of associated genes involved in the expression of specific receptors, cell wall synthesis, transcriptional regulation or energy metabolism and transport, or by alteration in bacterial cell membrane hydrophobicity due to changes in its fatty acid composition or membrane receptors (Kumariya et al., 2019; Soltani et al., 2020). Importantly, bacteria can not only be resistant but can also develop co-resistance and cross-resistance to one or two types of bacteriocins; however, there are few reports on this issue in the literature, and results have been contradictory. Co-resistance mainly appears when a producer strain is resistant to another bacteriocin of the same class, while cross-resistance takes place when a bacterial strain develops resistance to a different class of bacteriocin or to antibiotics (Soltani et al., 2020). However, the latter has largely been observed by experimental manipulation (Obolski et al., 2016), and little is known about cross-resistance in wild populations.

Our group previously reported cross-resistance between *E. faecalis* MRR10-3 and *E. faecalis* A-48-32 (Teso-Pérez et al., 2021), which produce bacteriocins of distinct classes, *i.e.*, enterocin MR10A/B (class II- not posttranslationally modified) and enterocin AS-48 (class I- posttranslationally modified), respectively. Both strains share a homologous ABC-type transport system (Mr10EFGH and As-48EFGH, respectively) involved in self-immunity and cross-resistance (Teso-Pérez et al., 2021). ABC transporters are widespread in multiple organisms and generally comprise four core

domains: two transmembrane domains (TMDs) and two hydrophilic and peripheral cores, where Walker A and Walker B motifs and the C-loop and the D-loop (two hallmarks of the transporters) are associated with the cytoplasmic surface of the membrane (Wilkins, 2015). Periplasmic binding proteins are needed in some cases to confer affinity, specificity, and directionality to the ABC transporter, as well as peripheral or auxiliary proteins (Higgins, 2001). In the case of the ABC transporter share by both gene cluster, Mr10E and Mr10F components correspond, respectively, to the accessory protein and transmembrane permease domains of the ABC transporter, while Mr10G and Mr10H correspond to the ATP binding domain and permease, respectively.

The aim of this study was to determine whether the ABC transporter involved in MRR10-3 and A-48-32 cross-resistance was widespread among wild populations. A search of the ABC transporter in public databases revealed its presence in multiple enterococcal populations, associated with different bacteriocins and enterococcal species and a low frequency of orphan strains.

2. Material and methods

2.1. Mr10EFGH ABC transporter screening.

To analyze the distribution of the enterocin immunity Mr10EFGH ABC transporter, a search for its homologues was undertaken in public databases, first exploring taxa that might carry an ABC transporter homologous to Mr10EFGH. A search was also conducted for protein sequences encoded by *mr10E*, *mr10F*, *mr10G*, and *mr10H* belonging to the *mr10* gene cluster (GenBank accession no. MW689545) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using blastp (version 2.10.0+; Max target sequences: 1000; Expect threshold: $1e^{-6}$) (Altschul et al., 1997) among *Enterococcus* and non-*Enterococcus* species. Next, the full genetic context of ABC transporters was obtained by downloading all genomes from NCBI RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) (06/04/2020) corresponding to the genera that showed a hit with any of the *mr10EFGH* genes. This procedure yielded 64116 genomes corresponding to 121 genera (Supplementary Table SIV.1), and a blast database of these genomes was created with makeblastdb (blast 2.10.1+) (Camacho et al., 2009) and used for further analysis. A search was then made for ABC transporter homologous to Mr10EFGH in our own genomic database by running a tblastn for each protein (2.10.1+; Expect threshold: $1e^{-6}$) (Altschul et al., 1997). False positives were minimized by considering only hits with more

than 40% identity and 70% coverage as positive (Rost, 1999), defining hits placed at the expected position and distance (± 500 bp) in each genome as full ABC transporter, using the *mr10* gene cluster as reference (Teso-Pérez et al., 2021). It was also determined whether the transporter was located at plasmid or chromosome by using PlasClass software to analyze its corresponding molecule/contig (Pellow et al., 2020). PlasClass uses four logistic regression models to classify sequences of different length and assigns class probabilities to each sequence. A sequence is classified as having a plasmid origin if the probability that it belongs to the plasmid class is > 0.5 (Pellow et al., 2020).

2.2. Analysis of Mr10EFGH ABC transporter association with bacteriocin structural genes.

A search was conducted of bacteriocin structural genes in our genomic database to determine whether the *mr10EFGH* ABC transporter belonged to a genetic cluster involved in bacteriocin production. For this purpose, tblastn (version 2.10.1+) was run (Altschul et al., 1990; Camacho et al., 2009) with a 10^{-6} e-value threshold to search for the bacteriocins of the BACTIBASE database (Zouhir et al., 2010) plus a bacteriocin showing hits in a previous analysis (GenBank accession no. WP_002368637.1) with our previously generated genomic database. False positives were again minimized by defining only hits with more than 40% identity and 70% coverage as positive (Rost, 1999). When several hits were obtained at the same position, the hit with highest percentage identity was considered. Finally, the *mr10EFGH* ABC transporter was considered part of a bacteriocinogenic gene cluster when the bacteriocin structural gene was at the expected distance from the transporter (± 500 bp), using *mr10A/B* (GenBank accession no. MW689545), *as-48* (GenBank accession no. Y12234 and AJ438950), and *cclA* (GenBank accession no. NZ_AYLU01000046.1) gene clusters as references.

2.3. Comparative genomic analysis of the Mr10EFGH ABC transporter genetic context

The level of synteny up- and down-stream from the transporter was studied by comparing a region of 10,000 bp containing the *mr10EFGH* transporter using easyfig software (version 2.1) (Sullivan et al., 2011) between different groups of transporter-carrying strains.

2.4. Phylogenetic analysis

The relationship between transporters observed in different genomic scenarios was studied by phylogenetic analysis of the transporter and corresponding populations. To this end, a phylogenetic tree was constructed with each gene independently (*i.e.*, *mr10E*, *mr10F*, *mr10G*, and *mr10H*) and with the full transporter, using the concatenated alignment of each individual gene. Each multiple sequence was aligned by applying the clustalW algorithm in MEGA-X (version 10.1.8) (Kumar et al., 2018). In all cases, a maximum likelihood tree was constructed with MEGA-X (version 10.1.8; N° Bootstrap Replications: 1000; Tamura-Nei model).

The mobility of the transporter was examined by constructing a phylogenetic tree of the enterococcal populations carrying the transporter. First, all genomes that hit with each transporter protein independently were annotated, using Prokka (version 1.12) (Seemann, 2014). Next, the pangenome was calculated using Roary software (version 3.11.2) (Page et al., 2015), which generates a multi-FASTA alignment of all core genes that are then used to construct the phylogenetic tree with MEGA-X software.

2.5. Protein specificity

The protein specificity of each Mr10EFGH transporter protein was determined by cluster analysis. An identity matrix was first generated by multiple sequence alignment using Clustal Omega (Sievers et al., 2011) and then converted into a distance matrix using R software (version 4.1.2) embedded in Rstudio software (R Core Team, 2021). A dendrogram was constructed using the `hclust` function (“complete” method) from the `stats` package (R Core Team, 2021). `RColorBrewer` (Neuwirth, 2022) and `dendextend` (Galili, 2015) packages were also used.

3. Results

3.1. Mr10EFGH ABC transporter taxonomic distribution

The Mr10EFGH ABC transporter involved in MR10A/B self-immunity proved to be specific to the genus *Enterococcus*, especially to *E. faecalis* and *Enterococcus faecium*. Homologous genes for each of the four transporter components appear in a wide range of genera, although most of this range is attributable to the wide distribution of Mr10G and Mr10H. The taxonomic range of Mr10E is narrower, limited to the genus *Enterococcus* alone, although fine-grained screening to maximize true positives (with >40% identity

and >70% coverage) identified homologous proteins to this transporter in 14 genera (Table IV.1). However, only *Enterococcus* showed complete ABC transporters homologous to Mr10EFGH (Table IV.1) when each transporter component was checked against its expected position. The full transporter was solely found in *E. faecalis* (x29), *E. faecium* (x47), *E. durans* (x2), *E. phoeniculicola* (x3), *E. hirae* (x1), and *Enterococcus sp.* (x3).

Table IV.1. Genera with proteins homologous to each component of the Mr10EFGH transporter.

Genus	Mr10E	Mr10F	Mr10G	Mr10H	Complete ABC transporter
<i>Alkalibacterium</i>	0	0	0	1	0
<i>Carnobacterium</i>	0	2	8	3	0
<i>Clostridioides</i>	0	0	8	2	0
<i>Desemzia</i>	0	0	0	1	0
<i>Floricoccus</i>	0	2	2	2	0
<i>Garciella</i>	0	0	0	2	0
<i>Granulicatella</i>	0	0	0	1	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	12	0
<i>Lactococcus</i>	0	1	1	10	0
<i>Marinilactibacillus</i>	0	0	0	6	0
<i>Sedimentibacter</i>	0	0	2	1	0
<i>Streptococcus</i>	0	1	2	1	0
<i>Trichococcus</i>	0	0	20	13	0
<i>Enterococcus</i>	85	130	756	390	85

3.2. Mr10EFGH ABC transporter genomic distribution

The *mr10EFGH* ABC transporter involved in MR10A/B self-immunity was found to be widespread among *E. faecalis* and *E. faecium* (Table IV.1; Figure IV.1), although it showed specific variations according to the carrier species and genetic context. The reference transporter was from *E. faecalis* within the *mr10A/B* gene cluster for the production of enterocins MR10A/B, but it was associated with three other types of bacteriocins (i.e., AS-48, uberolysin/circularin family circular bacteriocin, and carnocyclin A) and even with orphans of any bacteriocin structural gene (Figure IV.2).

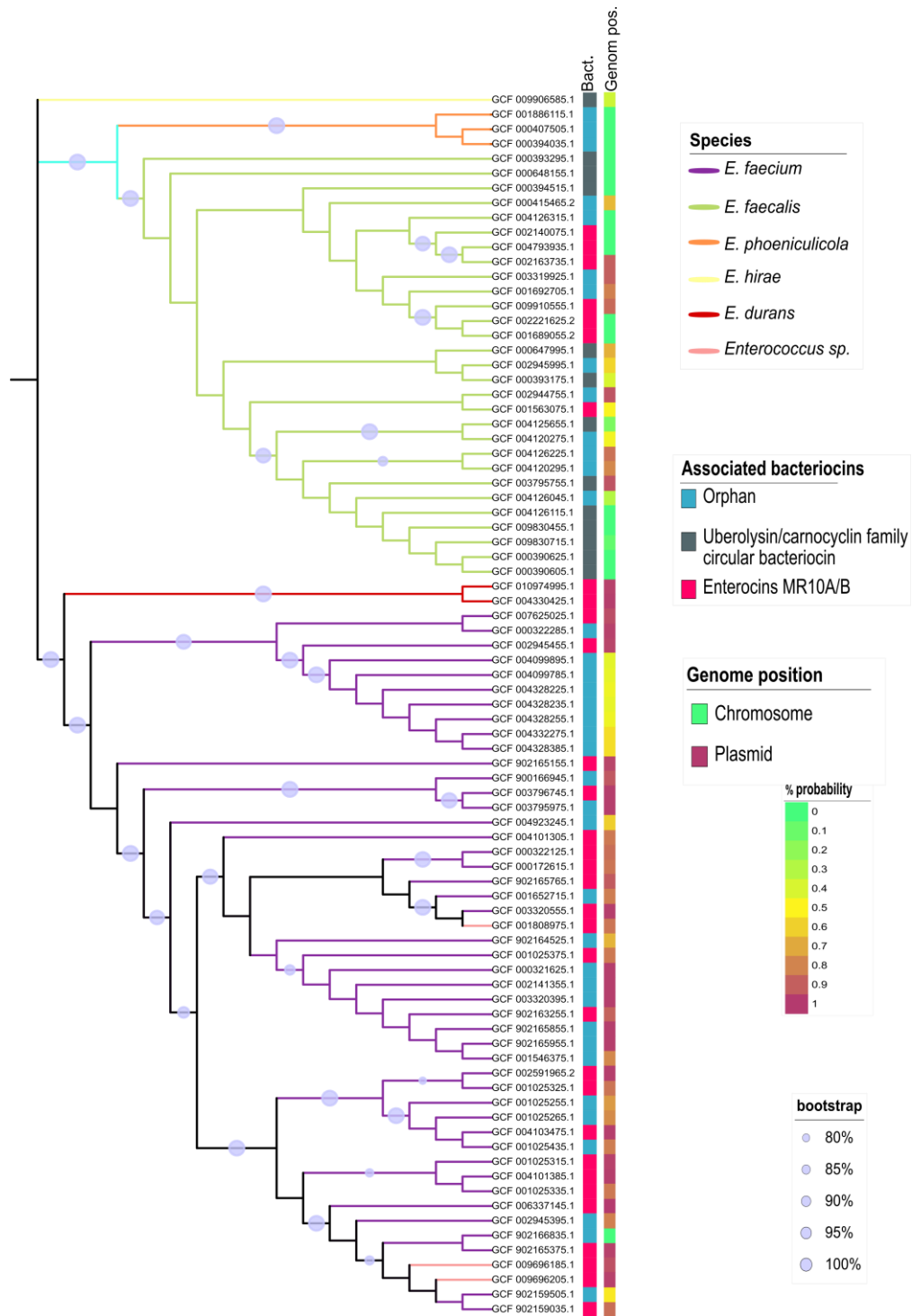


Figure IV.1. Mr10EFGH transporter phylogenetic tree. The image represents the phylogenetic tree of the ABC transporter of the *mr10A/B* gene cluster. From left to right, the first annotation bar represents the bacteriocin associated with MR10A/B transporter. Three cases can be observed: the orphan MR10A/B transporter in bacteriocin (light-blue), associated with circular bacteriocins (gray) or associated with leaderless bacteriocins (pink). The second bar represents the plasmid (violet) or chromosome (green) position of the contig in the genome. The color of branches represents the species associated with each case. The majority species with this transporter are *E. faecalis* (light-green) and *E. faecium* (violet), although it also appears in *E. phoeniculicola* (orange), *E. hirae* (light-yellow), *E. durans* (red), and *Enterococcus sp.* (light-pink). The gray dot located on the branches of the tree represents the bootstrap value (represented values between 80-100%).

These other bacteriocins are class I circular bacteriocins, whereas MR10A/B and MR10-like bacteriocins are class II leaderless bacteriocins. Within each bacteriocin type, its corresponding gene cluster was conserved, but only the MREFGH transporter was shared between them (Figure IV.2 and Figure IV.3).

Therefore, this transporter did not show a strong conservation of its genetic context either up- or down-stream. Solely gene clusters for bacteriocin production of the same type were conserved (Figure IV.3).

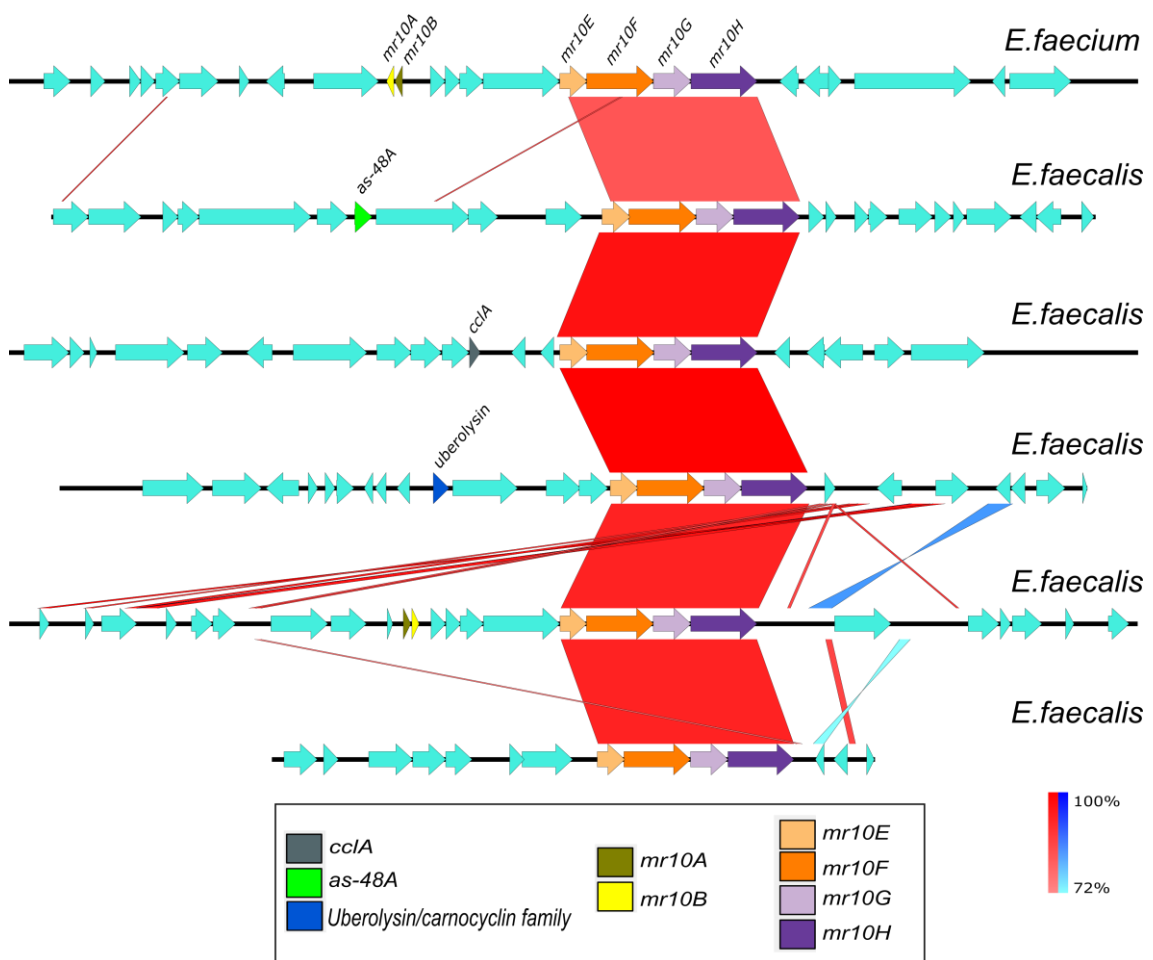


Figure IV.2. Comparison between different bacteriocin gene clusters. The figure shows the homologies found when comparing contigs from different species that contain the *mr10EFGH* transporter associated with the structural genes of enterocins MR10A/B (yellow and gold arrows), AS-48 (green arrow), carnocyclin A (gray arrow), uberolysin enterocins family (blue arrow) and orphan in bacteriocins. Similarities are conserved only at the ABC transporter level.

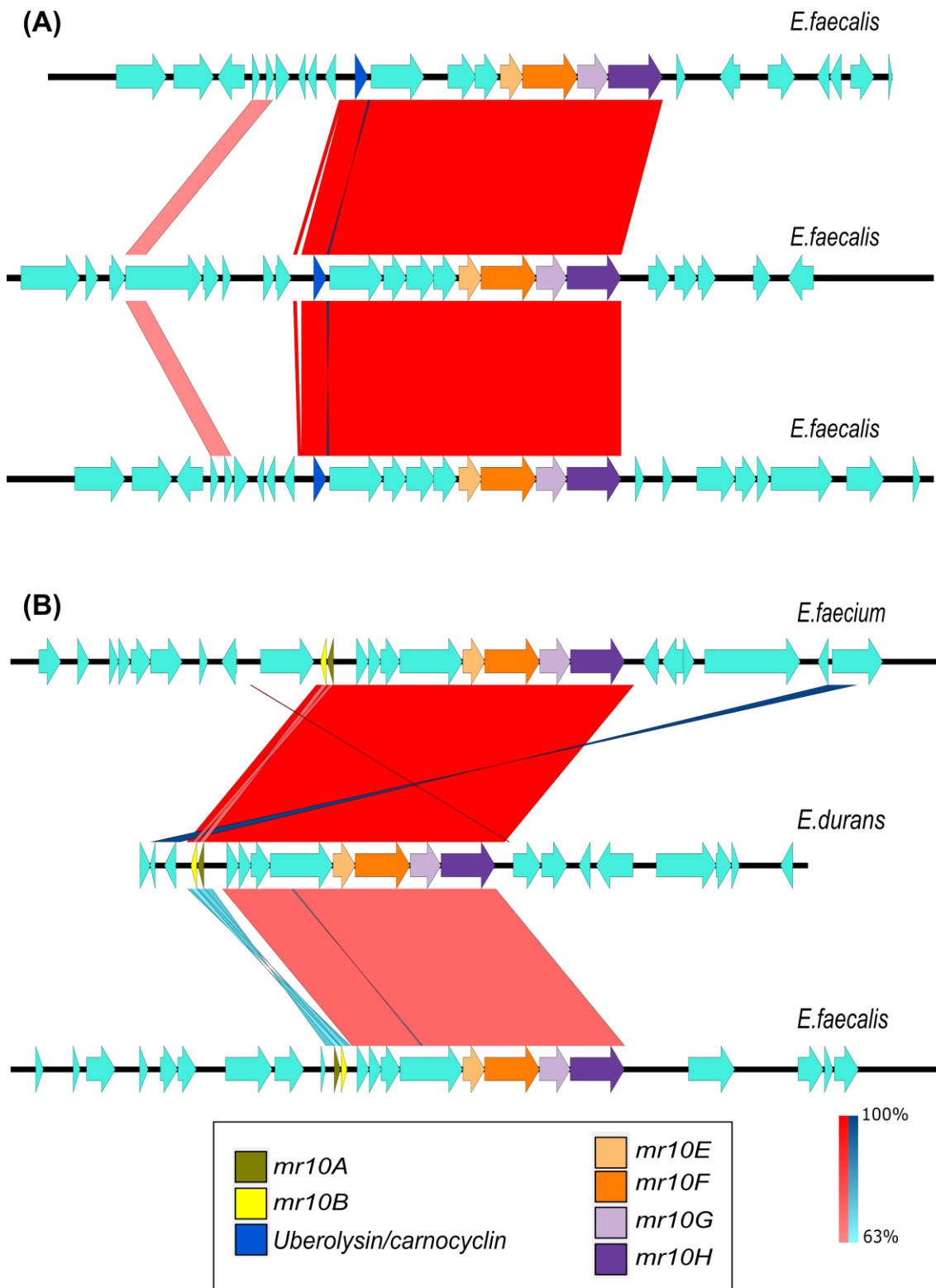


Figure IV.3. Comparison between contigs containing the transporter Mr10EFGH associated with the same bacteriocin. Panel A shows the comparison between contigs that contain the ABC transporter associated with structural genes of uberolysin enterocins family (blue arrow). Panel B shows the similarity between contigs that contain the ABC transporter associated with structural genes of MR10A/B enterocins (yellow and gold arrows). In both cases, the homologies are maintained at gene cluster level. The similarity varies between 63% (light-red) and 100% (dark-red).

However, the level of variation was considerably higher in *E. faecalis* than in *E. faecium*. While the transporter was associated with four different bacteriocins in *E. faecalis*, it was solely associated with MR10-like bacteriocins in *E. faecium* (Figure IV.2). Besides, there were a few cases of orphan transporters in both species. In some cases, these orphan genomes were the result of incomplete contigs, e.g., NZ_LWHF01000045.1 (*Enterococcus faecium* strain 17OM39), NZ_PKMN01000041.1 (*Enterococcus faecalis* strain EN788) or NZ_LDND01000117.1 (*Enterococcus faecium* strain KACC15711); however, they were evident orphan transporters in some cases, i.e., GenBank accession no. NZ_CABHDR010000049.1 (*Enterococcus faecium* strain 4928STDY7387731), GenBank accession no. NZ_KE352861.1 (*Enterococcus faecalis* LA3B-2 Scaffold63), or GenBank accession no. NZ_KB946329.1 (*Enterococcus phoeniculicola* ATCC BAA-412 acvKI-supercont1.7). In addition, the transporter is placed at both chromosomes and plasmids in these cases, whereas it is only observed at plasmids in *E. faecium* and there is no specific pattern of placement in *E. faecalis* (Figure IV.1).

3.3. Molecular evolution of the Mr10EFGH ABC transporter

Besides the differential distribution of the *mr10EFGH* ABC transporter, each transporter component showed different amino acid sequences according to the bacteriocin structural gene or the bacterial species. Specifically, the primary sequence of the Mr10E was constrained by its associated bacteriocin, while Mr10F, Mr10G, and Mr10H were more conserved within each enterococcal species (Figure IV.4). In other words, Mr10E was more similar between those in the same bacteriocin, while Mr10F, Mr10G, and Mr10H were more similar between the same enterococcal species, independently of the associated enterocin. Hence, Mr10F, Mr10G, and Mr10H phylogenies agree with the enterococcal taxonomy, while Mr10E agrees with the phylogeny of the enterocin structural gene (Figure IV.4).

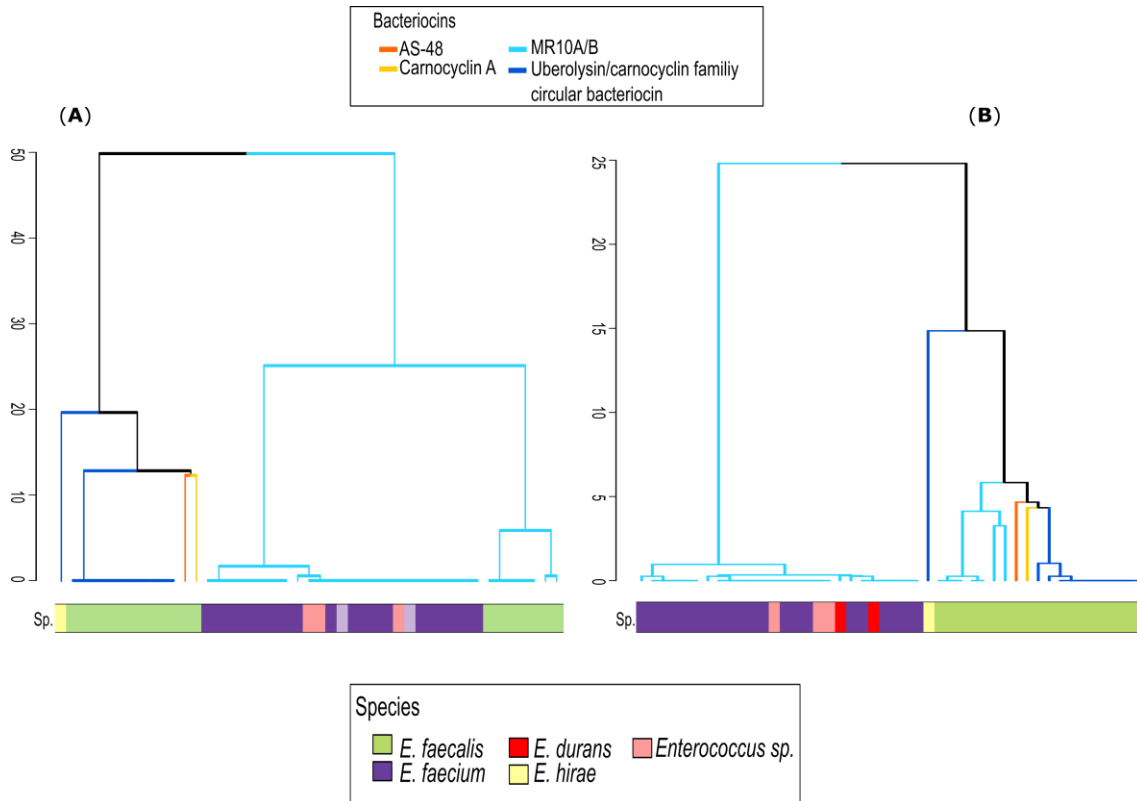


Figure IV.4. Protein similarity between the different carriers of Mr10E (A) and Mr10F(B) proteins. The color of the branches represents the bacteriocin associated with each ABC transporter: light blue = enterocins MR10A/B, darkblue = uberolysin, yellow = carnocyclin A, and orange = AS-48. The color bar represents the strain corresponding to each contig: light-green = *E. faecalis*, violet = *E. faecium*, red = *E. durans*, yellow = *E. hirae*, and pink = *Enterococcus sp.* Mr10E shows greater similarities with those associated with the same bacteriocin, while Mr10F shows higher similarities with those from the same species.

At any rate, a differential evolutionary history from the enterococcal population is observed for each component of the ABC transporter and for the complete enterocin gene cluster, as shown by the discrepancies between genome and transporter phylogenies (Figure IV.5). Indeed, although there are some clades enriched in some enterocins, neither the enterocins nor the transporter form monophyletic clades (Figure IV.6). This implies that there is no common ancestor that includes all of the same bacteriocins.

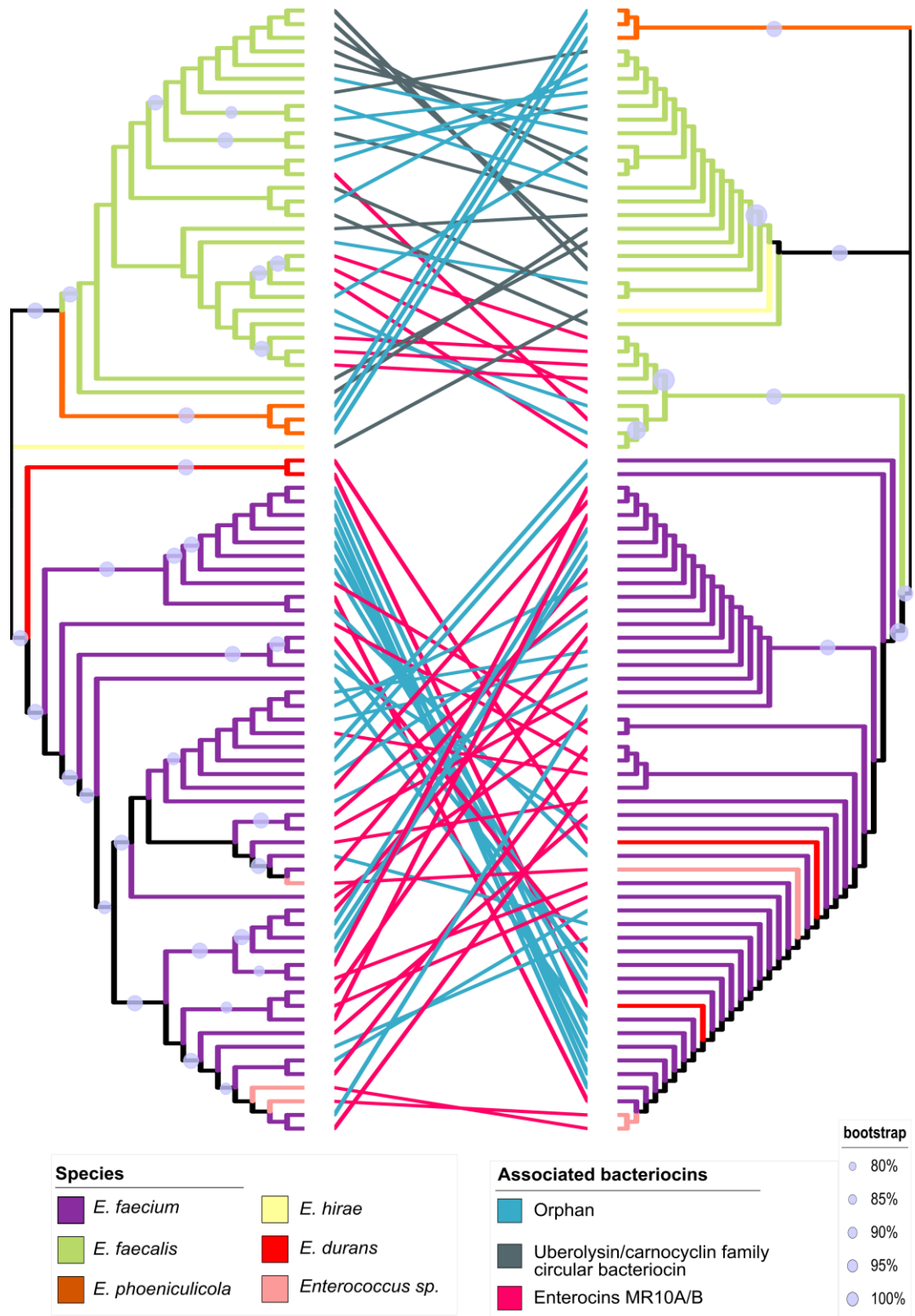


Figure IV.5. Tanglegram between genomes carrying the Mr10EFGH transporter and their *mr10E* gene. Maximum-likelihood phylogenetic tree of the core genomes (left) and *mr10E* gene (right). The color of the branches represents the species: violet = *E. faecium*, light-green = *E. faecalis*, orange = *E. phoeniculicola*, light-yellow = *E. hirae*, red = *E. durans*, and light-pink = *Enterococcus sp.* The color of the connecting lines represents the bacteriocin associated with the Mr10EFGH transporter: pink = enterocins MR10A/B, gray = circular bacteriocins, and blue = orphan transporter in bacteriocins.

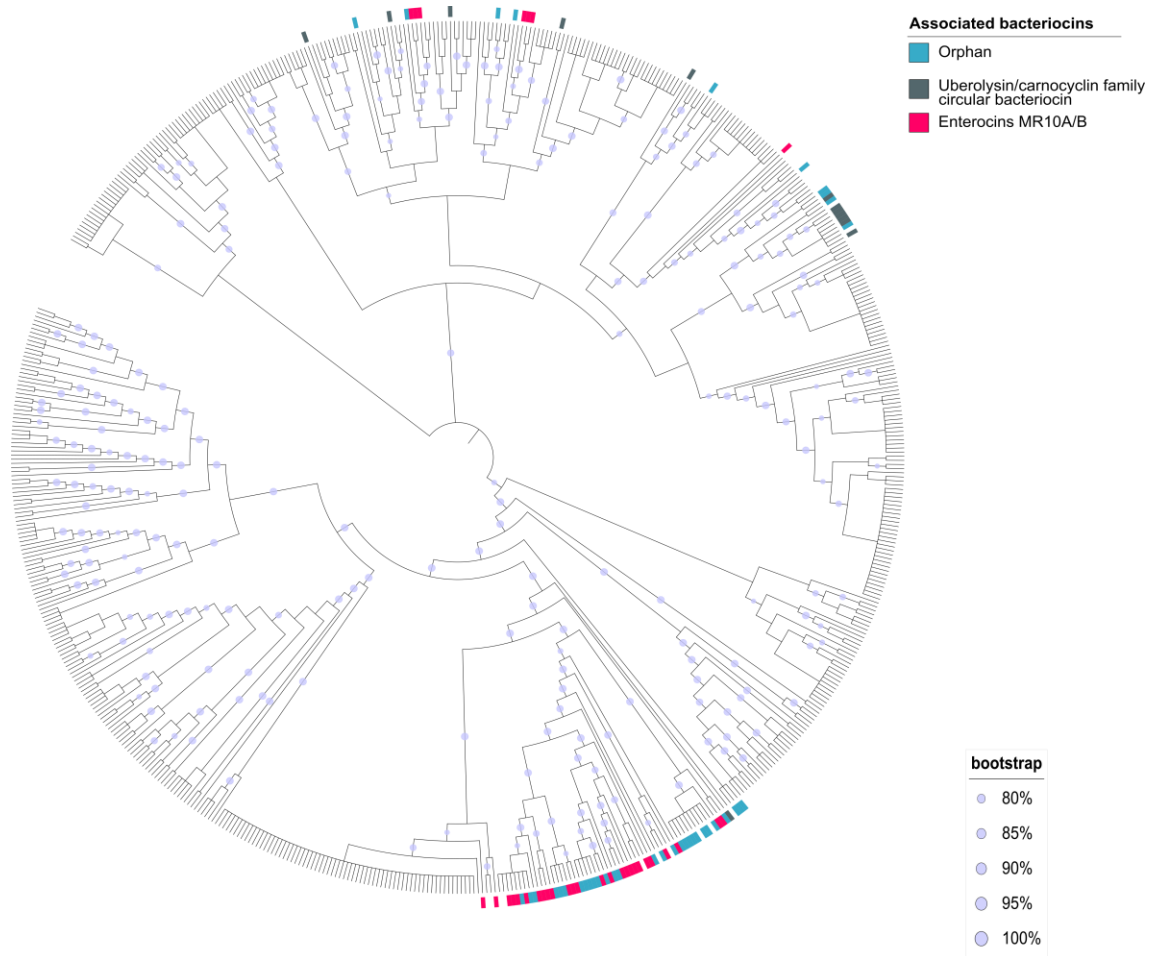


Figure IV.6. Maximum-likelihood phylogenetic tree of the core genomes from strains carrying the Mr10EFGH transporter. The outer bar represent the bacteriocin associated with the Mr10EFGH transporter; pink = enterocins MR10A/B enterocins, gray = circular bacteriocins, and blue = orphan ABC transporter. The gray dot located on the branches of the tree represents the bootstrap value (represented values between 80-100%).

4. Discussion

This study of the distribution of the *mr10EFGH* ABC transporter reveals some degree of modularity on the immunity genes associated with bacteriocin production. This transporter, involved in MR10A/B immunity/resistance, was found to be widespread among different bacteriocins and species. Accordingly, bacteriocinogenic strains with this transporter could share a common immunity system and generate a cross-resistance group of enterococcal populations. However, this group would be characterized by varying degrees of resistance among populations as a function of the enterocin structural gene and transporter specificity.

ABC transporters play multiple biological roles in numerous organisms and are classified in three main groups according to their involvement in the import of nutrients through the cellular membrane, mRNA translation and DNA repair, and the export or secretion of various molecules, including toxins (Davidson et al., 2008). This last function explains the frequent presence of ABC transporters as immunity genes in several bacteriocins. This is the case of the Mr10EFGH ABC transporter associated with the enterocins MR10A/B, which is also found in AS-48 producers and is involved in their cross-resistance (Teso-Pérez et al., 2021). According to the present findings, this transporter is also shared by other bacteriocins of the uberolysin/carnocyclin family and by some orphan strains of the enterocin structural gene (Figure IV.1). Hence, sharing the immunity transporter among different bacteriocins may produce cross-resistance groups that could recognize and resist other groups to some degree. This cross-resistance group of enterococcal populations might share some structural characteristics that facilitate recognition of the shared ABC transporter, including: a saposin-like protein domain (Towle & Vederas, 2017); a hydrophobic core of 4-5 α -helices with predominantly hydrophobic outer surface; and solvent-exposed tryptophan or tyrosine residues close to the N or C-termini (Towle & Vederas, 2017). In their study of structure of enterocins 7A and 7B, homologous to MR10A and MR10B, Lohans et al., 2013 highlighted the resemblance of these enterocins to carnocyclin A (within the uberolysin/carnocyclin family). The question therefore arises whether other bacteriocins that share specific domains could also share a common immunity gene to form other cross-resistance groups.

The cross-resistance group of enterococcal populations includes *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. durans*, *Enterococcus sp.*, and *E. phoeniculicola*. Hence, besides its mobilization between different enterocin gene clusters, this transporter must have been mobilized between different species. Bacteriocin gene clusters are frequently plasmidic and therefore inherently mobile (Riley & Wertz, 2002), but they have been also mobilized at chromosomes. For instance, the gene cluster of enterocin MR10 is chromosomal, whereas the homologous gene cluster of enterocin L50 is plasmidic (Martín-Platero et al., 2006; Teso-Pérez et al., 2021). Furthermore, MR10 is produced by *E. faecalis* but L50 by *E. faecium* (Martín-Platero et al., 2006; Teso-Pérez et al., 2021). The fact that the transporter in *E. faecium* appears solely in plasmids, is associated with only one bacteriocin, and has more phylogenetically coherent carrying strains in comparison to *E. faecalis* (Figure IV.6) indicates that it may have acquired the transporter more recently.

However, it should be noted that not only whole gene clusters but also the immunity gene alone can be mobilized, as evidenced by its presence in distinct bacteriocins and in some orphan strains. Recombination is a frequent mechanism for shaping enterococcal genome composition (Zhong et al., 2017), and genetic exchange between strains of enterococci is responsible for their wide genomic diversity (Santagati et al., 2012). This genetic transfer is attributable to the presence of phages, plasmids, pathogenicity islands (PAI), and conjugative elements in the genome of enterococci (Santagati et al., 2012). In fact, up to 25% and 38% of the genomes of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively, are acquired elements (Lam et al., 2012; Willems et al., 2011). This set of mobile genetic elements, known as mobiloma, contributes to the plasticity of the genome and to the dissemination of antibiotic resistance and pathogenicity genes (Paulsen et al., 2003). This last effect is especially important in relation to *E. faecium*, because antimicrobial resistance genes acquired by horizontal gene transfer are the main drivers of their selection and dissemination in the hospital setting (Cattoir, 2022). Hence, resistance to these antimicrobial peptides in enterococcal populations can spread beyond enterocin producers, and some orphan transporters are also identified, with important implications for the modeling of resistance dynamics in wild populations. The rock-paper-scissors model is frequently used to explain the dynamics between bacteriocin producers, resistant, and susceptible populations (Riley & Wertz, 2002); however, this model has mainly been established by the mutagenesis of different populations (Kerr et al., 2002). As well as mutagenesis, the present study shows that resistance can be transmitted without bacteriocin production in wild populations. The scenario is more complex, however, because differences in specificity between structural and immunity genes (see below) could generate populations with distinct degrees of resistance. Future competition experiments with these differential populations are needed to elucidate the dynamics of producers, resistant, and susceptible populations within wild microbial communities.

Besides the variation in the transporter among enterococcal populations, each ABC transporter component shows a different specificity. The components Mr10G and Mr10H correspond to the ATP binding domain and permease, respectively, which are the most conserved components of the different ABC transporters (Wilkins, 2015). This explains why Mr10G and Mr10H were found in several species, whereas Mr10E and Mr10F were only observed in *Enterococcus* (Table IV.1). Mr10E and Mr10F components correspond, respectively, to the accessory protein and transmembrane permease domains

of the ABC transporter. The function of Mr10E remains unknown, but it is known to contain four transmembrane α -helices (Maqueda et al., 2008). Mr10F displays similarities with the efflux Resistance-Nodulation-Division transporter periplasmic adaptor subunit (Teso-Pérez et al., 2021). It is typical of Gram-negatives, facilitating the transport of various substrates through the outer membrane, but it has also been found in Gram-positives, although its function is not clear. Mr10E and Mr10F were therefore found in a much narrower range of bacteria, *i.e.*, specific enterococcal populations (Table IV.1), although Mr10F, Mr10G, and Mr10H were well conserved within each enterococcal species, suggesting a more specific interaction with other cell features. In contrast, Mr10E was more conserved within the same enterocin gene cluster, regardless of the producer species (Figure IV.4 and Figure IV.5). Although transporters equivalent to that of Mr10EFGH have been found in other bacteriocin clusters, the function of Mr10E protein has not been established, as noted above. The present results point to a direct interaction between the bacteriocin and the Mr10E component of the transporter, ultimately producing the specificity of the resistance. This specific interaction might play an important role in the previously observed differential susceptibility pattern between MR10 and AS-48, given the difference in Mr10E between them (*i.e.*, a 46% identity).

5. Conclusions

A balanced and stable microbiota is key to the health of hosts and functioning of the ecosystem, and dysbiosis is increasingly associated with multiple diseases. Many different interactions take place in microbial communities, with antagonistic interactions playing a major role. An understanding of the rules governing microbial assembly and dynamics is therefore crucial for constructing precise models of microbial dynamics and evolution. This shows that resistance to specific enterocins may be widespread among different antimicrobial producers that share certain attributes, potentially generating cross-resistance groups that could be involved in population stability within the microbial community. Furthermore, the immunity gene can be transmitted independently of the associated antimicrobial peptide, increasing the risk of antimicrobial resistance under high selective pressure. Bacteriocins are used as food preservatives and are under investigation as an alternative to antibiotics, and knowledge of their production/resistance patterns is crucial to predict resistance dynamics in their administration.

6. References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(10), 782-791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Building a BLAST database with your (local) sequences. (2021). En *BLAST® Command Line Applications User Manual [Internet]*. National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK569841/>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cattoir, V. (2022). The multifaceted lifestyle of *enterococci*: Genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology*, *65*, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.013>
- Claesson, M. J., O’Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., Vos, W. M. de, Ross, R. P., & O’Toole, P. W. (2009). Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *PLOS ONE*, *4*(8), e6669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, *11*(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *72*(2), 317-364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>
- de Freire Bastos, M. do C., Coelho, M. L. V., & Santos, O. C. da S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, *161*(4), 683-700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>
- Duan, Y., Llorente, C., Lang, S., Brandl, K., Chu, H., Jiang, L., White, R. C., Clarke, T. H., Nguyen, K., Torralba, M., Shao, Y., Liu, J., Hernandez-Morales, A., Lessor, L., Rahman, I. R., Miyamoto, Y., Ly, M., Gao, B., Sun, W., ... Schnabl, B. (2019). Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*, *575*(7783), Art. 7783. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1742-x>
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 538-550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Galili, T. (2015). dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, *31*(22), 3718-3720. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv428>
- Gradisteanu Pircalabioru, G., Popa, L. I., Marutescu, L., Gheorghe, I., Popa, M., Czobor Barbu, I., Cristescu, R., & Chifiriuc, M.-C. (2021). Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics*, *13*(2), 196. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020196>
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: Physiology, structure and mechanism--an overview. *Research in Microbiology*, *152*(3-4), 205-210. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01193-7)
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, *59*(2), 171-200. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.171-200.1995>

- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature*, *418*(6894), Art. 6894. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C. J., & Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, *526*(7575), 719-722. <https://doi.org/10.1038/nature15524>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, *9*(9), 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *128*, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D. M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., Moore, R. J., Ballard, S., Grayson, M. L., Johnson, P. D. R., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2012). Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. *J. Bacteriol.*, *194*(9), 2334-2341. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-12>
- Lebreton, F., Willems, R. J. L., & Gilmore, M. S. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. En M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
- Lohans, C. T., Towle, K. M., Miskolzie, M., McKay, R. T., van Belkum, M. J., McMullen, L. M., & Vederas, J. C. (2013). Solution Structures of the Linear Leaderless Bacteriocins Enterocin 7A and 7B Resemble Carnocyclin A, a Circular Antimicrobial Peptide. *Biochemistry*, *52*(23), 3987-3994. <https://doi.org/10.1021/bi400359z>
- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(1), 2-22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x>
- Martin-Platero, A. M., Cleary, B., Kauffman, K., Preheim, S. P., McGillicuddy, D. J., Alm, E. J., & Polz, M. F. (2018). High resolution time series reveals cohesive but short-lived communities in coastal plankton. *Nature Communications*, *9*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02571-4>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- Ness, I. F., Diep, D. B., & Ike, Y. (2014). Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. En M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>
- Neuwirth, E. (2022). *RColorBrewer: Color Brewer Palettes* (1.1-3). <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>
- Obolski, U., Dellus-Gur, E., Stein, G. Y., & Hadany, L. (2016). Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in *E. coli*. *Infection, Genetics and Evolution*, *40*, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.017>

- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., ... Fraser, C. M. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, *299*(5615), 2071-2074. <https://doi.org/10.1126/science.1080613>
- Pellow, D., Mizrahi, I., & Shamir, R. (2020). PlasClass improves plasmid sequence classification. *PLOS Computational Biology*, *16*(4), e1007781. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007781>
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Raven, K. E., Reuter, S., Gouliouris, T., Reynolds, R., Russell, J. E., Brown, N. M., Török, M. E., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2016). Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nature Microbiology*, *1*(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.33>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering*, *12*(2), 85-94. <https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85>
- Santagati, M., Campanile, F., & Stefani, S. (2012). Genomic Diversification of *Enterococci* in Hosts: The Role of the Mobilome. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 95. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00095>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2020). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, *fuaa039*, 1-24. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*(7), 1009-1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>
- Teso-Pérez, C., Martínez-Bueno, M., Peralta-Sánchez, J. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Fárez-Vidal, M. E., & Martín-Platero, A. M. (2021). Enterocin Cross-Resistance Mediated by ABC Transport Systems. *Microorganisms*, *9*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071411>
- Towle, K. M., & Vederas, J. C. (2017). Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *MedChemComm*, *8*(2), 276-285. <https://doi.org/10.1039/C6MD00607H>
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., & Vederas, J. C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, *19*(8), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.004>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 6578-6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., Cordero, O. X., Brown, S. P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H. J., Haas, A. F., Laroche, B.,

- Kreft, J.-U., Rainey, P. B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., ... Soyer, O. S. (2016). Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, 10(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.45>
- Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7, 14. <https://doi.org/10.12703/P7-14>
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: High-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 872-900. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x>
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., & Sun, Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, 196, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. (2010). A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6), 432-439. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9270-4>

7. Supplementary material

Supplementary Table SIV.1. Bacterial genomes downloaded from NCBI. The table represents the bacterial genera that hit any of the four proteins of the Mr10EFGH transporter.

Genus	Genomes
<i>Acetobacterium</i>	14
<i>Acidaminobacter</i>	1
<i>Acidiferrobacter</i>	5
<i>Acidobacterium</i>	59
<i>Aeribacillus</i>	7
<i>Aerococcus</i>	69
<i>Alkalibacterium</i>	12
<i>Alkaliphilus</i>	6
<i>Allofustis</i>	1
<i>Alloiococcus</i>	2
<i>Aminiphilus</i>	1
<i>Anabaena</i>	9
<i>Anaerofustis</i>	4
<i>Anaerolinea</i>	2
<i>Anaerosalibacter</i>	4
<i>Asaccharospora</i>	1
<i>Atopobacter</i>	2
<i>Bacillus</i>	4808
<i>Bacterium_CH2-D8-79</i>	1
<i>Bacteroides</i>	1112
<i>Bifidobacterium</i>	1036
<i>Caldicellulosiruptor</i>	36
<i>Caloranaerobacter</i>	5
<i>Calothrix</i>	16
<i>Campylobacter</i>	3302
<i>Carboxydotherrmus</i>	4
<i>Carnobacterium</i>	94
<i>Catonella</i>	1
<i>Cetobacterium</i>	5
<i>Chlamydia</i>	370
<i>Chloroflexus</i>	6
<i>Cylindrospermum</i>	4
<i>Clostridioides</i>	1864
<i>Coralloccoccus</i>	32
<i>Corynebacterium</i>	968
<i>Curvibacter</i>	5
<i>Dendrosporobacter</i>	1
<i>Desemzia</i>	1
<i>Desnuesiella</i>	1
<i>Desulfofarcimen</i>	6

CAPÍTULO IV

Genus	Genomes
<i>Desulfofundulus</i>	6
<i>Dolosicoccus</i>	3
<i>Dolosigranulum</i>	14
<i>Dorea</i>	69
<i>Enterococcus</i>	3997
<i>Eremococcus</i>	2
<i>Erwinia</i>	194
<i>Eubacterium</i>	79
<i>Finegoldia</i>	27
<i>Fischerella</i>	41
<i>Flacklamia</i>	13
<i>Floricoccus</i>	2
<i>Fusobacterium</i>	183
<i>Garciella</i>	4
<i>Gardnerella</i>	102
<i>Geobacter</i>	26
<i>Geomicrobium</i>	4
<i>Globicatella</i>	4
<i>Granulicatella</i>	10
<i>Hydrogenobacter</i>	3
<i>Ignavigranum</i>	1
<i>Lachnoclostridium</i>	20
<i>Lachnospira</i>	189
<i>Lacrimispora</i>	12
<i>Lactobacillus</i>	2794
<i>Lactococcus</i>	283
<i>Lagierella</i>	2
<i>Leuconostoc</i>	184
<i>Leptospirillum</i>	9
<i>Listeria</i>	3321
<i>Mahella</i>	1
<i>Marinilactibacillus</i>	7
<i>Marininema</i>	2
<i>Melghirimyces</i>	3
<i>Melisococcus</i>	19
<i>Methylopumilus</i>	41
<i>Miniphocibacter</i>	1
<i>Moorella</i>	26
<i>Mycobacteroides</i>	1773
<i>Nitrosomonas</i>	56
<i>Nitrospira</i>	30
<i>Nostoc</i>	49
<i>Oenococcus</i>	231
<i>Paenibacillus</i>	572
<i>Paeniclostridium</i>	51

CROSS-RESISTANCE MEDIATED BY ABC-TRANSPORTER

Genus	Genomes
<i>Paraburkholderia</i>	163
<i>Paraclostridium</i>	9
<i>Peptostreptococcus</i>	14
<i>Phenylobacterium</i>	13
<i>Pilibacter</i>	1
<i>Pyxidicoccus</i>	2
<i>Rhodoferax</i>	16
<i>Romboutsia</i>	11
<i>Ruminococcus</i>	199
<i>Sedimentibacter</i>	3
<i>Smithella</i>	18
<i>Sphingobacterium</i>	83
<i>Sporolactobacillus</i>	17
<i>Staphylococcus</i>	14053
<i>Streptococcus</i>	14796
<i>Streptomyces</i>	1737
<i>Suicoccus</i>	1
<i>Synechococcus</i>	81
<i>Syntrophus</i> <i>Syntrophaceae</i>	24
<i>Tepidanaerobacter</i>	3
<i>Terrisporobacter</i>	5
<i>Thermacetogenium</i>	2
<i>Thermincola</i>	2
<i>Thermoanaerobacter</i>	34
<i>Thermoanaerobacterium</i>	12
<i>Thermodesulfovibrio</i>	6
<i>Thermosediminibacter</i>	29
<i>Trichococcus</i>	18
<i>Tissierellia</i>	180
<i>Tolypothrix</i>	6
<i>Vaginisenegalia</i>	1
<i>Vagococcus</i>	32
<i>Vibrio</i>	4029
<i>Virgibacillus</i>	46
<i>Weissella</i>	132
<i>Candidate division Zixibacteria</i>	1

CAPÍTULO V. Comparative genome analysis of *E. faecalis* S-48, *E. faecalis* UGRA10, and *E. faecalis* MRR10-3 draft genomes: insight into genomics of saposin-like enterocin producers.

Claudia Teso-Pérez¹, Manuel Martínez-Bueno¹, Juan Manuel Peralta- Sánchez¹, Eva Valdivia¹, Mohammed Bakkali², María Esther Fárez-Vidal^{3,4,*}, Antonio M. Martín-Platero^{1,*}.

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

² Departamento de Genética, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva, s/n, 18071 Granada, Spain

³ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18016 Granada, Spain

⁴ Instituto de Investigación Biomédica IBS, Granada, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Abstract

Enterococcus faecalis is a regular member of the gastrointestinal tract of humans and multiple animals. It is a controversial species, showing a dual role. On one hand, it is of interest for the industry as a Lactic Acid Bacteria (LAB), being a regular constituent of dairy products and other fermented foods. On the other hand, it has become an emergent opportunistic pathogen involved in nosocomial infections. This has produced an overrepresentation of *E. faecalis* genomes from pathogenic strains in relation to strains of biotechnological interests. Among the technological properties of *E. faecalis*, the production of bacteriocins is of special relevance due to its role controlling spoilage and pathogen microorganisms, and its potential role as an alternative to antibiotics. Here we present the genomes of three enterocin producers *E. faecalis*: *E. faecalis* S-48, *E. faecalis* UGRA10, and *E. faecalis* MRR10-3. S-48 and UGRA10 produce the enterocin AS-48, while MRR10-3 produce the enterocins MR10A and MR10B. The genomic content of these strains did not show significant differences in relation to the main cellular processes of enterococci. The genes and their products were mainly involved in ATP binding, regulation of DNA-templated transcription and membrane transport. Because we have previously shown cross-resistance among these enterocin producers due to a common ABC transporter associated with several enterocins, we asked if these enterocin producers might share other genomic features beyond this resistance transporter. In this sense, no defined group has been observed. Only in the case of the genomes associated with the circular bacteriocin uberolysin/carnocycline did we find a greater phylogenetic relationship between the strains. Thus, further experiments are needed to elucidate the eco-evolutionary dynamics of enterocins in wild populations.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, bacteriocin, antagonism, genomics, virulence

1. Introduction

Enterococci make up one of the most diverse groups of microorganisms, which are characterized by their ubiquity in nature, being able to find them in a multitude of diverse environments such as the gastrointestinal tract of animals and humans, various food products, soils, water, or vegetation (Byappanahalli et al., 2012). These have been used for years in the production of fermented and non-fermented foods (Franz et al., 2011). They are found in a multitude of "artisanal" food products, mainly in fermented products such as cheese, curd or yogurt (Nami et al., 2019). In addition, some strains have been tested as probiotics, maintaining normal intestinal microbiota, stimulating the immune system or improving nutritional value (Dubin & Pamer, 2014; Krawczyk et al., 2021).

Although they are part of the normal microbiota of the human gastrointestinal tract, today they are recognized as important hospital pathogens, especially *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* (Fiore et al., 2019). They generally cause major infections and diseases such as endocarditis, bacteremia, or urinary tract infection (Kao & Kline, 2019; Tendolkar et al., 2003). Thanks to advances in next-generation technologies, it has been possible to sequence a large number of enterococcal genomes, making it possible to carry out numerous comparative studies that seek to establish patterns of behaviour and evolutionary relationships (Bonacina et al., 2017). However, most of these studies have focused on searching for genetic characteristics of enterococci to identify specific lineages from community and clinical settings (Galloway-Peña et al., 2012; Palmer et al., 2012). These studies have found abundant mobile DNA, multiple virulence factors, such as cytolysins, and resistance to different antibiotics, where vancomycin-resistant enterococci (VRE) are of special relevance (Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Vergis et al., 2002). In fact, specific clonal complexes have been designated for hospitalized patients (Ruiz-Garbajosa et al., 2006). Despite these advances, the structural and functional characteristics of enterococcal genomes are still not fully understood. This is probably due to the enormous plasticity of their genomes, which allows them to respond quickly and adapt to the environment by acquiring genetic determinants, but also makes them more difficult to study (Palmer et al., 2010). As well as to the fewer genomic information of non-pathogenic strains, knowledge of part of enterococcal genomes is missing. For this reason, further studies are needed to widen the genome pool of

enterococci, including non-pathogenic strains, as well as to understand the adaptive mechanisms that have evolved for colonizing diverse environments.

An important feature of enterococci is their frequent production of antimicrobial peptides such as bacteriocins (also called enterocins) (Ness et al., 2014). The production of bacteriocins has special relevance in the food industry since it allows the inhibition of the growth of pathogenic strains and the deterioration of food (Wu et al., 2022). In addition, they allow the producer strains to establish themselves more easily in their corresponding microbial niches, making producer strains good starter cultures for use in food fermentation and/or probiotic strains (Perez et al., 2022). In this sense, enterocin producers need to carry their own immunity gene to avoid self-inhibition (Riley & Wertz, 2002). This immunity have been shown to mediate in cross-resistance among different producers (Teso-Pérez et al., 2021), which would influence the populations that can assemble into a same community. This is the case of the enterocins AS-48 and MR10A/B (L50A/B variants), where ABC-transporter present in AS-48 gene cluster (As-48EFGH) offer resistance to MR10A/B enterocins (Teso-Pérez et al., 2021). Furthermore, this ABC-transporter is present in other enterocin gene clusters (e.g. in carnocyclin A). All this enterocins with a homologous ABC transporter have a similar structure, sharing a saposin-like domain (Chapter IV).

Therefore, the aim of this study was to describe the genomes of *E. faecalis* S-48 (AS-48 producer), *E. faecalis* UGRA10 (AS-48 producer), and *E. faecalis* MRR10-3 (MR10A/B producer). Additionally, we explored the genomic relationship among enterocin carriers with this common immunity ABC transporter.

2. Material and methods

2.1. Microbial strains

The genomic sequencing and analysis were carried out on three *E. faecalis* strains: *Enterococcus faecalis* S-48, *Enterococcus faecalis* UGRA10, and *Enterococcus faecalis* MRR10-3. These strains were enterocin producers of different isolation sources. *E. faecalis* S-48 produced the circular enterocin AS-48, and was isolated from a human wound exudate (Gálvez et al., 1986). *E. faecalis* UGRA10 produced also the enterocin AS-48, but contrary to *E. faecalis* S-48 has a food origin, specifically was isolated from a Spanish sheep cheese (Cebrián et al., 2012). Finally, *E. faecalis* MRR10-3 produced the

leaderless enterocin MR10A/B, and was isolated from the uropygial gland of a hoopoe (*Upupa epops*) (Martín-Platero et al., 2006). Both bacteriocins had a wide antimicrobial spectrum (Gálvez et al., 1986; Martín-Platero et al., 2006) and have shown cross-resistance between them (Teso-Pérez et al., 2021).

Scarce information on the genetics of the studied strains were available. *E. faecalis* S-48 strain possess four plasmids: two big plasmids larger than 23 kb, and two plasmids smaller than 23 kb (Martinez-Bueno et al., 1990). In the *E. faecalis* UGRA10 genome, at least two plasmids have been identified. As well as this strain harbored some virulence factors: *gelE*, *asa1*, *esp*, *efa* and *ace* genes (Cebrián et al., 2012). In *E. faecalis* MRR10-3 genome - no plasmid has been observed.

For comparative genomic analysis, genomes of *Enterococcus faecalis* were downloaded from NCBI Ref Seq (accession date: 22/07/2022). Genomes were filtered, discarding outliers (defined as 1.5 times away of the interquartile range) in terms of genome size and GC content, and those that presented more than 1% of ambiguous nucleotides.

2.2. Genome sequencing

To obtain the corresponding microbial genomes, the DNA of each strain was extracted using the MSOP (Modification of the ‘protein Salting-Out Procedure) protocol described by Martín-Platero (Martín-Platero et al., 2007).

The *E. faecalis* S-48 and UGRA10 genomes library were constructed using a TruSeq DNA PCR-free library preparation kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) with an insert size of 300 bp sequenced by STAB VIDA (Caparica, Portugal) with a HiSeq4000 Illumina platform by paired-end sequencing of 2×150 bp read lengths.

The genome library of *E. faecalis* MRR10-3 strain was constructed using a TruSeq DNA PCR-free library preparation kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) with an insert size of 350 bp sequenced at Macrogen, Inc. (Seoul, Republic of Korea) with a HiSeq Illumina platform by paired-end sequencing of 2×101 bp read lengths.

Finally, the three Illumina sequences were assembled into draft genomes with SPAdes (version 3.13; *k-mers*: 21-33-55-77) which uses *de Bruijn's* graph to assemble the sequence fragments. This algorithm divided the DNA sequence into *k-mers* (sequences of length *k*) and created a *de Bruijn* graph from them keeping the longest and

most reliable routes that correspond to the original genome sequence (Bankevich et al., 2012).

2.3. Genome annotation

The obtained draft genomes were annotated using Prokka (version 1.13.3) (Seemann, 2014) which used several algorithms to carry out the annotation of the genomes as Prodigal (for protein-coding genes prediction), HMMER (for sequence alignments) or Aragorn (for tRNA and tmRNA prediction) among others. The downloaded genomes for comparative analysis were also annotated with Prokka, thus all of them were annotated with the same software and parameters to do not bias due to the annotation procedure.

Functional analysis of genomes was performed through InterProScan (Paysan-Lafosse et al., 2023), that classified proteins into families and predicted domains and important sites. This software used predictive models, known as signatures, provided by several different databases (Paysan-Lafosse et al., 2023). InterproScan generates Gene Ontology terms associated to each gene. Afterwards Gene Ontology Database (Ashburner et al., 2000; Gene Ontology Consortium, 2021) was used to perform the functional analysis of genes.

Additionally, the potential virulence factors were obtained using VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria) software with default parameters (Liu et al., 2019a). Antibiotic resistance genes were searched using the Resistance Gene Identifier (RGI) available at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, sequence identity > 95%) (McArthur et al., 2013). MobileElementFinder (version 1.1.2) software was used to find mobile genetic elements (MGEs) (Johansson et al., 2021). Insertion sequences were identified using the ISfinder website (Siguier et al., 2006). The presence of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) was evaluated with CRISPR-Cas++ web tool (Grissa et al., 2007), which classifies CRISPR sequences, a level of evidence, rated from 1 to 4, where 1 includes small CRISPRs and 2 to 4 are ranked based on repeat and spacer similarity.

2.5. Bacteriocin screening

To search for circular and leaderless enterocins on the available *E. faecalis* genomes, a tblastn (version 2.10.1+) was run with a 10^{-6} e-value threshold (Altschul et al., 1990; Camacho et al., 2009) between bacteriocins from the BACTIBASE database (Zouhir et al., 2010) and genomes obtained from NCBI. False positives were minimized by considering only hits with more than 40% identity and 70% coverage as positive (Rost, 1999). When several hits were obtained at the same position, the hit with highest percentage identity was considered.

2.6. MLST assignment

To assign each genome to a MLST sequence type (ST) we performed a multilocus sequence typing using seven housekeeping genes -*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, and *yqiL*- through the Public Databases for Molecular Typing (PubMLST) (Jolley et al., 2018) which generates an allelic profile for each genome. Sequence types were assigned using the same database by searching locus combinations in known STs of *E. faecalis*.

2.7. Comparative genome analysis

The pangenome was calculated using Roary software (version 3.11.2) (Page et al., 2015), which generated a fast core gene alignment (using MAFFT (Katoh et al., 2002)), used in subsequent phylogenetic analysis. Core genes were defined using a 99% presence threshold.

Phylogenetic analyses were performed through FastTree software (version 2.1.11) (Price et al., 2010) using *E. faecalis* core genome alignment among all strains. Phylogeny was inferred by the General Time Invariant (GTR) model. Tree visualization and drawing was managed with iTOL (Letunic & Bork, 2021).

3. Results

3.1. *E. faecalis* S-48, *E. faecalis* UGR10, and *E. faecalis* MRR10-3 genomes

The genome size and GC content of each strain were within the species range. The AS-48 producers, i.e. *E. faecalis* S48 and *E. faecalis* UGRA10, showed a size of 3.10 Mb and 3.19 Mb, respectively, while the MR10A/B producer *E. faecalis* MRR10-3 showed a genome size of 2.81 Mb. In relation to GC content the three strains showed similar values,

with 37.27%, 37.32%, and 37.37% for S-48, UGRA10 and MRR10-3 respectively. A general description of the main genomic features is shown in Table V.1.

The Gene Ontology (GO) functional analysis showed that in the three genomes, ATP binding and membrane were the most abundant terms in Molecular function and Cellular component GO categories respectively (Figure V.1.A-B). Nevertheless, in Biological processes category, regulation of DNA-templated transcription prevailed in *E. faecalis* UGRA10 and S48, while in *E. faecalis* MRR10-3 was transmembrane transport (Figure V.1.C), although they were at similar levels. The highest rank GO terms are summarized in Table V.2.

Table V.1. Main genomic features of *E. faecalis* S48, UGRA10 and MRR10-3 genomes strains

Genome	Protein-coding DNA sequences (CDS)	tRNA genes	Predicted rRNA operons	N50 value (bp)	L50 value	N° contigs
<i>E. faecalis</i> UGRA10	2956	61	2	1552665	9	146
<i>E. faecalis</i> S48	3037	58	2	1619111	12	244
<i>E. faecalis</i> MRR10-3	2585	52	2	1483621	5	53

Table V.2. Main Gene ontology annotations

Genome	Total assigned GO terms	GO terms Molecular function	GO terms Biological processes	GO terms Cellular components
<i>E. faecalis</i> UGRA10	4993 in 1754 genes	2814	1615	564
<i>E. faecalis</i> S48	5032 in 1779 genes	2843	1629	560
<i>E. faecalis</i> MRR10-3	4685 in 1621 genes	2646	1495	544

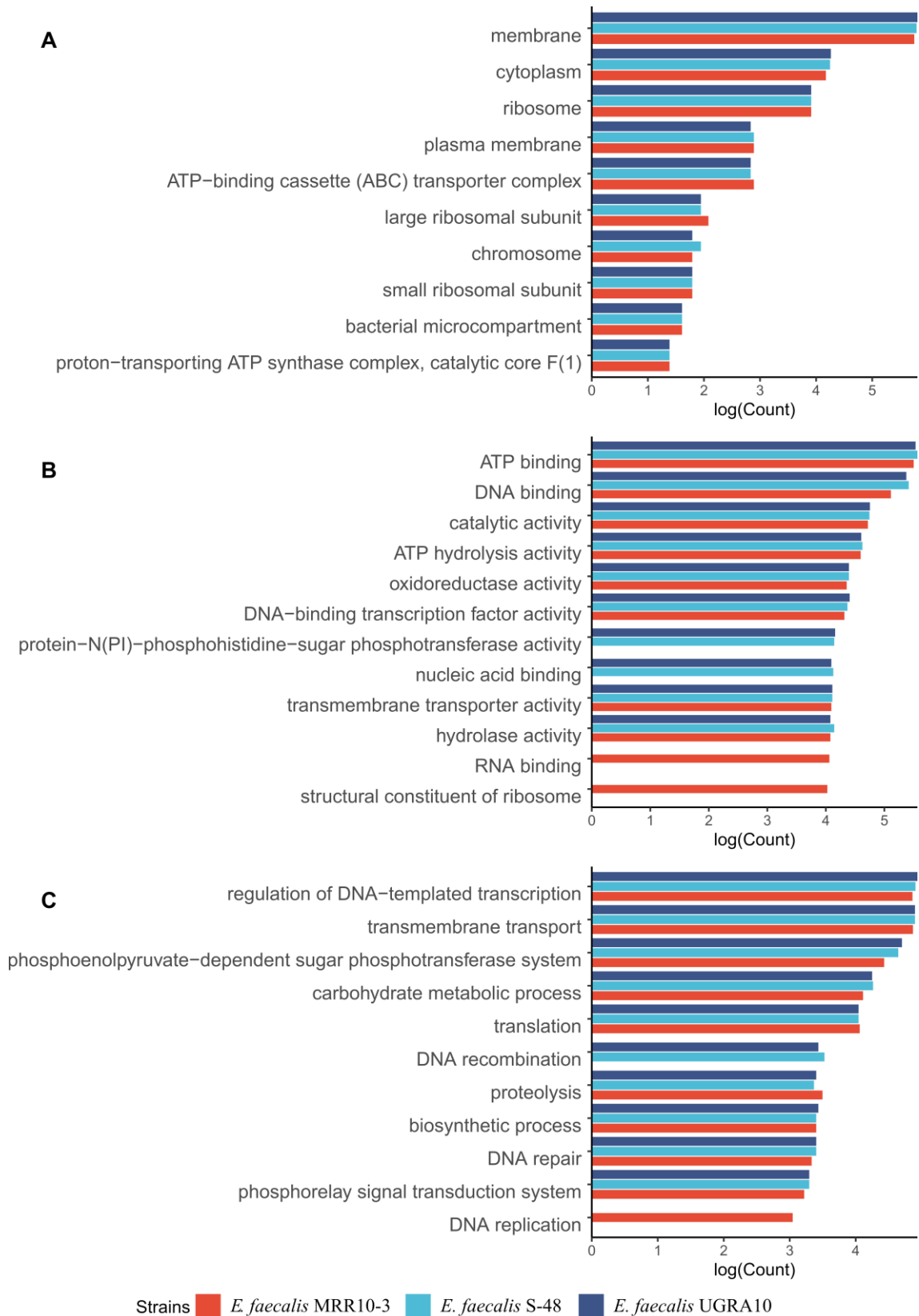


Figure V.1. Ten most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories. The X axis represents the logarithm of the counts for each term, while the Y axis shows the names of each term within each category.

InterProScan functional classification resulted in 2682 annotated proteins for *E. faecalis* UGRA10, 2736 for *E. faecalis* S48, and 2406 for *E. faecalis* MRR10-3. A total of 8971 families were assigned to 2533 proteins (94,4%, 2533/2682) in the *E. faecalis* S48 genome, 9071 families to 2584 proteins (94,4%, 2584/2736) in *E. faecalis* UGRA10 genome, and 8376 families for 2304 proteins (94,4%, 2533/2682) in *E. faecalis* MRR10-3 genome. In all cases, IPR027417 (P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase family) was the highest count, followed by IPR036388 (Winged helix-like DNA-binding domain superfamily) and IPR003593 (AAA+ ATPase domain) (Figure V.2).

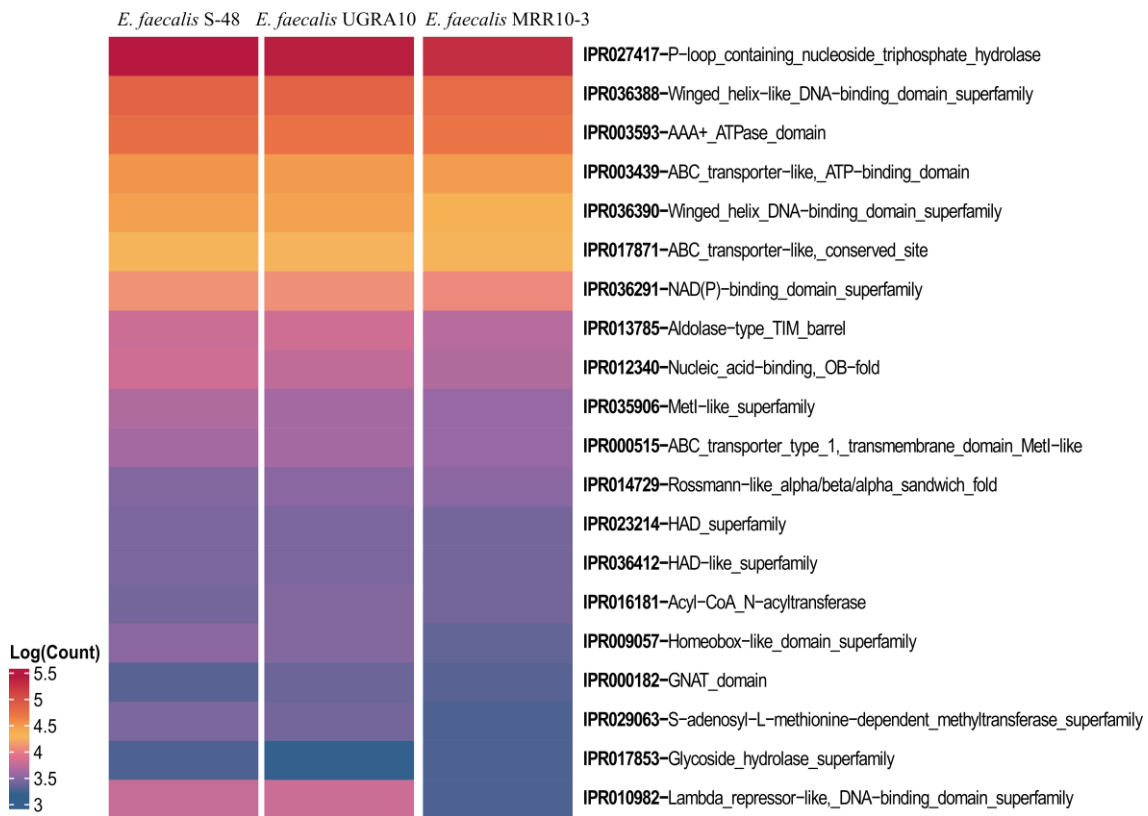


Figure V.2. Top twenty most abundant InterProScan gene families for *E. faecalis* S48, *E. faecalis* UGRA10 and *E. faecalis* MRR10-3 genomes. The colour scale represents the logarithm of counts for each family, from dark violet (20 count) to red (228 count).

3.2. Presence of virulence factors, antibiotic resistance genes and Mobile Genetics Elements (MGEs)

Among the virulence factors, we found those related to antiphagocytosis, specifically the *cps* operon. It consists of 11 ORFs (i.e. *cpsA* to *cpsK*), encoding an antiphagocytosis factor that facilitates bacterial evasion of the host immune system. Other virulence factors were related to biofilm formation, including de *fsr* locus or the *bopD*; production of exoenzymes such as gelatinase or hyaluronidase; and factors related to adherence, including *ebpA/B/C* (encode three Ebp pili subunits that facilitate bacterial adherence to host extracellular matrix proteins), *ace* (encodes a collagen adhesin), or *asaI* (encodes aggregation substance) (Figure V.3). In terms of antibiotic resistance, the three genomes contain the *dfrE* gene, which encode a dihydrofolate reductase responsible for the resistance of the trimethoprim antimicrobial agent. In addition, the *efrA* gene was detected, but not *efrB*. Both genes encode two subunits of the EfrAB efflux pump implicated in drug resistance in both *E. faecalis* and *E. faecium*. Additionally, *tet(M)* gene was detected in *E. faecalis* UGRA10 responsible of the tetracycline resistance ribosomal protection protein.

Seven teen Mobile Genetics Elements (MGEs) were identified in our *Enterococci*. *E. faecalis* S48 presented seven insertion sequences (ISLmo19, ISLmo21, ISEfa8, ISLla3, ISLgar5, ISS1N, and ISLmo4), in *E. faecalis* UGRA10 were found the same insertion sequences as in S48 except for ISLmo21. In addition, two composite transposon (cn_2472 ISLmo19 and cn_8222_ISS1N) and one integrative and conjugative element (ICE) (Tn6009) were detected. In *E. faecalis* MRR10-3 genome only one insertion sequence was detected (ISLse1).

Furthermore *E. faecalis* S48 presented two CRISPR sequences with level 4 evidence, one of them, was found in the same contig as the *Cas3_I_I* gene, however they were very distant; while the other was found to be associated only with two gene clusters composed of 1 gene each (*Cas2_0_I-II-III* and *Cas1_0_II*). Additionally, a CRISPR sequence was found without any *cas*, although the evidence was level 1. In the UGRA10 genome, three CRISPR sequences were found, the first of which was evidence level 4 but no associated *cas* genes were found, the second despite being evidence level 1 was found associated with *Cas3_I_I* gene, and the third CRISPR showed an evidence level 4 with two gene cluster each with a *cas* gene equal to those of S48. In *E. faecalis* MRR10-3 only one CRISPR sequence was found with level of evidence 1.

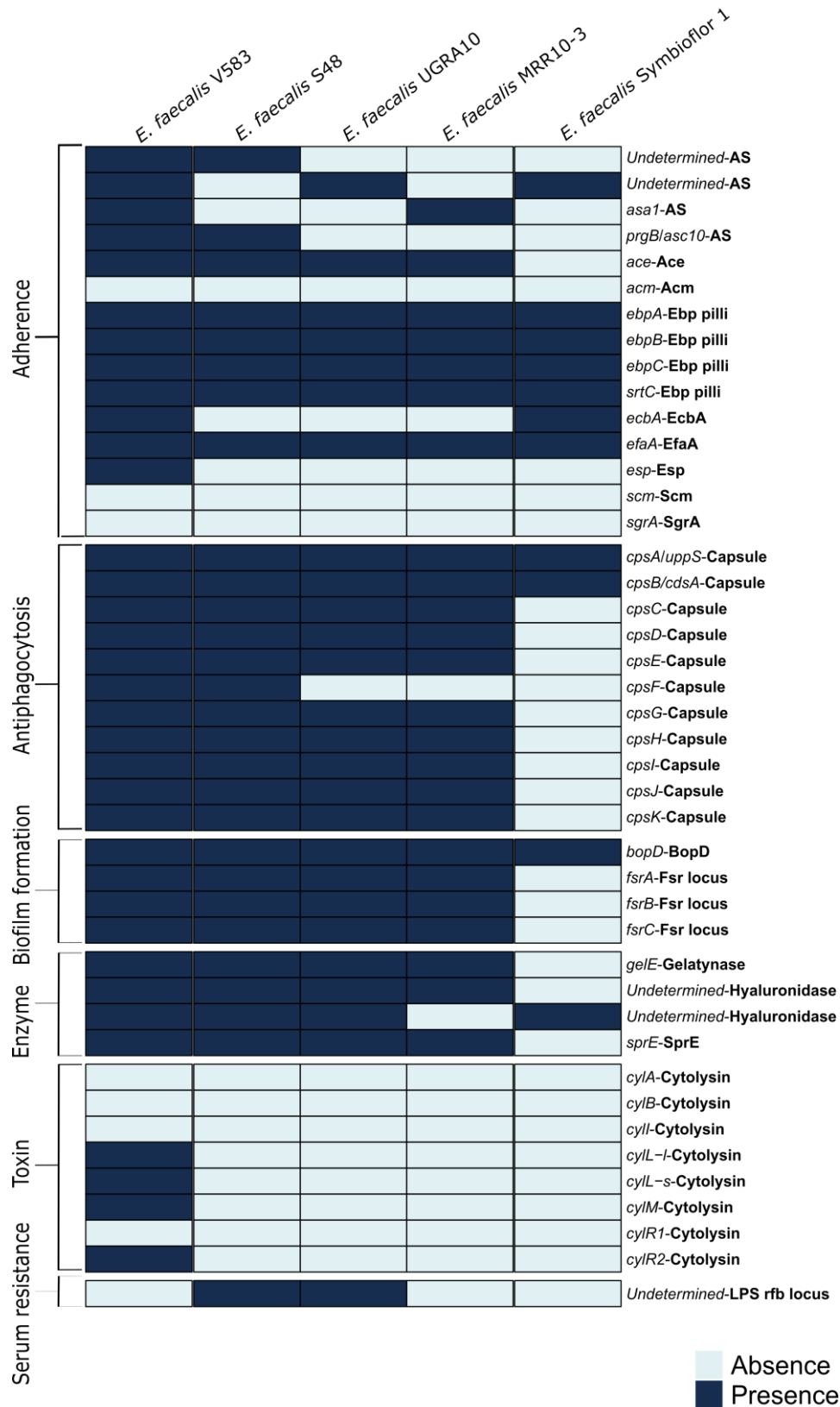


Figure V.3. Enterococcal virulence factors found in *E. faecalis* S48, UGRA10 and MRR10-3 genomes. For comparison, the virulence factors present in *E. faecalis* V583 (pathogenic) and *E. faecalis* Symbioflor1 (probiotic) are included.

The assignment of the type sequences showed that *E. faecalis* S48 was included as a sequence type strain designated as ST168, and *E. faecalis* UGRA10 as ST72. Neither of them were associated with a pathogenic clonal complex. *E. faecalis* MRR10-3 could not be associated to any ST.

3.3. Specific genomic features of circular and leaderless enterocin producers

A phylogenetic analysis of a total of 2113 *E. faecalis* strains based on the core-genome were carried out. The pan-genome of 2113 *E. faecalis* comprised 42113 genes, of which 1025 genes formed the core-genome. From all of them, a total of 45 genomes showed to carry the carnocyclin/uberolysin bacteriocin, 1 genome the AS-48 bacteriocin, 1 genome the carnocyclin A, and 8 genomes the MR10A/B-like enterocins (Supplementary Table SV.1). These 55 enterocin carriers showed a core genome consisting in 1408 genes, where 68 were specific of the circular-bacteriocins carriers, and 438 genes were specific of the MR10-like bacteriocins carriers (Figure V.4.). From the remaining core genome, most genes belong to the *E. faecalis* core-genome, but 383 genes were specific of these two groups of enterocins (Figure V.4).

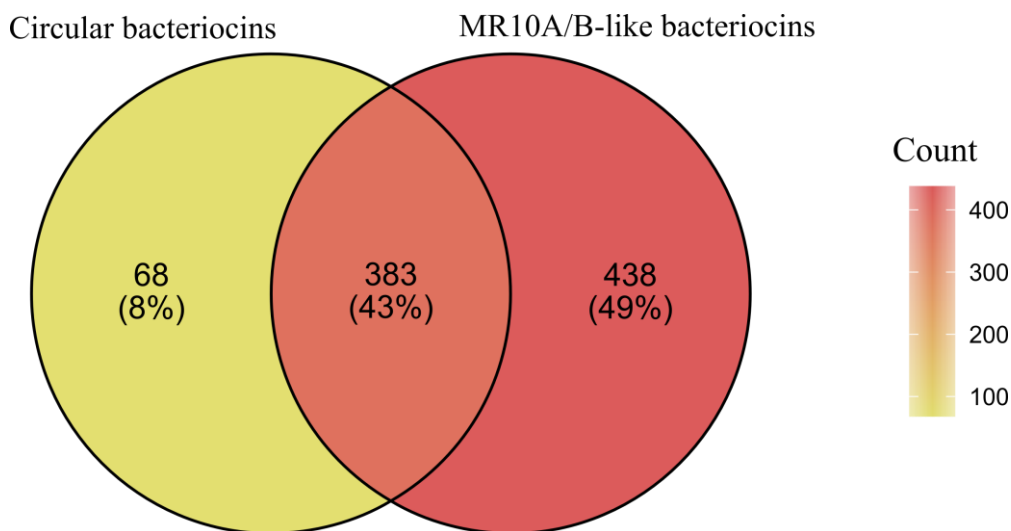


Figure V.4. Core genes shared between genomes associated to circular and leaderless bacteriocins without total core gene.

Functional analysis of unique genes present in circular bacteriocin-associated genomes revealed that membrane, DNA-binding transcription factor activity and regulation of DNA-templated transcription are the most abundant terms in cellular component, molecular functions and biological process respectively (Supplementary Figure SV.1.). In the case of MR10-like bacteriocin-associated genomes, gene functional analysis showed that membrane, ATP binding, and transmembrane transport are the most abundant terms within each category (Supplementary Figure SV.2.). Additionally GO results are summarized in Table V.3.

Table V.3. Main gene ontology annotations of unique core genes of genomes associated to MR10A/B-like or circular bacteriocins.

Genome	Total assigned GO terms	GO terms Molecular function	GO terms Biological processes	GO terms Cellular components
MR10A/B-like	780 in 238 genes	447	243	90
Circular	93 in 35 genes	56	30	7

3.4. Phylogenetic relationship between Circular and MR10A/B-like enterocin carriers

The phylogenetic analysis of the *E. faecalis* genomes analyzed did not revealed a close relationship among circular nor MR10A/B-like enterocin carriers (Figure V.5). Only the uberolysin/carnocyclin enterocin showed a higher cohesion in two main closely related clusters. Enterocins AS-48, carnociclyn A, and MR10A/B-like were widespread along the phylogenetic tree (Figure V.5).

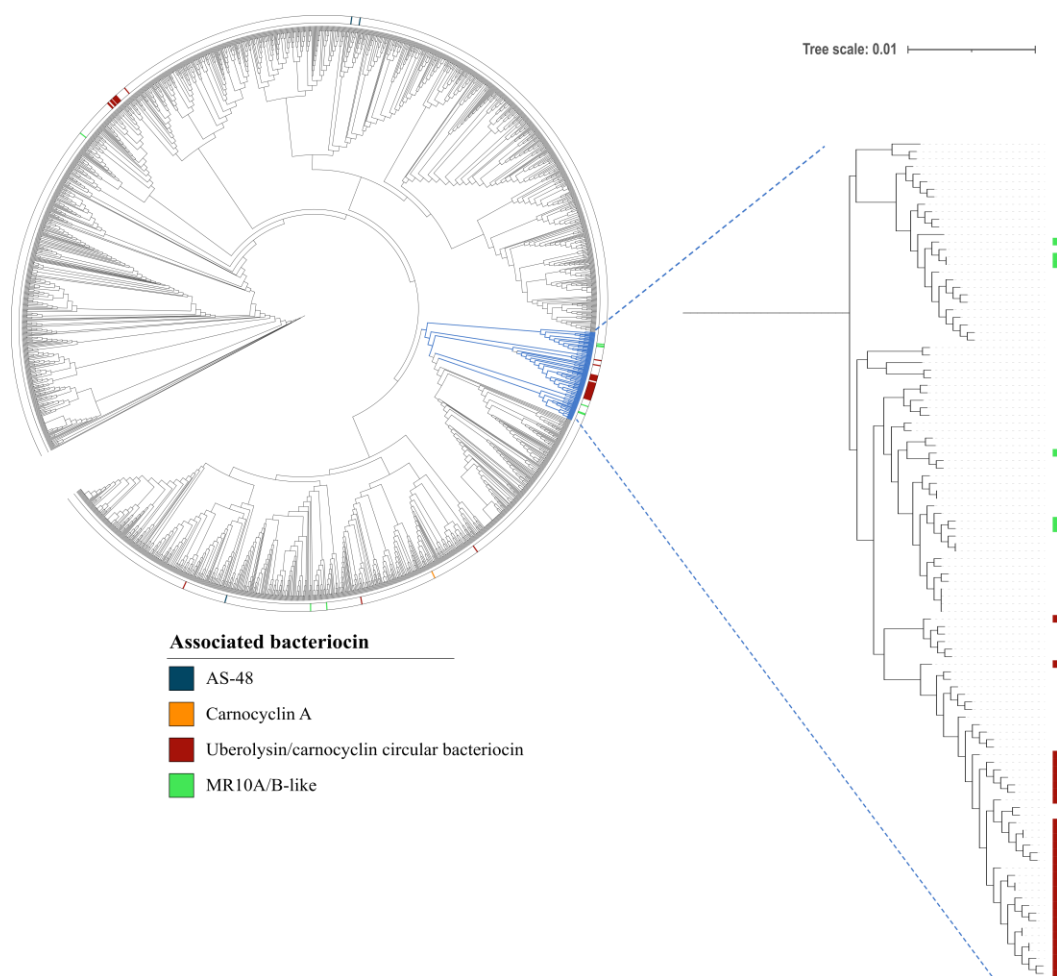


Figure V.5. Phylogenetic tree of bacteriocin-associated genomes. Left tree represent the distribution of uberolysin/carnocyclin family bacteriocins (red), carnocyclin A (orange), AS-48 enterocin (blue) and MR10-like bacteriocins (green) among *E. faecalis* genomes. Right tree corresponds to the cluster marked in blue in the circular tree phylogenetic. It zooms in the distribution of the enterocins MR10-like and the uberolysin/carnocyclin circular bacteriocin.

4. Discussion

Bacteriocins are acknowledged as important biological traits in bacterial ecology and evolution (Riley & Wertz, 2002), although little information is available about their distribution among wild populations. In this study, we have presented the genomes of the strains *E. faecalis* S-48 (AS-48 producer), *E. faecalis* UGRA10 (AS-48 producer), and *E. faecalis* MRR10-3 (MR10A/B producer); and compared these strains with enterococcal genomes carrying other circular and leaderless enterocins. Despite these *Enterococcus* have shown a common enterocin immunity system (Teso-Pérez et al., 2021), we have shown here that they have little genomic relationship, even within the same type of enterocin. Only the carnocyclin/uberolysin carriers were tightly clustered in two main groups (Figure V.5)

In general, it has been seen that genome size of enterococcal species lies between 2.2 and 3.5 Mb (Mlaga et al., 2021) with a GC content ranging from 37% to 45% (Panthee et al., 2021). This agrees with the results obtained from our genomes (Table V.1). Mobile genetics elements are one of the main ways in which horizontal gene transfer occurs in organisms. In the genomes of *E. faecalis* and *E. faecium*, plasmids are widespread, facilitating the acquisition of antimicrobial resistance determinants, bacteriocins, virulence factors, and other adaptive traits throughout the genus and beyond (Lebreton et al., 2013; Palmer et al., 2012). In fact, bacteriocin gene clusters are mainly found in plasmids, although in some cases they can also be located in the chromosome (Criado et al., 2006; Martín-Platero et al., 2006). This could explain why the genomes of *E. faecalis* S-48 and UGRA 10 are slightly larger than that of *E. faecalis* MRR10-3, since no plasmid has been found in the genome of *E. faecalis* MRR10-3.

The functional analysis of enterococcal genomes varies according to the studied strain, being able to find genes and proteins related to catalytic activity, membrane transport, metabolism of amino acids, carbohydrates and nucleotides or protein processing (Apostolakos et al., 2022; Beukers et al., 2017; Hua et al., 2018; Panthee et al., 2021; van Schaik et al., 2010). In our case, the genes and proteins had functions mainly related to the binding of DNA and ATP, as well as being involved in the regulation of DNA transcription or membrane transport (Figure V.1), being the main function of the proteins found in the three genomes the hydrolysis of NTP (P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase family) (Figure V.2). Similar results have been found in the functional analysis of core-genomes, where the proteins and genes involved in the metabolism of proteins, amino acids and carbohydrates stand out, as well as catalytic activity, membrane transport or ATP-binding (Liu et al., 2019b; Papadimitriou et al., 2021; Quintela-Baluja et al., 2022). In our case, core-genes of strains associated with bacteriocins are mainly involve in regulation of DNA-templated transcription, membrane transport or ATP and DNA binding, although, to a lesser extent, functions related to carbohydrate metabolism or proteolysis were also found (Supplementary Figure SV.1 and Supplementary Figure SV.2). Although there were a greater number of core genes in the genomes associated with MR10-like enterocins, this might be due to the fewer genomes of this group, because the size of the core genome is negatively related with the number of strains compared (Zhong et al., 2017) with said bacteriocins and therefore their core-

genome is higher than that found in genomes associated with circular bacteriocins (Figure V.4).

Analysis of resistance genes (RG) and virulence factors (VF) showed a diverse collection of RG and VF associated to pathogenic enterococci (Figure V.3). However, some of the known characteristic pathogenicity factors were not found, such as vancomycin resistance genes, or genes related to the production of exotoxins such as CylR2, CylL-1, CylL-s and CylM (Kiruthiga et al., 2020). None of them perfectly matched the virulence factor profile of *E. faecalis* V583 (the pathogenic model of reference)(ac.no.: GCF 000007785.1)(Sahm et al., 1989) or *E. faecalis* Symbioflor 1 (a probiotic strain), with different degree of overlap (ac.no.: GCA_000317915.1). Additionally, neither of the two ST to which S48 and UGRA10 belong were found to be part of a clonal complex or to certain lineages associated with hospital-acquired infections *E. faecalis* (Willems et al., 2011). Taken all together, these results do not allow to elucidate the pathogenic potential of these strains. Therefore, experimental analysis on pathogenicity will be needed to unveil the pathogenicity potential of these strains.

With regard to MGEs, we highlight the conjugative element Tn6009 found in URA10 since it has been seen to carry the Tetracycline-(*tetM*) resistance gene (Hegstad et al., 2010), which agrees with the *tet(M)* resistance gene found in the genome of UGRA10. The ISEfa8 insertion sequence located in UGRA10 and S48 also carries the *tet(M)* gene (Mbanga et al., 2021) although it is more frequent in *E. faecium* strains. Resistance to tetracycline is one of the most commonly acquired forms of antibiotic resistance in *Enterococcus* food isolates being *tetM*, *tetL* and *tetS* the mainly genes that confer this resistance (Ogier & Serror, 2008). Regarding the rest of the insertion sequences, these were generally associated with the genera *Lactococcus* and *Listeria* and all of them classified as DDE transposases, which are transposase enzymes that contain three amino acids: aspartic acid (D), glutamic acid (E) and another aspartic acid (D) (DDE) in their active site essential for transposase activity(Nesmelova & Hackett, 2010).

In addition, CRISPR sequences were found. CRISPR-Cas systems help protect bacterial genomes from prophage integration. (Ghattargi et al., 2018). Despite having found multiple CRISPR sequences, it has not been possible to identify any CRISPR-Cas system of those already described (Makarova & Koonin, 2015). Previously, other cases of orphaned CRISPR systems of *cas* genes have been described in *E. faecalis* (Hullahalli

et al., 2015), which may correspond to remnants of non-functional CRISPR-Cas systems, or that could work remotely with each other (Zhang & Ye, 2017).

The comparative analysis between our genomes and other *E. faecalis* genomes of enterocin carriers of the same type showed little genomic cohesion between them (Figure V.5). Only in the case of uberolysin/carnocycline carriers a higher phylogenetic relationship between the strains were found (Figure V.5). Although the production of bacteriocins is widely distributed, their ecological role is still unclear. The main role assigned to bacteriocins is as antagonistic substance, allowing a strain to invade a given niche or by preventing its niche from being invaded by others (Kerr et al., 2002; Riley & Gordon, 1999). On the other hand, it has been postulated, at least in some cases as in Gram positive bacteria, that bacteriocins could function as signaling peptides in quorum sensing (Gobbetti et al., 2007), or as communication signals in bacterial consortia (Hibbing et al., 2010). Indeed, bacteriocins usually have a narrow spectrum, which would allow for kin recognition. However, our results show low cohesion between the enterocin carriers. Thus, they cannot act for the recognition of close relatives as they show little genomic overlap. Therefore, it is possible that the acquisition of this group of bacteriocin genes is transient under an evolutionary point of view, acquired spontaneously through Horizontal Gene Transfer (HGT) due to the local environment where the strains are found; providing an ecological advantage over competing strains that do not contain such genes (Heilbronner et al., 2021). Only in the case of genomes associated with uberolysin/carnocyclin circular bacteriocin, we found a higher phylogenetic relationship between the strains, although a single monophyletic cluster is still not observed.

Enterococci are a controversial bacterial group. Among its multiple applications, its use as probiotics or in the food industry stands out. However, it should not be forgotten that some enterococci can act as opportunistic pathogens. Thus, after the genomic analysis carried out in the present work, the need for more studies is revealed to be able to elucidate what genomic characteristics such as antibiotic resistance or virulence factors profiles, define an *Enterococcus* as potentially pathogenic, since there are no clear characteristics that differentiate them. In this way, the selection of enterococcal strains for their biotechnological use could be optimized with a deeper understanding of its functional role. Furthermore, although our comparative analysis provided some insights into the spread of genes related to bacteriocin production and resistance, studies are still needed to elucidate the true ecological role of bacteriocins in populations.

5. References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Apostolakos, I., Tsigkirimani, M., Paramithiotis, S., & Mataragas, M. (2022). Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of *Enterococcus spp.* Isolated from Dairy Products: Genomic Diversity, Functional Characteristics, and Pathogenic Potential. *Applied Sciences*, *12*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/app12199620>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Beukers, A. G., Zaheer, R., Goji, N., Amoako, K. K., Chaves, A. V., Ward, M. P., & McAllister, T. A. (2017). Comparative genomics of *Enterococcus spp.* isolated from bovine feces. *BMC Microbiology*, *17*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0962-1>
- Bonacina, J., Suárez, N., Hormigo, R., Fadda, S., Lechner, M., & Saavedra, L. (2017). A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA Research*, *24*(1), 11-24. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw043>
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). *Enterococci* in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, *76*(4), 685-706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, *30*(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Criado, R., Diep, D. B., Aakra, A., Gutiérrez, J., Nes, I. F., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2006). Complete Sequence of the Enterocin Q-Encoding Plasmid pCIZ2 from the Multiple Bacteriocin Producer *Enterococcus faecium* L50 and Genetic Characterization of Enterocin Q Production and Immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6653-6666. <https://doi.org/10.1128/AEM.00859-06>
- Dubin, K., & Pamer, E. G. (2014). *Enterococci* and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiology spectrum*, *5*(6), 10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016>
- Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiology Spectrum*, *7*(4), 7.4.9. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
- Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X., & Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP Analyses Demonstrate a Distant Separation of the Hospital and Community-Associated Clades of *Enterococcus faecium*. *PLOS ONE*, *7*(1), e30187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030187>
- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, *32*(10), 765-771. <https://doi.org/10.1139/m86-141>

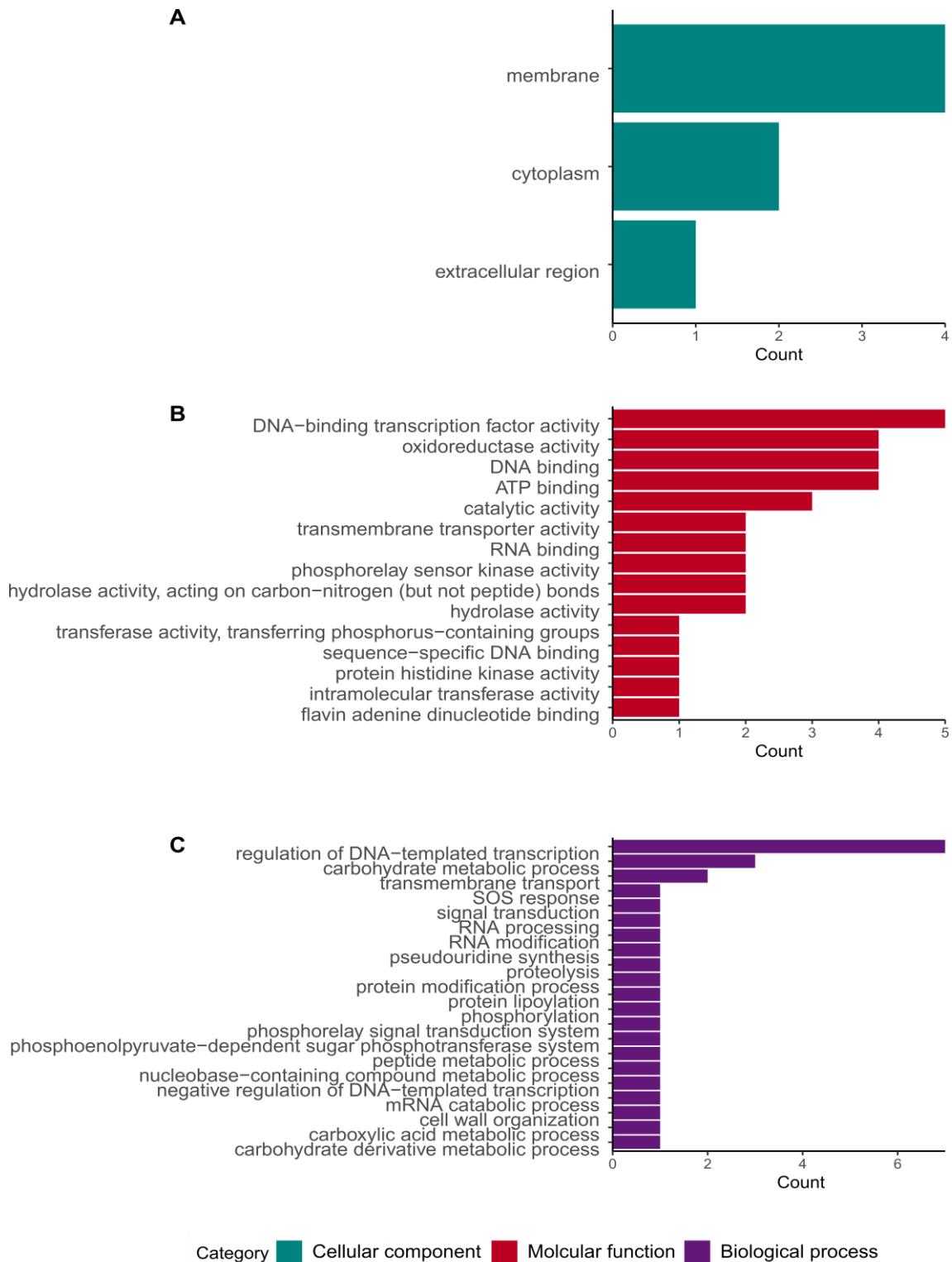
- Gene Ontology Consortium. (2021). The Gene Ontology resource: Enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D325-D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
- Ghattargi, V. C., Gaikwad, M. A., Meti, B. S., Nimonkar, Y. S., Dixit, K., Prakash, O., Shouche, Y. S., Pawar, S. P., & Dhotre, D. P. (2018). Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. *BMC Genomics*, 19, 652. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5043-9>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., & Limitone, A. (2007). Cell–cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.012>
- Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W52-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G., & Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 541-554. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x>
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hua, R., Xia, Y., Wu, W., Yan, J., & Yang, M. (2018). Whole transcriptome analysis reveals potential novel mechanisms of low-level linezolid resistance in *Enterococcus faecalis*. *Gene*, 647, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.008>
- Hullahalli, K., Rodrigues, M., Schmidt, B. D., Li, X., Bhardwaj, P., & Palmer, K. L. (2015). Comparative Analysis of the Orphan CRISPR2 Locus in 242 *Enterococcus faecalis* Strains. *PloS One*, 10(9), e0138890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138890>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101-109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kao, P. H. N., & Kline, K. A. (2019). Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), 2932-2945. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.030>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), 308-320. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature*, 418(6894), Article 6894. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., & Malaiyan, J. (2020). Improved detection of esp, hyl, asa1, gelE, cylA virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC Research Notes*, 13, 170. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05018-0>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus spp.*—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>

- Lebreton, F., van Schaik, W., McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., Corander, J., Cheng, L., Saif, S., Young, S., Zeng, Q., Wortman, J., Birren, B., Willems, R. J. L., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio*, 4(4), e00534-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00534-13>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019a). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687-D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, G., Wang, Y., Li, X., Hao, X., Xu, D., Zhou, Y., Mehmood, A., & Wang, C. (2019b). Genetic and Biochemical Evidence That *Enterococcus faecalis* Gr17 Produces a Novel and Sec-Dependent Bacteriocin, Enterocin Gr17. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01806>
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1311, 47-75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4
- Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., & Maqueda, M. (1990). A transferable plasmid associated with AS-48 production in *enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2817-2818. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2817-2818.1990>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein «salting-out» procedure. *Analytical Biochemistry*, 366(1), 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- Mbanga, J., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Allam, M., Ismail, A., & Essack, S. Y. (2021). Genomic Analysis of *Enterococcus spp.* Isolated From a Wastewater Treatment Plant and Its Associated Waters in Umgungundlovu District, South Africa. *Frontiers in Microbiology*, 12, 648454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.648454>
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J. V., Spanogiannopoulos, P., ... Wright, G. D. (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- Mlaga, K. D., Garcia, V., Colson, P., Ruimy, R., Rolain, J.-M., & Diene, S. M. (2021). Extensive Comparative Genomic Analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Reveals a Direct Association between the Absence of CRISPR-Cas Systems, the Presence of Anti-Endonuclease (ardA) and the Acquisition of Vancomycin Resistance in E. faecium. *Microorganisms*, 9(6), 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061118>
- Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A. (2019). Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00300>
- Nesmelova, I. V., & Hackett, P. B. (2010). DDE Transposases: Structural Similarity and Diversity. *Advanced drug delivery reviews*, 62(12), 1187-1195. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.06.006>
- Ness, I. F., Diep, D. B., & Ike, Y. (2014). Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N.

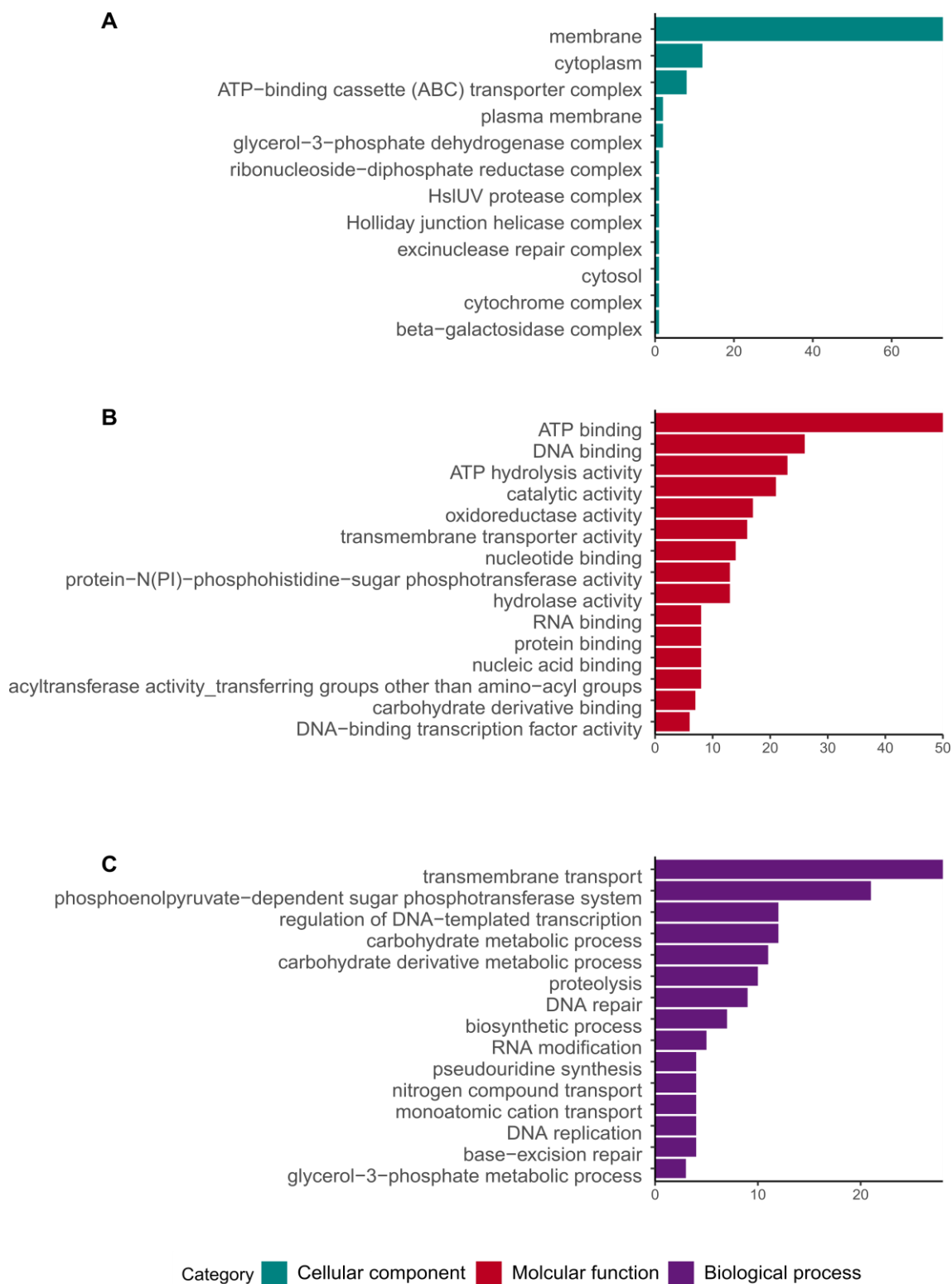
- Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>
- Ogier, J. C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, *126*, 291-301.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*(22), 3691-3693.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Palmer, K. L., Godfrey, P., Griggs, A., Kos, V. N., Zucker, J., Desjardins, C., Cerqueira, G., Gevers, D., Walker, S., Wortman, J., Feldgarden, M., Haas, B., Birren, B., & Gilmore, M. S. (2012). Comparative genomics of *enterococci*: Variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio*, *3*(1), e00318-00311. <https://doi.org/10.1128/mBio.00318-11>
- Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(5), 632-639.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.004>
- Panthee, S., Paudel, A., Hamamoto, H., Ogasawara, A. A., Iwasa, T., Blom, J., & Sekimizu, K. (2021). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis* EF-2001, a probiotic bacterium. *Genomics*, *113*(3), 1534-1542.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.021>
- Papadimitriou, K., Venieraki, A., Tsigkrimani, M., Katinakis, P., & Skandamis, P. N. (2021). Whole-genome sequence data of the proteolytic and bacteriocin producing strain *Enterococcus faecalis* PK23 isolated from the traditional Halitzia cheese produced in Cyprus. *Data in Brief*, *38*, 107437. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107437>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2022). Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *134*(4), 277-287.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.07.007>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, *5*(3), e9490.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quintela-Baluja, M., Jobling, K., Graham, D. W., Tabraiz, S., Shamurad, B., Alnakip, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Carrera, M., & Calo-Mata, P. (2022). Rapid Proteomic Characterization of Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* Strains from Foodstuffs. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22), Article 22.
<https://doi.org/10.3390/ijms232213830>
- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, *7*(3), 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 117-137.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering, Design and Selection*, *12*(2), 85-94. <https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85>
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J. M., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Murray, B. E., del Campo, R., & Willems, R. J. L. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination.

- Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2220-2228.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02596-05>
- Sahm, D. F., Kissinger, J., Gilmore, M. S., Murray, P. R., Mulder, R., Solliday, J., & Clarke, B. (1989). In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(9), 1588-1591.
<https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1588>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D32-36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., & Shankar, N. (2003). Pathogenic *enterococci*: New developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(12), 2622-2636. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3138-0>
- Teso-Pérez, C., Martínez-Bueno, M., Peralta-Sánchez, J. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Fárez-Vidal, M. E., & Martín-Platero, A. M. (2021). Enterocin Cross-Resistance Mediated by ABC Transport Systems. *Microorganisms*, 9(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071411>
- van Schaik, W., Top, J., Riley, D. R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J. E., Schapendonk, C. M., Hendrickx, A. P., Nijman, I. J., Bonten, M. J., Tettelin, H., & Willems, R. J. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, 11(1), 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-239>
- Vergis, E. N., Shankar, N., Chow, J. W., Hayden, M. K., Snyderman, D. R., Zervos, M. J., Linden, P. K., Wagener, M. M., & Muder, R. R. (2002). Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*, 35(5), 570-575. <https://doi.org/10.1086/341977>
- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: High-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 872-900. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x>
- Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., & Zhang, X. (2022). Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(7), 2258. <https://doi.org/10.3390/molecules27072258>
- Zhang, Q., & Ye, Y. (2017). Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: Isolated *cas* genes and classes of CRISPR like elements. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 92.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1512-4>
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., & Sun, Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, 196, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. (2010). A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6), 432-439.
<https://doi.org/10.1007/s10930-010-9270-4>

6. Supplementary Material



Supplementary Figure SV.1. Twenty most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories of circular bacteriocin-associated genomes. The X axis represents the counts for each term, while the Y axis shows the names of each term within each category.



Supplementary Figure SV.2. Twenty most abundant GO terms in (A) Cellular component, (B) Molecular function and (C) Biological processes categories of MR10-like bacteriocin-associated genomes. The X axis represents the counts for each term, while the Y axis shows the names of each term within each category.

Supplementary Table SV.1. Genomes found associated with some bacteriocin with a saposin-like fold.

Assembly Accession Number	Associated bacteriocin
GCF_004126045.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_004126115.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_004126225.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000390605.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000390625.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000393175.1	AS-48
GCF_000393295.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000394515.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000647995.1	Carnocyclin A
GCF_000648155.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_002945995.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003795755.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_004120295.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_004126315.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_004126325.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_009830455.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_009830715.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000147985.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000148005.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000163795.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_000163815.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001054535.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001054545.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001055725.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001055765.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001055875.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_001639005.2	Uberolysin/carnocyclin
GCF_002751015.2	Uberolysin/carnocyclin
GCF_002763375.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003709885.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003709905.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003709925.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003709945.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003709965.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711625.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711635.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711665.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711675.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711705.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711725.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711745.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711755.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711825.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_003711785.1	Uberolysin/carnocyclin

Genome Accession Number	Associated bacteriocin
GCF_003996775.2	Uberolysin/carnocyclin
GCF_009662495.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_012030205.1	Uberolysin/carnocyclin
GCF_009910555.1	MR10-like bacteriocins
GCF_004793935.1	MR10-like bacteriocins
GCF_002163735.1	MR10-like bacteriocins
GCF_002221625.2	MR10-like bacteriocins
GCF_001689055.2	MR10-like bacteriocins
GCF_003319925.1	MR10-like bacteriocins
GCF_001563075.1	MR10-like bacteriocins
GCF_002140075.1	MR10-like bacteriocins

CAPÍTULO VI. Bacteriocin-producing enterococci modulate the microbiota present in cheese made from raw milk

Claudia Teso-Pérez¹, Areli López-Gazcón¹, Juan Manuel Peralta Sánchez^{1,2}, Manuel Martínez-Bueno¹, Eva Valdivia^{1,3}, María Esther Fárez-Vidal^{4,5,*}, Antonio M. Martín-Platero^{1,*}.

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva, s/n, 18071, Granada, Spain.

² Departamento de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla, Spain

³ Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, C/ Ramón y Cajal, 4, 18071 Granada, Spain

⁴ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18016 Granada, Spain

⁵ Instituto de Investigación Biomédica IBS. Granada. Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Abstract

Cheese is a food product of high demand worldwide whose production involves the interplay of multiple Lactic Acid Bacteria (LAB) species. These LAB form communities that actively breakdown proteins and fat from milk, and produce volatile fatty acids, vitamins, and other important nutrients. The microbial communities that are established in a specific cheese are as diverse as cheese types, whose composition will determine ultimately the organoleptic properties of the cheese. The control of these microbial assemblages is mainly pursued by controlling abiotic factors (e.g temperature, salinity), and the addition of starter cultures. But despite the addition of starter cultures, non-starter LAB play a major role in cheese ripening and constitute a large fraction of the final microbial community. In this transition from the initial microbiota to the final microbial community in a matured cheese, biotic interactions play an important role, yet the role of these interactions as drivers of the final microbial assemblage are largely unknown. Here we tested the effect of bacteriocin production on LAB communities as a driver of microbial diversity, using this cheese microbiota as a model system. We have used the *Enterococcus* genus as a model bacterium due to its frequent production of enterocins and lower populations level among the whole community. The latter allowed us to test the enterocin production at local scale (i.e. within enterococcal populations) and at global scale (i.e. within the whole community). Thus, by characterizing and quantifying LAB communities from cheese sample, and screening the enterocinogenic capabilities of enterococcal populations, we have found a general trend of higher diversity in LAB communities associated to enterocin producers. However, the highest diversity is found at low-moderate levels of enterocin producers among enterococci. Therefore, our results showed that low proportion of enterocin producers among enterococcal populations increased LAB diversity in cheese microbial communities. To what extent these results can be extended to other LAB species or even other wild microbial ecosystems will need further research. Anyhow, our study pointed out bacteriocin production as an important factor to consider in controlling LAB communities during cheese ripening.

Keywords: *Enterococcus*, cheese microbiota, microbial interactions; microbial diversity; bacteriocins

1. Introduction

Cheese is a dynamic ecosystem that is constantly influenced by both external and internal factors including cheese-making methods, ripening conditions and interactions among microbial communities. During the ripening process, multiple biochemical reactions and microbial interactions occur, leading to the development of desirable product characteristics such as excellent taste and aroma, protection against spoilage and foodborne pathogens or health modulation (Peláez & Requena, 2005).

The microbial communities in cheese are very complex. Among the microorganisms that can be found in cheese, LAB (lactic acid bacteria) are the most abundant bacteria. LAB comprise a heterogeneous group of bacteria that have the ability to ferment carbohydrates to lactic acid via homo- or heterofermentative metabolism (Settanni & Moschetti, 2010). This fermentation allows the rapid acidification of fermented milk (Leroy & De Vuyst, 2004), inhibiting the growth of most undesirable microorganisms extending the shelf life of food. In addition to their capacity to produce lactic acid, LAB contribute to flavor, texture, and nutritional value of the cheese, thanks to the production of different compounds, such as diacetyl, acetoin, acetaldehyde or acetic acid (Bintsis, 2018) and a broad range of volatile compounds. Although naturally occurring LAB occurring in milk have traditionally been used, currently it is more common to add starter cultures with known selected strains of different LAB to ensure consistency of the fermentation process (Kelleher et al., 2015). In addition, factors such as the temperature during production, salt level, or humidity are used to control the growth of the microbiota of cheeses (Gobbetti et al., 2018). However, it is common that a secondary or adventitious lactic microbiota, called NSLAB (non-starter Lactic Acid Bacteria), develops spontaneously in all cheeses, either pasteurized or made from raw milk, especially during ripening (Settanni & Moschetti, 2010). This microbiota usually not contribute to acid production (Beresford et al., 2001), but play a major role in cheese ripening influencing the final flavor and texture of the cheese (Parente et al., 2017). In particular, cheeses made with raw milk usually have complex microbiota characterized by the succession of different microorganisms, from starter LAB to NSLAB, throughout cheesemaking (Irlinger & Mounier, 2009). Succession of communities might be due to conditions in which cheese is ripened and to the dynamic interactions that occur among microorganisms (Peláez & Requena, 2005). These interactions can be beneficial, neutral, or harmful, affecting the outcome of the cheese ripening process.

Among all the possible interactions, antagonism is probably the most commonly observed in dairy fermentations, either through the production of acids from metabolism, the presence of bacteriophages, or the production of metabolites such as bacteriocins (Peláez & Requena, 2005). Bacteriocins are ribosomal synthesized antimicrobial peptides whose purpose is to kill or inhibit the growth of closely related bacteria (Camargo Peralta et al., 2009). They are considered safe and natural preservatives that have immense potential to be employed independently or alongside other techniques in preserving food (Trejo-González et al., 2022). Usually, bacteriocin-producing strains have mechanisms to protect themselves from their own bacteriocins, so they could be use as “protective cultures” (Mayo et al., 2021) inhibiting the growth of pathogens and spoilage microorganisms in cheese. A large majority of LAB produce bacteriocins despite the cost associated with their production (Trejo-González et al., 2022) and contrasts with the high diversity of the microbial communities. Thus, its ecological function is not well understood.

Relationships between negative interactions and diversity were introduced by Paine (1966). These antagonistic interactions allow for greater biodiversity by preventing a species outcompetes others. Similarly, bacteriocins could play an important role in structuring closely related populations (Cordero et al., 2012), producing ecological units of producer and resistant strains within populations. Or even the ecological units could arise from the dynamics between producing, resistant and sensitive strains similar to the “rock scissor paper” kids game, where the toxin producer could kill the toxin sensitive strain, the toxin sensitive strain could outgrow the toxin resistant strain, likewise the toxin resistant strain could outgrow the toxin producing strain (Riley & Gordon, 1999).

Considering this background, the aim of the present study was to elucidate the effect of bacteriocin producer populations on community diversity. Here we describes the positive effect of enterocin production by enterococcal populations on the overall LAB community biodiversity at small producer population levels. Thus, this paper shed light into the impact of antimicrobial peptide production as a driver of LAB biodiversity.

2. Material and methods

2.1. Sampling and microbial enumeration

Due to the higher diversity in raw milk cheese (Coelho et al., 2022), we selected fifteen commercial raw milk ripened cheese (Supplementary Table SVI.1), including: five from cow milk, five from sheep milk, and five from goat milk. Cheese samples (5 g) were homogenized for 2 min in 45 mL of a prewarmed (37 °C), sterile, 2% sodium-citrate solution in sterile plastic bags with lateral filters using a masticator lab blender (IUL Instruments, Barcelona, Spain). From this, homogenized ten-fold serial dilutions were prepared in sterile 2% sodium-citrate solution up to the 10⁻⁶ dilution. A 100 µL aliquot was spread in triplicate on agar plates for bacterial enumeration on: Brain Heart Infusion agar (BHI, VWR Chemicals) for total LAB, and Kenner Fecal agar (KF, VWR Chemicals) for enterococci. Viable counts were obtained after incubation of 3 days; at 28 °C for total LAB enumeration, and at 37 °C for enterococci enumeration. Bacterial counts were calculated as the mean values of the 3 determinations after log transformation.

2.2. Antimicrobial assays and microbial isolation

To estimate the frequency of enterocin producer populations we randomly isolated from 45 to 52 enterococcal strains per sample from KF medium and tested them for their antimicrobial capacities, following the double-layer plate method described by Gratia and Fredericq (1946). Enterococcal strains were grown in BHI agar buffered (BHA-B) in sodium phosphate buffer at pH7 0.1M (in triplicates) and incubated at 37°C overnight. After the incubation, the plates were overlaid with 5 mL of BHA-B soft agar (1.8% BHI, 0.8% agar) inoculated at 2% with an overnight culture of the indicator strains. *Listeria innocua* CECT4030 and *Enterococcus faecalis* S-47 (lab collection) were the strains used as indicator strains. The plates were incubated again overnight at 37 °C to allow the growth of the indicator strain. Colonies that showed a clear inhibition zone around the strain spot was considered as a enterocin producer. Subsequently, a representative set of 67 strains according to production frequencies were isolated. Pure cultures were stored in 20% glycerol at -80 °C.

To determine the cross-resistance between isolated strains, all the strains were assayed against each other using the double layer plate method mentioned previously. The plates were incubated again overnight at 37 °C to allow the growth of the indicator

strain. Colonies that showed a clear inhibition zone around the strain spot were considered as enterocin producers

2.3. DNA extraction

To characterize enterococcal populations and microbial communities, DNA was extracted from each strain and each cheese sample. To this end we followed the MSOP (Modification of the 'protein Salting-Out Procedure) from Martin-Platero et al., (2007). Briefly, cells from 1 mL from an overnight culture of each isolate or from 2.5 g of cheese were resuspended in 100 μ L of lysozyme buffer and incubated for 30 min at 37 °C to hydrolyse the cell wall, followed by the addition of 600 μ L of lysis buffer and an another incubation at step at 80 °C to facilitate the cell lysis. Then, cell debris and proteins were removed by adding 200 μ L of the protein precipitation solution by mixing, chilling on ice for 10 min, and 10 min centrifugation at 20,000 g. DNA was then precipitated with equal volume of isopropanol and washed with 70% ethanol. The DNA was finally dried to remove any ethanol trace and dissolved in 200 μ L of 0.5 Tris-EDTA buffer. DNA concentration was measured using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.4. Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA)

To estimate population variability within the *Enterococcus* genus in each sample we characterized bacterial isolates by MLSA. To this end, we construct a phylogenetic tree based on the concatenated sequences of five housekeeping genes (Table VI.1): *adk* (adenylate kinase), *atpA* (ATP synthase, alpha subunit), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) (Homan et al., 2002), and *groEL* (chaperone GroEL). The latter were designed for this study using Hyden software (Linhart & Shamir, 2007), allowing for two mismatches and 2 degenerate positions, targeting an amplicon size between 400 and 600 bp.

Each gene for each bacterial isolate was PCR amplified by the following program: an initial denaturing step of 94 °C for 3 min followed by an amplification step of 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, and 30 s at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. Reactions were performed in a final volume of 50 μ l with Taq polymerase (1x) and buffers from IBIAN Technologies. Primers were used at a concentration of 0,5 μ M and 100ng of DNA was added. PCR products were purified with the PCR clean up NucleoFast 96 PCR (Macherey-Nagel) and sequenced with PCR forward primers by Sanger

sequencing (Sanger et al., 1977) through the Stab Vida (Universidade de Nova de Lisboa) sequencing service. Next, each sequence was taxonomically assigned by the best blast hit on NCBI's blast tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997).

Table VI.1. Primers used for MLSA analysis.

Primer pair	Gene	Primer sequence (5' -> 3')	Amplicon size (bp)	Reference
adk	Adenylate	TATGAACCTCATTTTAATGGG	437	
adk2	kinase	GTTGACTGCCAAACGATTTT´		
atpA1	ATP synthase,	CGGTTTCATACGGAATGGCACA	556	
atpA2	alpha subunit	AAGTTCACGATAAGCCACGG		
gyd1	Glyceraldehyde	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGG	395	(Homan et al., 2002)
gyd2	-3-phosphate	C		
	dehydrogenase	CATTTTCGTTGTCATACCAAGC		
gdh1	Glucose-6-	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530	
gdh2	phosphate	CCAAGATTGGGCAACTTCGTC		
	dehydrogenase	CCA		
GroELF	Chaperone	GYGAAAAATTWCAAGAACG	480	This study
GroELR	GroEL	ACGACWGCTTCAGTYGTTAA		

Finally, a phylogenetic tree was constructed with the concatenated sequences. First, each gene was aligned and trimmed with the MEGA-X software (version 10.1.8) (Kumar et al., 2018) using the clustalW algorithm (Thompson et al., 1994). Then, the concatenation of the five genes was used to construct a maximum likelihood phylogenetic tree in MEGA-X with 1000 of bootstrap replications and following an evolution model of Tamura-Nei (ML heuristic method: Nearest-Neighbor-Interchange, number of threads : 3) (Tamura & Nei, 1993).

2.5. Data analysis

2.5.1. 16S rRNA metagenomic sequencing

To determine the microbial composition of cheese samples we constructed and sequenced 16S rRNA metagenomic libraries for each sample. We constructed 16S rRNA libraries corresponding to the V4 variable region by a two steps amplification approach. The first primer pair (Mi_U515F, 5'- TCGTC GGCAG CGTCA GATGT GTATA AGAGA CAGGT GCCAG CMGCC GCGGT AA -3'; and Mi_E786R, 5'- GTCTC GTGGG CTCGG AGATG TGTAT AAGAG ACAGG GACTA CHVGG GTWTC TAAT -3') contained the primer sequences of U515F and E786R targeting the V4 region of the 16S rRNA gene with partial overlap of Illumina primers as described previously (Preheim et al., 2013). This PCR was carried out in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of Phusion

Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 0.3 μ M of each primer, and 5 μ L of template DNA. The amplification program consisted of an initial denaturing step of 98 °C for 1 min followed by an amplification step of 25 cycles of 10 s at 98 °C, 20 s at 52 °C, and 15 s at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. This PCR was purified by the MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology) kit, and amplified again in a second PCR to introduce sample specific barcodes. For each sample, a unique combination of two barcodes were added.

This PCR was carried out in a final volume of 25 μ L containing 12.5 μ L of Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 0.4 μ M of each primer, and 5 μ L of the purified PCR product from the first PCR. The amplification conditions consisted of an initial denaturation step of 98 °C for 1 min followed by an amplification step of 8 cycles of 10 s at 98 °C, 20 s at 55 °C, and 15 s at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. This second PCR was purified again with the same kit as previously indicated. Then, DNA concentration was measured using Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and normalized to the same concentration. High-throughput sequencing was carried out on a Illumina MiSeq platform in the Scientific Instrumental Center at the University of Granada (CIC-UGR, Spain).

2.5.2. Sequences and data analysis

The 16S Illumina reads were processed with QIIME2 2021.11 (Bolyen et al., 2019). First, primers were trimmed with the cutadapt plugin (Martin, 2011), discarding untrimmed sequences. Then, amplicon sequence variants (ASVs) were inferred from the paired reads by the dada2 plugin (Callahan et al., 2016). Due to the expected insertion size of 253 bases for our construction, ASVs with a length shorter than 245 were filtered out. Next, all ASV were aligned with *mafft* method (Katoh et al., 2002) and used to construct a phylogeny. The representative sequences were taxonomically classified with the Silva-138 clustered at a 99% similarity (Quast et al., 2013) by the classify-sklearn method (Pedregosa et al., 2011).

For exploring differences in bacterial diversity we estimated alpha diversity by the ASV richness and Shannon's (Shannon, 1948) and Faith's Phylogenetic diversity (Faith & Baker, 2006) indexes in QIIME2 using a rarefied table at 17,000 sequences depth per sample. These indexes were used to test the effect of antimicrobial strains on community diversity. We performed General Linear Models (GLM), where the diversity

indices were included as dependent variables and the presence of *Enterococcus*-bacteriocin producers as a fixed factor. All the variables followed a Gaussian distribution (Shapiro-Wilk's test of normality, $p > 0.05$) justifying the use of parametric tests.

Furthermore, to test the effect of antimicrobial strains on enterococci population diversity, we estimated alpha diversity by the Faith's Phylogenetic diversity (Faith & Baker, 2006). To quantify the Faith's phylogenetic diversity index we used an inferred phylogenetic tree from the MLSA. In addition, we calculated population richness per cheese by assigning a sequence type (ST) to each strain. To determine ST, unique sequences of each gene were clustered through the USEARCH program (version 11.0.66; identity = 100%) (Robert C., 2010). To determine the strains that contained the same allelic profile, the PHYLOViZ software (version 2.0) (Nascimento et al., 2017) was used. Those that were grouped in the same cluster in four out of the five genes were considered the same population. Any of these indexes followed a Gaussian distribution (Shapiro-Wilk's test of normality, $p > 0.05$), therefore, the relationship between this diversity indexes and the presence of *Enterococcus*-bacteriocin producers was explored using the non-parametric Kluskal-Wallis test.

Additionally, to determine the relationship between alpha diversity and the levels of enterocin producer populations, the Pearson's correlation was estimated between the proportion of enterococci producers and the corresponding alpha diversity.

Finally, to test for difference between coexisting populations against populations of different origin, a t-student test for dependent variables was used to test if there were significant differences in the sensitivity of the strains from the same cheese and from different cheeses.

All statistical analyses were performed with Statistica 10.0 (StatSoft, 2011).

3. Results

3.1. Differential diversity among samples

The LAB communities analyzed included a wide range of microbial counts and compositional variation. Total LAB microbial counts ranged from 2.8×10^5 to 2.6×10^8 CFU/g (Supplementary Table SVI.1; Figure VI.1), whereas enterococcal counts ranged from 6.6×10^2 to 1.1×10^6 CFU/g (Supplementary Table SVI.1; Figure VI.1) except in

two samples where they did not grow. Thus, enterococcal populations levels were present, on average, at 3-fold levels below total LAB.

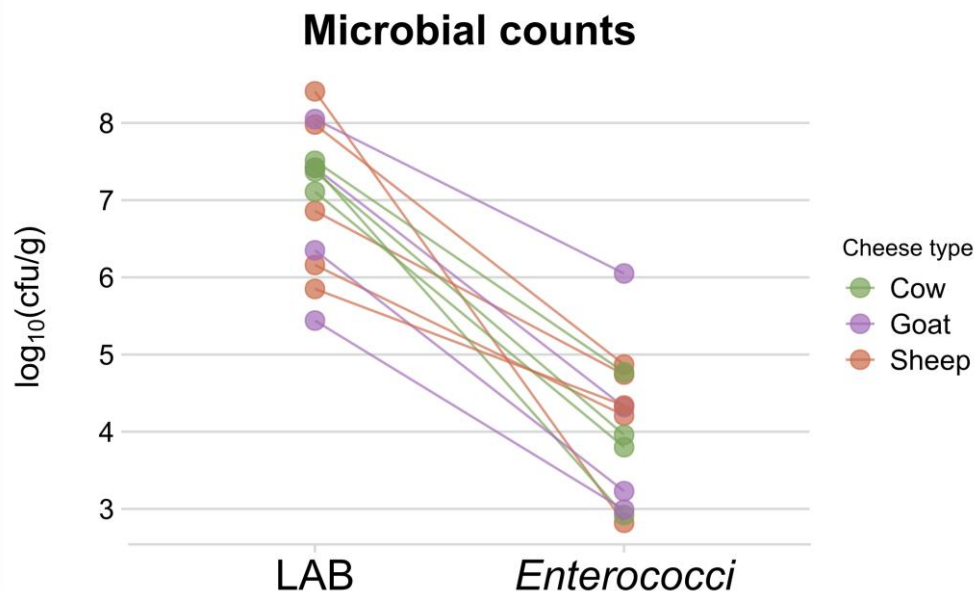


Figure VI.1. Cheese microbial counts. Total LAB counts and their corresponding *enterococci* counts are shown in logarithmic scale. Total LAB counts ranged from 5.4 to 8.4 log₁₀(cfu/g), while *enterococci* counts showed an average of 3 folds below total LAB. Just in two samples there were no growth of *enterococci*. Colors correspond to milk source.

According to the corresponding 16S rRNA metagenomes, LAB communities were dominated by *Lactococcus* and *Streptococcus*, followed by *Lactobacillus*, showing different proportions among samples (Table VI.2, Figure VI.2). By this approach, enterococcal populations were found in all samples at 4 or 5-fold levels below the most abundant genera (i.e. *Lactococcus* or *Streptococcus*), including those where *Enterococcus* did not grow in its selective media (i.e. KF). The total number of observed ASVs ranged from 12.83 to 53.53, where *Enterococcus* varied from the 8th to the 40th position according to the ranked abundances for each sample, with a 24th position average. The other alpha diversity measures ranged from 0.1593 - 3.4817 in the case of the Shannon index, and from 1.190 - 3.360 in the case of Faith PD index.

Concerning enterococci, MLSA analysis identified four species of enterococci, i.e. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* and *E. hirae* (Figure VI.3), being *E. faecalis* and *E. faecium* the most isolated species. The phylogeny inferred by MLSA did not show

homogenous clusters in terms of sample of isolation nor antimicrobial activity. This means that isolated enterococci were not part of a clonal population. However, in the case of *E. faecalis*, the genetic distance between them were very short, with low bootstrap values.

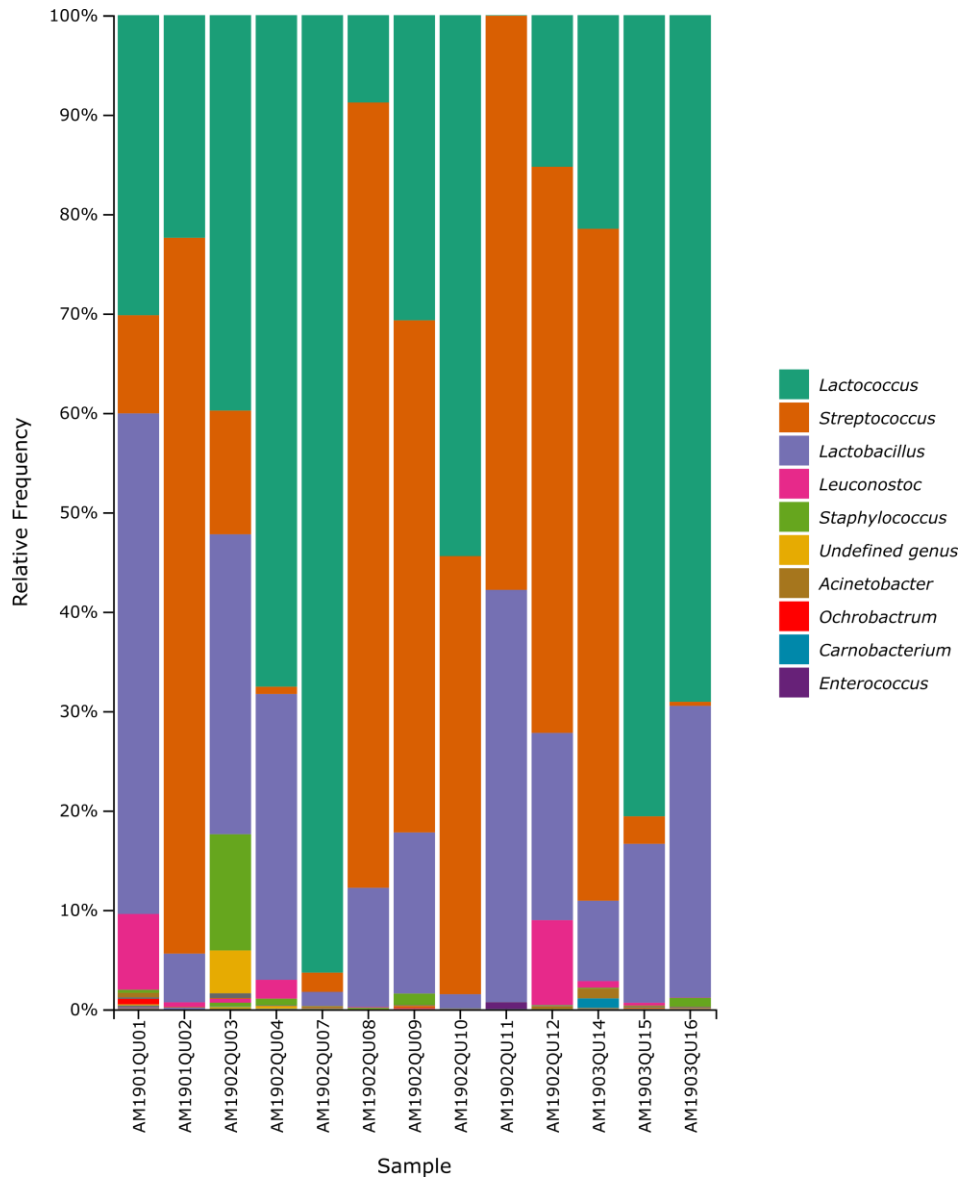


Figure VI.2. Bacterial genera present in raw milk cheeses. In all the samples, the most abundant genera were *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Color legend shows the overall top ten most abundant genera, sorted from the most to the lowest abundant.

Nevertheless, determination of population richness of enterococci isolated by assigning type sequences resulted in a total of 57 different sequence types. For each cheese sample, between 2-7 different type sequences were found.

Table VI.2. Ten most abundant bacterial genera per dairy animal obtained through the analysis of 16S rRNA metagenome. All values are expressed as percentages.

Cheese sample	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Chryseobacterium</i>
AM1901QU01	50.42	30.17	9.88	7.67	0.56	0.45	0.25	0.14	0.13	0.11
AM1901QU02	4.71	22.28	72.36	0.43	0.05	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
AM1902QU03	31.80	41.77	12.74	0.00	0.08	0.00	12.05	0.51	0.03	0.00
AM1902QU04	28.61	67.70	0.75	1.91	0.05	0.00	0.61	0.05	0.01	0.20
AM1902QU05	4.24	1.25	93.98	0.00	0.07	0.09	0.00	0.04	0.00	0.00
AM1902QU07	1.32	96.43	1.95	0.00	0.04	0.11	0.03	0.05	0.00	0.02
AM1902QU08	12.06	8.60	79.12	0.05	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00
AM1902QU09	15.96	30.94	51.49	0.00	0.01	0.03	1.23	0.05	0.00	0.00
AM1902QU10	1.37	54.03	44.51	0.01	0.00	0.01	0.03	0.02	0.00	0.00
AM1902QU11	41.12	0.04	58.17	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
AM1902QU12	19.17	14.96	57.17	8.27	0.01	0.00	0.03	0.08	0.00	0.00
AM1903QU14	8.20	21.06	67.96	0.72	0.01	0.91	0.09	0.03	0.05	0.01
AM1903QU15	16.00	80.59	2.74	0.34	0.12	0.09	0.01	0.04	0.00	0.00
AM1903QU16	29.64	68.91	0.37	0.04	0.03	0.01	0.81	0.12	0.01	0.00
AM1903QU17	0.50	98.87	0.09	0.00	0.00	0.12	0.00	0.02	0.06	0.11

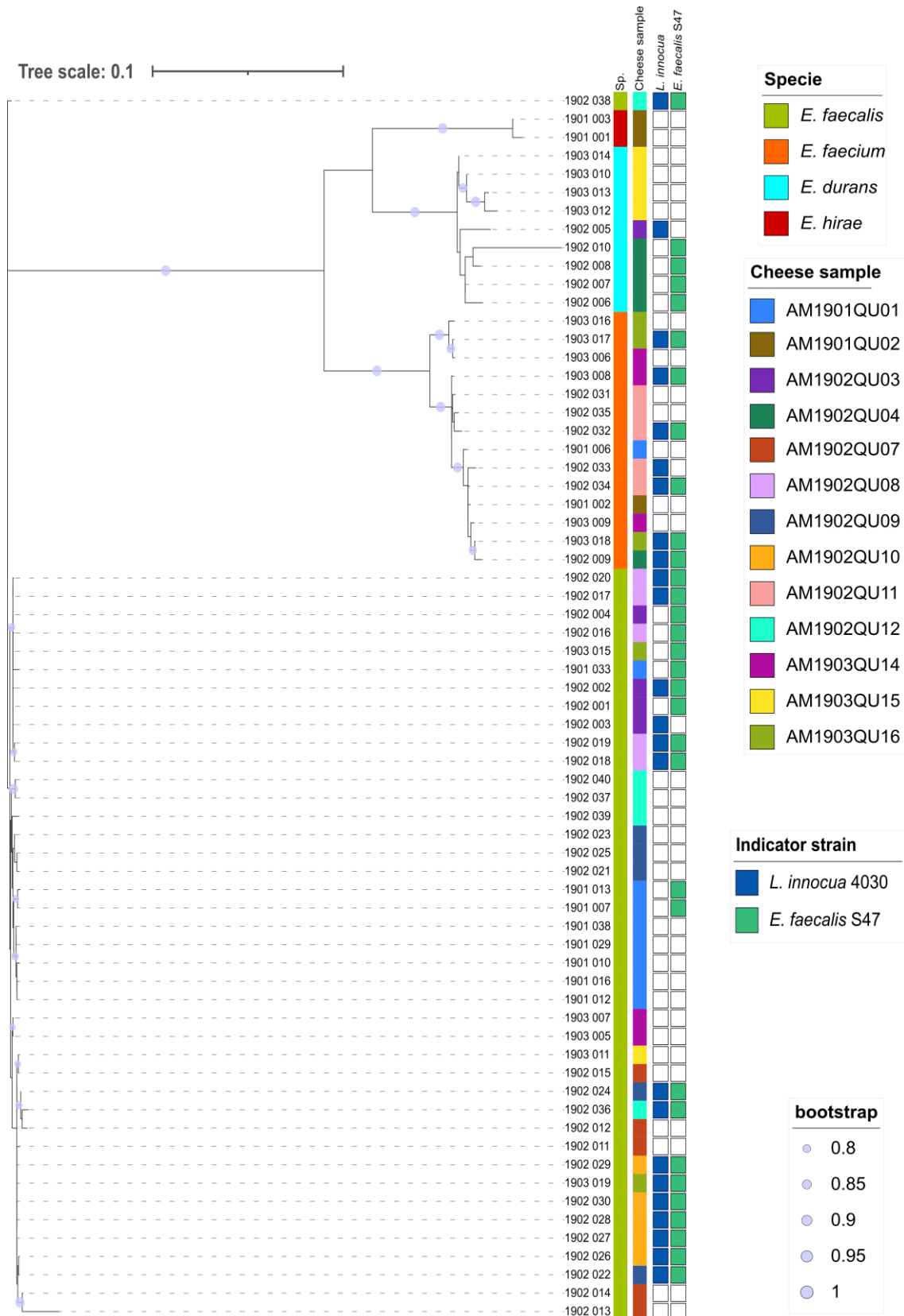


Figure VI.3. Phylogenetic tree of *Enterococcus* strains isolated from cheese made with raw milk. The phylogenetic tree is based in the Multi Locus Sequence Analyses (MLSA). From left to right, the first annotation bar represents the species, being *E. faecalis* (green) and *E. faecium* (orange), *E. durans* (blue) and *E. hirae* (red), the second bar represent cheese sample and the third and fourth bar represent the activity against *L. innocua* and *E. faecalis* S47 respectively.

3.2. Differential antagonistic producers frequency among *enterococci*

The enterococcal populations screened from each sample showed a wide range of antimicrobial activity among samples. Between forty-four and fifty two bacterial strains from each cheese were screened for antimicrobial activity. A 23.64% of them showed antimicrobial activity against *E. faecalis* S-47, while a 18.5% showed antimicrobial activity against *L. innocua* (Figure VI.4, Table VI.3) and a 21.25% against both. Only three samples did not show any antimicrobial activity.

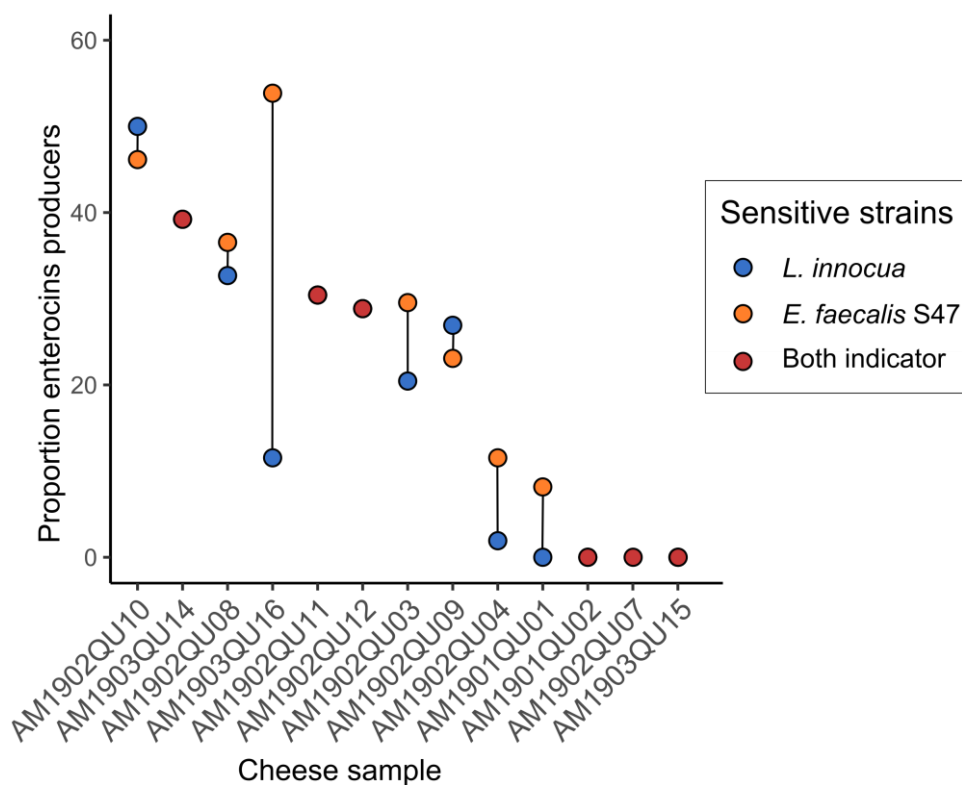


Figure VI.4. Enterocins producers. Proportion of enterocin producers with antimicrobial activity against *E. faecalis* S-47 (yellow circles), *L. innocua* CECT4032 (blue circles) and against both indicator strains (red circles).

Table VI.3. Percentage of enterocin producers per sample.

Cheese sample	% enterocin producers against <i>E.faecalis</i> S47	% enterocin producers against <i>L. innocua</i>
AM1901QU01	8.16	0
AM1901QU02	0	0
AM1902QU03	29.54	20.45
AM1902QU04	11.54	1.92
AM1902QU07	0	0
AM1902QU08	36.54	32.69
AM1902QU09	23.08	26.92
AM1902QU10	46.15	50
AM1902QU11	30.43	30.43
AM1902QU12	28.85	28.85
AM1903QU14	39.2	39.2
AM1903QU15	0	0
AM1903QU16	53.8	11.5

3.3. Impact of enterocin producers on population and community diversity

The presence of enterocin producers within the enterococcal populations did not show a significant effect on *Enterococcus* diversity. Due to the lack of sharp clusters in the MLSA (Figure VI.3), we estimated the population richness and used the inferred phylogenetic tree from the MLSA to quantify the Faith’s phylogenetic diversity index (Faith & Baker, 2006) as an approximation to the enterococcal population diversity in each sample. Neither of the indexes used produce a significant difference between producer and not producers (Table VI.4).

Table VI.4. Effect of enterocin producing populations in enterococcal diversity. Kruskal-Wallis non-parametric test exploring the effects of the presence/absence of *Enterococcus*-bacteriocin producers in different alpha diversity indexes of the enterococci populations.

	H	N	p
Faith’s phylogenetic diversity index	1.02	13	0.31
Population richness	0.15	13	0.69

Regarding the cross immunity of each isolate, it was revealed that those enterococci that were part of the same cheese presented a lower sensitivity index compared to the sensitivity shown between enterococci that did not coexist in the same cheese (Figure VI.5). However, this difference was not significant (Table VI.5).

Table VI.5. t-test of dependents variables exploring the sensitivity of enterococci belonging to the same cheese and different cheeses. D.f. refers to degree of freedom.

	d.f.	N	p
Same cheese * Different cheese	1.02	13	0.068

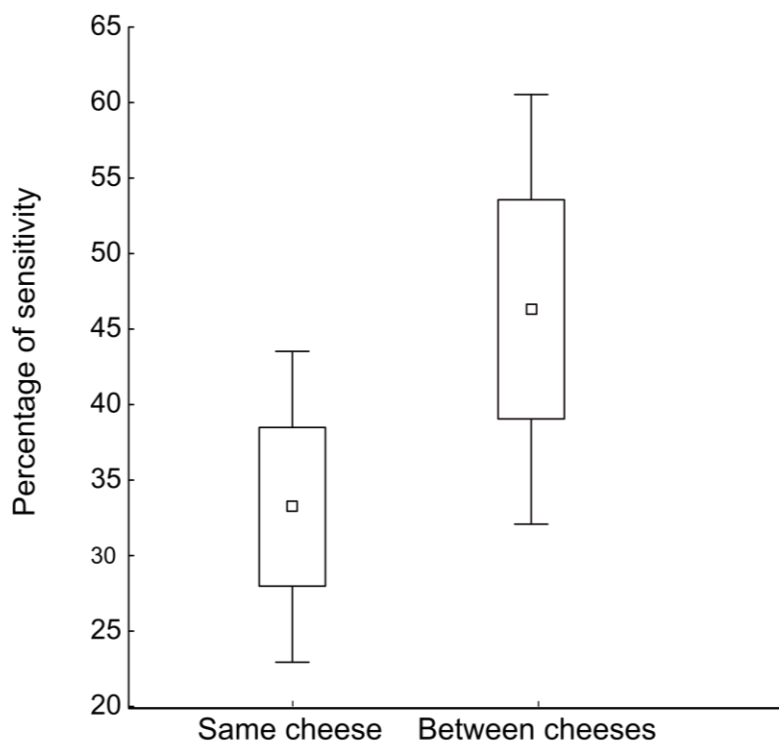


Figure VI.5. Boxplot showing the difference in sensitivity found between enterococci present in the same cheese sample and those in different cheeses samples. Dots represent average, while box showed standard error of the mean and whiskers represent \pm confidence interval.

On the contrary, in the community as a whole, the presence of enterocin producer populations showed an effect on community diversity, showing a higher diversity those communities with enterocin producers. We tested three diversity indexes: Shannon, ASV richness, and Faith's phylogenetic diversity. In all cases we obtained low p-values comparing communities with or without enterocin producers (Table VI.6; Figure VI.6). Nevertheless Shannon diversity index showed a significant p-value (i.e. $p < 0.05$).

Table VI.6. General Linear Models exploring the effects of the presence/absence of *Enterococcus*-bacteriocin producers in different alpha diversity indexes of the bacterial community of cheeses. D.f. refers to degree of freedom. The first number is the degree of freedom of the independent variable and the second one for the error term. Significant p-values ($p < 0.05$) are shown in bold.

	d.f.	F	<i>p</i>
Shannon's diversity index	1,11	6,12	0,031
Faith's phylogenetic diversity index	1,11	1,90	0,196
AVS richness	1,11	3,74	0,079

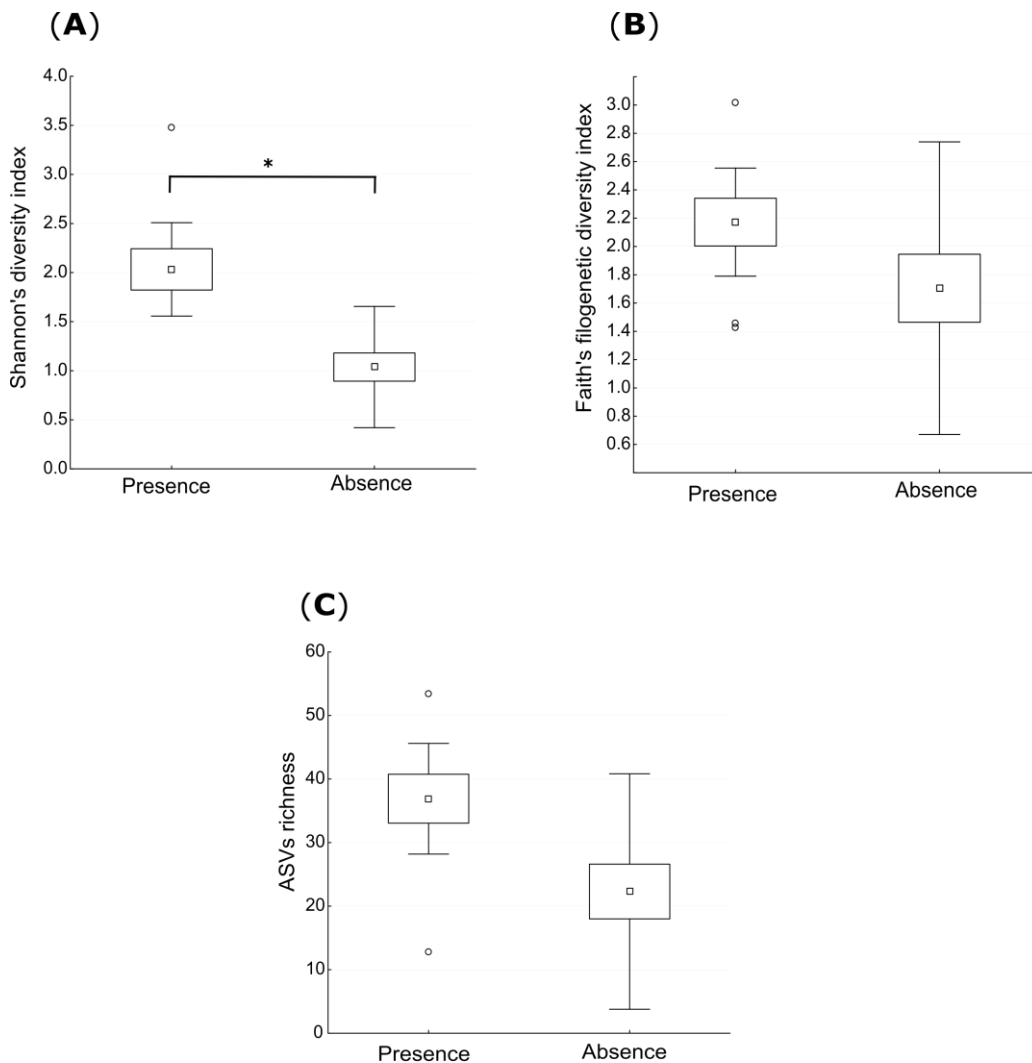


Figure VI.6. Boxplot showing differences in Shannon's (A) and Faith's phylogenetic diversity indexes (B), and Amplicon Sequence Variant richness (C) between raw milk cheeses with and without presence of *Enterococcus*-bacteriocin producers. Dots represent average, while box showed standard error of the mean and whiskers represent \pm confidence interval. * indicates where significant differences have been found.

Due to this increment in diversity with enterocin producers, we explore this relationship testing the correlation between these two variables in those samples with enterocin producers. All indexes show a negative relationship between diversity and enterocin producers within these samples (Table VI.7, Table VI.8) but again, only the Shannon diversity index of the community showed a significant correlation when *E. faecalis* was used as indicator strain (Figure VI.7). Thus, the increment of community diversity was maximized at low levels of enterocin producers.

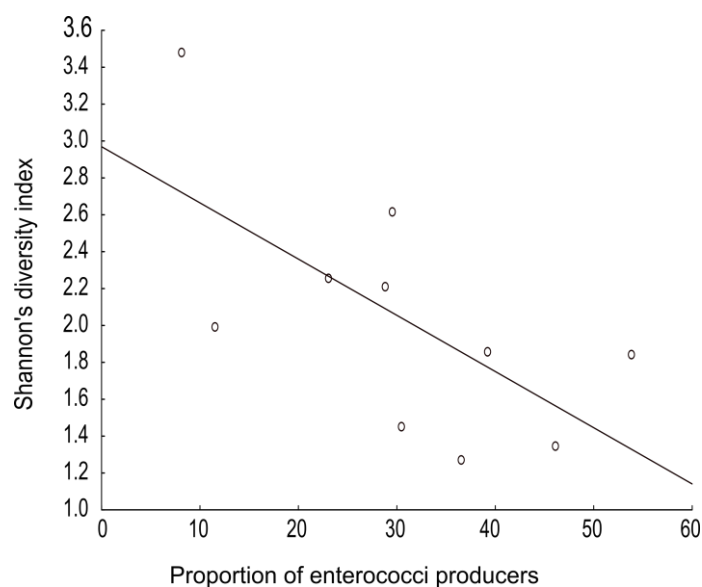


Figure VI.7. Correlations between proportion of *Enterococcus*-bacteriocin producers against *E. faecalis* S47 (from the whole *Enterococcus* population) and Shannon’s diversity index of the bacterial community of cheeses.

Table VI.7. Pearson’s correlations exploring the effects of proportion of *Enterococcus*-bacteriocin producers against two indicator strains and different alpha diversity indexes of the bacterial community of cheeses. Significant p-values ($p < 0.05$) are shown in bold.

Indicator strain		Shannon	Faith	ASV richness
<i>L. innocua</i>	r	-0,46	-0,56	-0,49
	p	0,209	0,115	0,179
<i>E. faecalis</i> S47	r	-0,65	-0,58	-0,40
	p	0,041	0,079	0,256

Table VI.8. Correlations exploring the association between of proportion of *Enterococcus*-bacteriocin producers different alpha diversity indexes of the bacterial *Enterococcus* population of cheese.

Sensitive strain		Faith	St-richness
<i>L. innocua</i>	r	-0.64	0
	p	0.061	0
<i>E. faecalis</i> S47	r	-0.28	-0,56
	p	0.43	0,094

4. Discussion

In the present study we have found a general trend of higher diversity in LAB communities associated to enterocin producers. However, the highest diversity is found at low-moderate levels of enterocin producers among enterococci. Therefore, our results show that low proportion of enterocin producers among enterococcal populations increases LAB diversity in cheese microbial communities.

LAB are recognized for playing an essential role in traditional cheese making, thanks to the fact that they contribute to the development of sensory characteristics and improve the nutritional value of the product (Coelho et al., 2022). Microbial counts of LABs presented in the analyzed cheeses ranged from 2.8×10^5 to 2.6×10^8 (Figure VI.1, Supplementary Table SVI.1), values that are within the regular range described by other authors (Carraro et al., 2011). Through massive DNA sequencing, the main LAB genera that have been identified in cheeses made with raw milk are *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Leuconostoc* (Biolcati et al., 2020, 2022; Camargo et al., 2021; Nero et al., 2021), which agrees with ours samples (Table VI.2, Figure VI.2).

Among LAB, enterococci represent an important genera of the LAB group, with approximately more than 50 species and subspecies (Graham et al., 2020). Several studies on the microbiota of traditional cheeses from the Mediterranean produced mainly from raw milk indicate that enterococci are a relevant component of the LAB being approximately up to one-third of all isolated LABs (Golić et al., 2013; Terzic-Vidojevic et al., 2014; Terzić-Vidojević et al., 2014; Veljovic et al., 2007). Furthermore, proportion of *Enterococcus* could change during cheese manufacture frequently being approximately between 10^4 and 10^6 CFU/g at the beginning of ripening and between 10^5 and 10^7 CFU/g at the end of cheese ripening (Franz et al., 1999). In our case, enterococcal counts ranged from 6.6×10^2 to 1.1×10^6 CFU/g a (Figure VI.1, Supplementary Table SVI.1). In

addition, most enterococci isolates were identified as *E. faecalis* and *E. faecium*, followed by *E. durans* and *E. hirae* (Figure VI.3). These is also the case in several studies who found that *E. faecium*, *E. faecalis*, and to a lesser extent *E. durans* were the most abundant in traditional cheeses (Gelsomino et al., 2002; Nieto-Arribas et al., 2011; Sarantinopoulos et al., 2001; Serio et al., 2007; Suzzi et al., 2000). The proteolytic and lipolytic activities, as well as the production of metabolites exhibited by these species endow them with significant biological properties, rendering them highly intriguing for their contribution to the organoleptic and quality features of ripened cheeses (Giraffa, 2003). Enterococcal strains commonly possess the ability to produce enterocins, which have the potential to inhibit various bacteria apart from enterococci, including the pathogens *Listeria* and *Clostridium* (Giraffa, 2003). Our results show that in most of the cheeses analysed we found enterococci that produce antimicrobials compounds (Figure VI.4, Table VI.3). Specifically, 21.2% of them had antimicrobial activity against both sensitive strains. This result is within the values obtained in other studies (González et al., 2007; Kouhi et al., 2022; Martín-Platero et al., 2009; Morandi et al., 2015). In addition, a 24.6% present activity against *L.innocua*. In the cheese industry the antilisteria activity of this type of bacteriocins is of great interest in its ability to inhibit *Listeria* while allowing LAB to carry out their role in cheese ripening (De Vuyst et al., 2003).

The highly variable and complex microbiota present in cheese makes it an environment where competitive interactions are inevitable as members share the same niche and compete for the same resources, spatially or otherwise (Siewerts et al., 2008). These interactions may ultimately affect the relative numbers of community members. In cheese in particular, bacteriophage predation has been shown to ensure bacterial diversity by eliminating large numbers of strains (according to the 'kill the winner' theory), thereby stabilizing the overall function of the community (Rodriguez-Valera et al., 2009). This theory, analogous to classical Lotka-Volterra dynamics to explain predator-prey population dynamics, proposes that in phage–bacteria interactions, increasing the population of a host organism (the winner) often results in an increase in the number of its corresponding predators (phage), increasing the winner's kill rate (Thingstad, 2000). Phages can have a dramatic impact on fermentations where LAB populations need to reach high cell counts in a short period of time (Mahony et al., 2016). In our case, the presence of *Enterococcus*-enterocins producers significantly affected Shannon's diversity index of community (Figure VI.6; Table VI.6). This implies that in communities where

there is at least one producer, the species abundance is more equitably distributed in cheese than in communities where there are no producers. The impact of bacteriocinogenic strains depends on their ability to grow and produce optimal levels of bacteriocins, not only under the technological conditions of the food, but also in the natural environment where they must compete with the microbial diversity present in the food without altering its physicochemical and organoleptic characteristics (Londoño et al., 2015). In fact, a positive effect of bacteriocin production in NSLAB is that it can act against other LAB strains such as the starter cultures, promoting their lysis and enzyme release, contributing to cheese ripening and enhancing the flavor of mature cheese (Nugroho et al., 2021).

Various simulations studies have revealed that antagonism strongly promote diversity and stability of a microbial community by promoting spatial structuring (Czárán et al., 2002; Kerr et al., 2002a; Wang et al., 2022). In fact, communities where cooperative interactions predominate are easier to destabilize, in contrast to antagonistic interactions that lead to more robust populations (Coyte et al., 2015). This is because cooperation enhances dependency between species, which means that if, for example, one species decreases in abundance, it will tend to drag others down with it and destabilize the system.

According to theoretical research, antagonistic systems can promote diversity in environments subjected to certain conditions. Experimental evidence has demonstrated this for *Escherichia coli's* colicin (Kerr et al., 2002b; Kirkup & Riley, 2004). However, in natural environments conditions cannot always be controlled. In gut mice microbiota Umu et al., (2016) analyse the effect of Class II bacteriocins in microbial communities. They showed that the diet supplemented with bacteriocin-producing bacteria did not affect the overall structure of the community. Nevertheless, some significant alterations were observed when examining the lower taxonomic levels, especially in treatments involving bacteriocins that have relatively wide inhibitory spectra (such as enterocins Q and L50 and garvicin ML). Additionally, the presence of bacteria producing bacteriocins increased the proportion of LAB. This could allow to manipulate specific populations thanks to bacteriocin producers at different levels and in different directions without affecting the normal inhabitants of the intestine. Qiao et al., (2022) also studied the effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* strains in intestinal microbiota of normal mice. They observed that the total number of species increased, but diversity and

uniformity of the gut community decreased slightly. Similarly ABP-118, a broad-spectrum class IIb bacteriocin produced by gut isolates of *Lactobacillus salivarius* only produce minor alterations in overall community composition (Riboulet-Bisson et al., 2012). On the contrary, our study has focused on community enterocin-producing populations rather than on a specific bacteriocin, that is, we have taken into account bacteriocin production as an ecological factor in microbial interactions, independently of the specific bacteriocin produced.

In addition, here we observed that bacteriocin production do not seem to affect the enterococci population, so the effect is at the community level (i.e. between species) and not in populations (i.e. within the same species). This could be due to the spectrum of action of bacteriocins. Bacteriocins spectrum is highly variable, from narrow to broad inhibitory activity and against closely related and unrelated species (Cotter et al., 2013). Broad-spectrum bacteriocins are more likely to be produced when the producer strain is highly abundant, allowing it to consolidate its ecological dominance by suppressing community members in general (Palmer & Foster, 2022). While narrow-spectrum bacteriocins is more focused on inhibiting the growth of competing strains that are the greatest threat (Palmer & Foster, 2022). This is due to closely related species are more likely that exploit similar niches within an environment, and hence, their competition for the space and resources is high (Weiss et al., 2022). In our case, the bacteriocins may be presenting a more specific action spectrum towards some other genus than enterococci. Another possibility is that the producing strains are closely related (Figure VI.3) and could share the immunity mechanisms for the antimicrobials that are being produced; presenting greater resistance against them and not observing any effect on the diversity of enterococci populations (Cintas et al., 2001; Dimov et al., 2005). Such ecological units of production and resistance have been described in other wild habitats (Cordero et al., 2012). However, despite we have not found significant differences between the sensitivity of enterococci from the same cheese with respect to enterococci from different cheeses, the low p value (0.068) at the edge of significance points to a high degree of resistance between coexisting populations (Figure VI.5).

On the other hand, a strong stressor (such as an antimicrobial substance) is expected to reduce the diversity of organisms in an area (Abeles et al., 2016). However, moderate concentrations of antimicrobials can actually increase the biodiversity of an

area by promoting the emergence of new taxa as long as the dominant species present in the microbiome are susceptible (Martínez, 2017).

In the present study, we have shown how the presence of bacteriocin producers in the microbiota increased the bacterial diversity of the cheese. However, within the cheeses with at least one producer, diversity is negatively correlated with the percentage of production, that is, the higher antimicrobial production, the lower diversity of the community (Figure VI.7). In other words, having producers in the community increase diversity, although too many producers affected negatively the diversity. This effect may be due to the fact that the production of bacteriocins at medium levels prevents one species from surpassing others promoting diversity (Paine, 1966). Furthermore, these results are compatible with the Intermediate Disturbance Hypothesis (IDH) in ecology. The IDH establishes that diversity is highest at intermediate levels of disturbance since these are infrequent enough for many species to survive fluctuations, but frequent enough for selection pressures and species with greater fitness to change with disturbances (Lee et al., 2018) although it is a highly controversial hypothesis (Becker et al., 2012; Fox, 2013; Galand et al., 2016; Lee et al., 2018).

Overall, our results suggest that, beyond their role in the local structuring of resistant and sensitive producer strains, bacteriocins could have an important effect modulating microbial communities of an environment. To what extent these results can be extended to other LAB species or even other wild microbial ecosystems will need further research. In any case, highlights the importance of bacteriocin production in controlling LAB communities during cheese ripening. Therefore, further studies on the effect of bacteriocin production on diversity would be of interest. Furthermore cheese has proven to be an ideal environment where interacting multispecies microbial communities of reduced complexity can be developed (Siewewerts et al., 2008) being able to compare with other less manageable systems where many species of bacteria coexist. The microbial communities present in cheese are easily cultivable and manipulable, facilitating the study and understanding of the patterns and underlying mechanisms of the assembly, function, and interactions of microbial communities (Wolfe & Dutton, 2015).

5. References

- Abeles, S. R., Jones, M. B., Santiago-Rodriguez, T. M., Ly, M., Klitgord, N., Yooseph, S., Nelson, K. E., & Pride, D. T. (2016). Microbial diversity in individuals and their household contacts following typical antibiotic courses. *Microbiome*, 4(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0187-9>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S., & Jousset, A. (2012). Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, 15(5), 468-474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x>
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4), 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665-684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2020). Short communication: High-throughput sequencing approach to investigate Italian artisanal cheese production. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10015-10021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18208>
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2022). The Bacterial and Fungal Microbiota of “Robiola di Roccaverano” Protected Designation of Origin Raw Milk Cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.776862>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camargo, A. C., Costa, E. A., Fusieger, A., Freitas, R. de, Nero, L. A., & Carvalho, A. F. de. (2021). Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. *Food Research International*, 139, 109803. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109803>
- Camargo Peralta, I., Gómez Bertel, S., & Salazar Montoya, V. (2009). Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. *Teoría y praxis investigativa*, 4(2), 27-31.
- Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., & Cardazzo, B. (2011). Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in Microbiology*, 162(3), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.002>
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, 11(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- Cordero, O. X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T., & Polz, M. F. (2012). Ecological populations of bacteria act as socially

- cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* (New York, N.Y.), 337(6099), 1228-1231. <https://doi.org/10.1126/science.1219385>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology*, 11(2), 95-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* (New York, N.Y.), 350(6261), 663-666. <https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Czárán, T. L., Hoekstra, R. F., & Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 786-790. <https://doi.org/10.1073/pnas.012399899>
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M. R., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in *enterococci* of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00425-7)
- Dimov, S., Ivanova, P., & Harizanova, N. (2005). Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 193. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817270>
- Faith, D. P., & Baker, A. M. (2006). Phylogenetic Diversity (PD) and Biodiversity Conservation: Some Bioinformatics Challenges. *Evolutionary Bioinformatics*, 2, 121-128. <https://doi.org/10.1177/117693430600200007>
- Fox, J. W. (2013). The intermediate disturbance hypothesis should be abandoned. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(2), 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.08.014>
- Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1), 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00007-0)
- Galand, P. E., Lucas, S., Fagervold, S. K., Peru, E., Pruski, A. M., Vétion, G., Dupuy, C., & Guizien, K. (2016). Disturbance Increases Microbial Community Diversity and Production in Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01950>
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of *Enterococci* in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560-3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3560-3565.2002>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2), 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., & De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
- Golić, N., Cadež, N., Terzić-Vidojević, A., Suranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Sušković, J., Raspor, P., & Topisirović, L. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032>
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18(6), 716-722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.03.008>
- Graham, K., Stack, H., & Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of *enterococci* for use in functional food applications – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3836-3861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1709800>
- Gratia, J., & Fredericq, P. (1946). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol*, 93, 1040-1042.
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J. D. A., & Willems, R. J. L. (2002). Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus*

- faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1963-1971.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142-148.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kelleher, P., Murphy, J., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2015). Next-generation sequencing as an approach to dairy starter selection. *Dairy Science & Technology*, 95(5), 545-568.
<https://doi.org/10.1007/s13594-015-0227-4>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002a). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418, 171-174.
<https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002b). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418(6894), Article 6894. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kirkup, B. C., & Riley, M. A. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature*, 428(6981), Article 6981.
<https://doi.org/10.1038/nature02429>
- Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J., & Javadi, A. (2022). Potential probiotic and safety characterisation of *enterococcus* bacteria isolated from indigenous fermented motal cheese. *International Dairy Journal*, 126, 105247.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105247>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee, L., Savage, V. M., & Yeh, P. J. (2018). Intermediate Levels of Antibiotics May Increase Diversity of Colony Size Phenotype in Bacteria. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.08.004>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Linhart, C., & Shamir, R. (2007). Degenerate primer design: Theoretical analysis and the HYDEN program. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 402, 221-244.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_11
- Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186.
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E., & van Sinderen, D. (2016). Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 267-285. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033322>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martínez, J. L. (2017). Effect of antibiotics on bacterial populations: A multi-hierarchical selection process. *F1000Research*, 6, 51. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9685.1>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein «salting-out» procedure. *Analytical Biochemistry*, 366(1), 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of *enterococci* isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 24-32.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010>

- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021). Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- Morandi, S., Silveti, T., Miranda Lopez, J. m., & Brasca, M. (2015). Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *Journal of Food Safety*, *35*(2), 193-205. <https://doi.org/10.1111/jfs.12171>
- Nascimento, M., Sousa, A., Ramirez, M., Francisco, A. P., Carriço, J. A., & Vaz, C. (2017). PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, *33*(1), 128-129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw582>
- Nero, L. A., Andretta, M., Almeida, T. T., Ferreira, L. R., Camargo, A. C., Yamatogi, R. S., Carvalho, A. F., & Call, D. R. (2021). Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil. *LWT*, *148*, 111698. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111698>
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., & Palop, L. (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, *28*(5), 891-899. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.005>
- Nugroho, A. D. W., Kleerebezem, M., & Bachmann, H. (2021). Growth, dormancy and lysis: The complex relation of starter culture physiology and cheese flavour formation. *Current Opinion in Food Science*, *39*, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.005>
- Paine, R. T. (1966). Food Web Complexity and Species Diversity. *The American Naturalist*, *100*(910), 65-75.
- Palmer, J. D., & Foster, K. R. (2022). The evolution of spectrum in antibiotics and bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(38), e2205407119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2205407119>
- Parente, E., Cogan, T. M., & Powell, I. B. (2017). Chapter 8 - Starter Cultures: General Aspects. En P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition) (pp. 201-226). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, *12*(null), 2825-2830.
- Peláez, C., & Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, *15*(6), 831-844. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.001>
- Preheim, S. P., Perrotta, A. R., Martin-Platero, A. M., Gupta, A., & Alm, E. J. (2013). Distribution-Based Clustering: Using Ecology To Refine the Operational Taxonomic Unit. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(21), 6593-6603. <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-13>
- Qiao, Y., Qiu, Z., Tian, F., Yu, L., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2022). Effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* strains on the immune system and intestinal flora of normal mice. *Food Science and Human Wellness*, *11*(2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.11.008>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M. H. J., Jeffery, I. B., O'Donnell, M. M., Neville, B. A., Forde, B. M., Claesson, M. J., Harris, H., Gardiner, G. E., Casey, P. G., Lawlor, P. G., O'Toole, P. W., & Ross, R. P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* Bacteriocin Abp118 on the Mouse and Pig Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*, *7*(2), e31113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031113>

- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Robert C., E. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Rodriguez-Valera, F., Martin-Cuadrado, A.-B., Rodriguez-Brito, B., Pašić, L., Thingstad, T. F., Rohwer, F., & Mira, A. (2009). Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2235>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of *enterococci* relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11(8), 621-647. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00087-5)
- Serio, A., Paparella, A., Chaves-López, C., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2007). *Enterococcus* populations in Pecorino Abruzzese cheese: Biodiversity and safety aspects. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1561-1568. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.7.1561>
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: From Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997-5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (Data Analysis Software System) (Versión 10). <http://www.statsoft.com>
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C., & Lanorte, M. T. (2000). A survey of the *enterococci* isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 267-274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01120.x>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Terzić-Vidojević, A., Mihajlović, S., Uzelac, G., Golić, N., Fira, D., Kojić, M., & Topisirović, L. (2014). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golija [Serbia] cows milk cheeses. *Archives of Biological Sciences*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Identification+and+characterization+of+lactic+acid+bacteria+isolated+from+artisanal+white+brined+Golija+%5BSerbia%5D+cows+milk+cheeses&author=Terzi%C4%87-Vidojevi%C4%87%2C+Amarela+%28Institute+of+Molecular+Genetics+and+Genetic+Engineering%2C+Belgrade+%28Serbia%29%29&publication_year=2014
- Terzić-Vidojević, A., Mihajlović, S., Uzelac, G., Veljović, K., Tolinački, M., Nikolić, M., Topisirović, L., & Kojić, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiology*, 39, 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.011>
- Thingstad, T. F. (2000). Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1320-1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A.-E., Rodríguez-Hernández, A.-I., del Rocío López-Cuellar, Ma., & Chavarría-Hernández, N. (2022). Bacteriocins Produced by LAB Isolated from Cheeses within the Period 2009–2021: A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(2), 238-251. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09825-0>
- Umu, Ö. C. O., Bäuerl, C., Oostindjer, M., Pope, P. B., Hernández, P. E., Pérez-Martínez, G., & Diep, D. B. (2016). The Potential of Class II Bacteriocins to Modify Gut Microbiota to Improve Host Health. *PLoS ONE*, 11(10), e0164036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164036>
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M., & Topisirovic, L. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2142-2152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03450.x>
- Wang, Y., Ma, L., Liu, Z., Chen, J., Song, H., Wang, J., Cui, H., Yang, Z., Xiao, S., Liu, K., An, L., & Chen, S. (2022). Microbial interactions play an important role in regulating the effects of plant species on soil bacterial diversity. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.984200>
- Weiss, A. S., Burrichter, A. G., Durai Raj, A. C., von Stempel, A., Meng, C., Kleigrewe, K., Münch, P. C., Rössler, L., Huber, C., Eisenreich, W., Jochum, L. M., Göing, S., Jung, K., Lincetto, C., Hübner, J., Marinos, G., Zimmermann, J., Kaleta, C., Sanchez, A., & Stecher, B. (2022). In vitro interaction network of a synthetic gut bacterial community. *The ISME Journal*, 16(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01153-z>
- Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*, 161(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

6. Supplementary material

Supplementary Table SVI.1. Main raw milk cheese features and microbiological counts.

ID	Cheese	Milk type	Lactic Acid Bacteria log(cfu/g)	<i>Enterococci</i> log(cfu/g)
AM1901QU01	Idiazabal	Sheep	7.98	4.87
AM1901QU02	Pago de los Vivales	Sheep	8.41	2.82
AM1902QU03	Pata de Mulo	Sheep	6.16	4.21
AM1902QU04	Ardi Gazta Ekia	Sheep	6.86	4.74
AM1902QU05	Comté, queso graso	Cow	5.94	ND*
AM1902QU07	Quesería Cortijo Júrtiga	Goat	8.05	6.05
AM1902QU08	Quesería 3 RRR	Goat	7.42	4.32
AM1902QU09	Granja Maravillas	Cow	7.37	3.96
AM1902QU10	Granja Maravillas	Cow	7.51	4.77
AM1902QU11	Emmental	Cow	7.42	2.92
AM1902QU12	Le Moulis	Cow	7.11	3.80
AM1903QU14	Las R.R.R.	Goat	6.35	3.23
AM1903QU15	Cueva de la Magaha	Goat	5.44	2.99
AM1903QU16	Mariscal	Sheep	5.85	4.34
AM1903QU17	Las Abadías	Goat	8.23	ND*

* Not Detected

CAPÍTULO VII. Discusión general y Conclusiones

1. Discusión

La mayoría de los seres vivos del planeta son microorganismos, con una tasa de recambio y una diversidad genética y metabólica muy superior a la de los macroorganismos (Whitman et al., 1998). Estos son ubicuos y constituyen un factor clave: (i) para la salud ambiental, con una contribución esencial para la vida y los ciclos biogeoquímicos (Falkowski et al., 2008); (ii) para la salud humana, puesto que distintos aspectos del desarrollo inmunológico adaptativo están influenciados por la colonización bacteriana del intestino (Round & Mazmanian, 2009); (iii) para la producción de alimentos, así, las bacterias lácticas debido a sus características metabólicas únicas están involucradas en muchos procesos de fermentación de leche, carnes, cereales y vegetales (Caplice & Fitzgerald, 1999); o (iv) diversos procesos industriales, como es el caso de microorganismos que actúan como agentes nucleantes en la formación de hielo, con repercusión importante a nivel industrial y ambiental (Pandey et al., 2016). Sin embargo, con frecuencia el efecto positivo de los mismos depende de la acción de toda la comunidad microbiana, cuya estructura, diversidad y función están determinados en última instancia por las interacciones que se producen entre los miembros de la comunidad (Kodera et al., 2022).

De todas las posibles interacciones son clave aquellas que afectan al ciclo de vida del individuo. Entre estas encontramos el antagonismo por interferencia y más en concreto la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos ribosomalmente que, aunque generalmente son activos contra cepas estrechamente relacionadas, una amplia gama de las mismas posee actividad contra bacterias más lejanamente relacionadas (Kommineni et al., 2015). Por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante como impulsores de la colonización de nichos por parte de poblaciones específicas y en el establecimiento de la estructura comunitaria final. La producción de bacteriocinas está ampliamente distribuida entre las especies bacterianas, sin embargo, esto contrasta con la alta diversidad de las comunidades de microorganismos donde se desarrollan, y parece contradecir el efecto letal de las bacteriocinas. Así pues, en la presente tesis hemos analizado el papel de las bacteriocinas a distintos niveles, comenzando con un estudio a nivel molecular, pasando por la genómica, hasta estudiar el efecto de la producción y resistencia de las mismas a escala de toda la comunidad de BAL.

De forma general, para que una bacteriocina se produzca es necesario que se expresen un grupo de genes, entre los cuales destacan aquellos implicados en la inmunidad hacia la propia bacteriocina (Dimov et al., 2005); aunque hay poco conocimiento sobre los mecanismos involucrados en dicha inmunidad (de Freire Bastos et al., 2015), y menos aún sobre la posible resistencia cruzada entre bacteriocinas. Algunos mecanismos que podrían estar implicados en la inmunidad hacia la propia bacteriocina incluyen la actividad de una proteína de inmunidad exclusivamente, o la acción conjunta de una proteína de inmunidad y un transportador ABC (Cotter et al., 2005). A pesar de que las proteínas de inmunidad no presentan homologías entre sí, los mecanismos a través de los cuales funcionan son similares, ya sea a través del secuestro de la proteína estructural o mediante competencia antagónica por un receptor. Dichos mecanismos de inmunidad son muy específicos para cada bacteriocina y, por lo general, no suelen ofrecer protección contra otras bacteriocinas.

Por otro lado, existe evidencia de resistencia cruzada entre bacteriocinas producidas por cepas estrechamente relacionadas, perteneciendo generalmente a la misma clase. Tymoszevska et al., (2021) observaron resistencia cruzada por parte de *Lactococcus lactis* entre dos bacteriocinas, las enterocinas L50 y la Aureocina A53, ambas bacteriocinas sin péptido líder. Dicha resistencia estaba basada en una mutación de su transportador ABC. Oppengard et al. (2010) estudiaron las bacteriocinas lactococcin G y enterocina 1071, homólogas y pertenecientes a la misma clase. La resistencia cruzada a estas dos bacteriocinas se debía a la presencia del gen de inmunidad a la enterocina 1071. Sin embargo, dicha proteína de inmunidad no proporcionó resistencia a la bacteriocina plantaricina EF (no homóloga ni a lactococina G ni a la enterocina 1071). En la actualidad no existen apenas datos acerca de la resistencia cruzada entre bacteriocinas pertenecientes a diferentes clases en poblaciones naturales.

En los resultados del Capítulo III, pusimos de manifiesto la resistencia cruzada entre dos bacteriocinas las enterocinas MR10A/B (sin péptido líder; variantes de las enterocinas L50A/B) y la enterocina AS-48 (circular). Ambas bacteriocinas son producidas por cepas de *Enterococcus faecalis* pero pertenecen a clases diferentes, en concreto la bacteriocina AS-48 pertenece a la clase I de la clasificación realizada por Álvarez-Sieiro et al., (2016) y MR10A/B pertenecen a la clase II según esta misma clasificación. Además, determinamos que la resistencia se debía a la presencia de un

transportador ABC, al que denominamos Transportador-2 por su posición en el cluster génico de AS-48, presente en ambos clusters de genes.

Los transportadores ABC están implicados en multitud de funciones biológicas como la importación de nutrientes a través de la membrana celular, la transducción del ARNm, la reparación del ADN o la secreción o expulsión de diversas moléculas, incluidas toxinas (Davidson et al., 2008). Esta última función explica la frecuente presencia de transportadores ABC como genes de inmunidad en varias bacteriocinas. Entre los transportadores ABC mejor estudiados implicados en la inmunidad hacia bacteriocinas se encuentran los transportadores de lantibióticos. Estos están compuestos por tres proteínas, LanFEG, que junto con una proteína de inmunidad (LanI) reducen la concentración de los lantibióticos que llegan a la membrana y los expulsan antes de que formen poros (Clemens et al., 2018).

En nuestro caso el Transportador-2 está compuesto por 4 proteínas denominadas As-48EFGH o Mr10EFGH dependiendo del cluster de genes del que forme parte. Estas proteínas que conforman el transportador de ambos cluster presentan elevadas similitudes (>95%), a excepción de AS-48E y Mr10E, cuya homología no alcanza el 50%. El presente transportador, junto con la proteína de inmunidad específica, además de proporcionar inmunidad de cada cepa a su propia bacteriocina, en el caso del transportador presente en el cluster de la enterocina AS-48 proporciona resistencia cruzada hacia las enterocinas MR10A/B. Aunque aún es desconocido el mecanismo por el que se produce dicha resistencia, una posible explicación es que AS-48 y MR10A/B compartan ciertas características estructurales como una estructura tridimensional con un pliegue similar a la saposina, así como un núcleo hidrofóbico formado por las hélices (típicamente 4 o 5), con una superficie exterior que es predominantemente hidrofóbica con residuos de triptófano o tirosina expuestos al solvente cerca de los extremos N o C terminal (Towle & Vederas, 2017). Estas características se han encontrado en otras bacteriocinas circulares y sin péptido líder como la Circularina A, la Uberolisina, la Lacticina Q o la Aureocina A53; y podrían ser las responsables del reconocimiento por parte del Transportador-2 de ambos péptidos y su expulsión al medio extracelular, confiriendo resistencia.

Hoy en día nos enfrentamos a un problema mundial dado el surgimiento de patógenos resistentes a múltiples antibióticos. Es por tanto esencial buscar alternativas a los mismos, postulándose las bacteriocinas como una alternativa viable al uso de

antibióticos en clínica (Cotter et al., 2013). La mayoría de los estudios sobre bacteriocinas están sesgados hacia la descripción de las propiedades fisicoquímicas, estructura, actividad y modo de acción de las bacteriocinas, encontrando pocos estudios sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de resistencia a estos agentes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo III se hace más necesario aún estudiar los patrones potenciales de resistencia cruzada para poder llegar a predecir la resistencia cruzada entre bacteriocinas a la hora de su aplicación en tanto en clínica como en industria alimentaria.

Dado que encontramos el Transportador-2 asociado a dos cluster génicos responsables de bacteriocinas diferentes implicado en la resistencia cruzada, quisimos determinar la distribución de este transportador entre las bacterias. Atendiendo a los resultados obtenidos en el Capítulo IV, se encontró que las proteínas que conforman el Transportador-2 estaban muy extendidas entre diferentes bacteriocinas y especies. De hecho, se ha descrito en *Bacillus subtilis* un transportador, denominado YknWXYZ, muy similar estructuralmente al Transportador-2 (Yamada et al., 2012). Sin embargo, las proteínas que conforman dicho transportador presentan similitudes muy bajas con las proteínas del Transportador-2 de AS-48.

A pesar de la amplia distribución de las proteínas de este tipo de transportadores, solo pudimos encontrar el Transportador-2 completo entre las especies del género *Enterococcus*. En concreto identificamos 6 especies diferentes de enterococos con dicho transportador: *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. durans*, *Enterococcus sp.* y *E. phoeniculicola*. Además, de a AS-48 y bacteriocinas variantes de MR10 se encontró asociado a la bacteriocina Carnocyclina A y bacteriocinas pertenecientes a la familia de las Uberolisinas/carnociclinas. Estas bacteriocinas comparten las mismas características que AS-48 y MR10A/B (pliegue similar a la saposina, núcleo hidrofóbico y superficie exterior predominantemente hidrofóbica), por tanto, nuestra hipótesis es que, la presencia compartida del Transportador-2 puede llegar a ofrecer resistencia cruzada a dichas bacteriocinas, lo que podría generar grupos de resistencia cruzada de poblaciones de enterococos que podrían estar involucrados en la estabilidad de la población dentro de la comunidad microbiana. Esta posible agrupación de poblaciones de enterococos recuerda al modelo propuesto por Szabó et al. (2007) en el cual un número infinitamente grande de cepas podrían agruparse en "unidades" que contuvieran especies mutuamente inmunes y dichas unidades a su vez jugaran al tradicional juego de niños, piedra-papel-tijera, coexistiendo en el tiempo y manteniéndose la diversidad poblacional y comunitaria. Aun

así, sigue siendo necesaria una aproximación más experimental que permita dilucidar los mecanismos involucrados en el mantenimiento de las comunidades microbianas.

Adicionalmente, pusimos de manifiesto que el gen o genes de inmunidad de las bacteriocinas pueden transmitirse independientemente del péptido antimicrobiano asociado, puesto que encontramos el Transportador-2 sin asociación a ninguna bacteriocina. Este hecho podría aumentar el riesgo de resistencia a los antimicrobianos bajo una alta presión selectiva, aunque la frecuencia de Transportador-2 huérfano de bacteriocina es baja, por lo que serían necesarios más estudios para poder comprenderlo adecuadamente.

El género *Enterococcus*, empleado como modelo de productor de bacteriocinas en los distintos capítulos de la presente Tesis, son bacterias ubicuas que han sido aisladas tanto de suelos como aguas superficiales y marinas, en asociación con plantas, en productos alimenticios fermentados, como parte de la microbiota intestinal de vertebrados e invertebrados, y como agentes causantes de enfermedades humanas. Son, por lo tanto, especies capaces de sobrevivir en condiciones ambientales diversas y a menudo adversas (Lebreton et al., 2017), caracterizándose por poseer una elevada resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos (Hollenbeck & Rice, 2012). Unido a su capacidad para adquirir nuevos genes de resistencia a antimicrobianos a través de la transferencia horizontal, les permite sobrevivir y propagarse en entornos hospitalarios y convertirse en uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales (Aun et al., 2021; Raven et al., 2016). Los plásmidos son quizás los elementos genéticos móviles que priman entre los enterococos y son los principales causantes de la transmisión de genes de resistencia a antimicrobianos y de virulencia (Palmer et al., 2010). En el caso del Transportador-2 lo encontramos asociado tanto a plásmidos como a cromosoma, destacando en *E. faecium*, donde aparece ubicado en todos los casos a nivel plasmídico además de únicamente asociado a variantes de la bacteriocina MR10, pudiendo ser indicativo de que su adquisición ha sido posterior, encontrándose primero en otras especies de Enterococos. Además, se ha podido observar como dicho Transportador-2 se moviliza principalmente entre las mismas especies de enterococos, independientemente de su asociación a bacteriocinas.

Más allá de la variación en el transportador entre las poblaciones de enterococos, cada componente del transportador ABC puede mostrar una especificidad diferente. En el caso del Transportador-2, las proteínas similares a Mr10G y Mr10H se encontraron

ampliamente distribuidas entre distintas especies, mostrando así un mayor nivel de conservación. Por el contrario, Mr10E y Mr10F se limitaron a las especies del género *Enterococcus*. Por otro lado, se encontró que las proteínas Mr10F, Mr10G y Mr10H estaban bien conservadas dentro de cada especie de enterococo, lo que sugiere una interacción más específica con otras características celulares, mientras que la proteína, Mr10E se encontró más conservada dentro del mismo grupo de genes de enterocina, independientemente de la especie productora. Esto apunta a una interacción directa entre la bacteriocina y el componente Mr10E del transportador, produciendo finalmente la especificidad de la resistencia.

El modelo de piedra-papel-tijera, (donde la piedra gana a las tijeras, las tijeras ganan al papel y el papel gana a la piedra) se utiliza con frecuencia para explicar la dinámica de comunidades no transitivas, es decir aquellas sin jerarquías competitivas estrictas, entre las poblaciones productoras de bacteriocinas (P), resistentes (R) y susceptibles (S) (Riley & Wertz, 2002), pudiendo conseguirse una coexistencia entre estos tres tipos de cepas en una comunidad en medios con estructura espacial, mientras que esa diversidad se pierde cuando la dispersión y la interacción ocurren a escalas espaciales relativamente grandes (p.e. en medios líquidos); sin embargo, este modelo se estableció principalmente debido al incremento de mutantes resistentes generados a partir de las poblaciones S (Kerr et al., 2002). La presencia del Transportador-2 huérfano en bacteriocina y la existencia de gradientes en la especificidad entre los genes de resistencia e inmunidad, dan pie a la posibilidad de generarse poblaciones con distintos grados de resistencia complicándose aún más el escenario teórico para el desarrollo de modelos dinámicos poblacionales de cepas productoras, resistentes y sensibles.

Para profundizar en nuestro conocimiento de las características de las poblaciones bacteriocinogénicas, en el capítulo V describimos y comparamos los genomas de tres bacterias modelo: *E. faecalis* UGRA10, cepa de origen alimentario productora de AS-48; *E. faecalis* S-48, cepa de aislada del exudado de una herida humana productora de AS-48; y *E. faecalis* MRR10-3, cepa simbiote mutualista de aves (en concreto de la abubilla, *Upupa epops*) productora de MR10A/B. Estas dos últimas son las empleadas en los estudios de resistencia cruzada y distribución del transportador de inmunidad de los capítulos III y IV, permitiendo por tanto analizar la relación genómica entre estas bacterias que han mostrado resistencia cruzada.

La secuenciación y anotación de los genomas seleccionados mostraron tamaños variables, y número de genes acorde a los tamaños obtenidos. Los genomas de *E. faecalis* UGRA10, *E. faecalis* S-48 y *E. faecalis* MRR10-3 mostraron tamaños de 3,19 Mpb, 3,10 Mpb y 2,81 Mpb respectivamente. En los genomas de *E. faecalis* UGRA10 y *E. faecalis* S-48 ya se había descrito la presencia de diversos plásmidos de distinto tamaño (70kb y 5.2Kb para UGRA10; y 68kb, 5.2kb, 2.5kb y ~90kb para S-48) (Cebrián et al., 2012; Martínez-Bueno et al., 1990), mientras que no hay plásmidos descritos en *E. faecalis* MRR10-3 (Martín-Platero et al., 2006) Esto podría explicar, al menos parcialmente, el mayor tamaño de los genomas de *E. faecalis* UGRA10 y *E. faecalis* S-48, si bien, la suma de los tamaños de los plásmidos conocidos no llega a explicar por completo la diferencia, por lo que probablemente el cromosoma sea de mayor tamaño en estas estirpes. Futuros estudios encaminados a cerrar estos genomas podrán aclarar estas diferencias genómicas estructurales.

Por otro lado, los análisis funcionales de dichas cepas no mostraron grandes diferencias en los principales procesos celulares de los enterococos, encontrando funciones relacionadas principalmente con la unión de ADN y ATP, además de estar involucradas en la regulación de la transcripción de ADN o transporte de membrana, siendo la función principal de las proteínas encontradas en los tres genomas la hidrólisis de NTP. Además, dado que los enterococos constituyen uno de los patógenos nosocomiales más importantes (O'Driscoll & Crank, 2015; Werner et al., 2008), se presentó especial atención a la presencia de factores de virulencia conocidos para esta especie. Sin embargo, aunque las cepas analizadas presentaron ciertos rasgos patogénicos, estos están en un estado intermedio entre la cepa patógena de referencia *E. faecalis* V583 y una cepa probiótica de referencia *E. faecalis* Symbioflor1, no pudiendo asegurar su seguridad o patogenicidad. Actualmente las causas de patogenicidad de los enterococos no están resueltas, sin que haya un factor que explique inequívocamente la patogenicidad. Esta parece más bien estar relacionada con la combinación de ciertos factores de virulencia y, especialmente, el enriquecimiento en dichos factores (Kiruthiga et al., 2020; Vergis et al., 2002)). Por tanto, serán necesarios futuros estudios *in vivo* que aclaren la seguridad o patogenicidad de estas cepas.

A continuación, se infirió el pangenoma de todos los *E. faecalis* disponibles en el momento del estudio. Este estaba formado por 42113 genes, de los cuales 1025 conformaban el genoma central, es decir presentes en el 99-100% de los 2113 *E. faecalis*

analizados. Además, de todos estos, 55 genomas portaban alguna de las siguientes cuatro bacteriocinas: bacteriocina uberolisina/carnociclina (45 genomas), AS-48 (1 genoma, más los genomas de S-48 y UGRA10), carnociclina A (1 genoma) y MR10A/B (8 genomas, más el genoma de MRR10-3). Como ya se mostró en el capítulo IV, todos ellos se relacionan por la presencia del Transportador-2, que en el caso de AS-48 y MR10A/B mostró estar implicado en la resistencia cruzada entre las mismas. Aunque existe un mayor número de genes centrales en los genomas portadores de las enterocinas MR10, esto se debe a que existen menos genomas con dichas bacteriocinas y por tanto su core-genome es mayor que el que se encuentra en los genomas asociados a las bacteriocinas circulares (Zhong et al., 2017). Esto, unido a las diferencias filogenéticas y de posición plásmido/cromosoma, nos indican que la adquisición de este grupo de genes de bacteriocinas probablemente sea a través de transmisión horizontal de genes, y esté influido por el ambiente local donde se encuentran las cepas; proporcionando una ventaja ecológica sobre las cepas competidoras que no contienen tales genes (Heilbronner et al., 2021). Este papel antagonista es el principal que se les ha asignado a las bacteriocinas, permitiendo que una cepa invada un nicho dado o al evitar que su nicho sea invadido por otras (Kerr et al., 2002; Riley & Gordon, 1999).

En bacterias Gram positivas hay autores que también han otorgado a las bacteriocinas un papel como péptidos de señalización en la detección de quórum o como señales de comunicación en consorcios bacterianos (Gobbetti et al., 2007; Hibbing et al., 2010). De ser cierta esta segunda hipótesis, o en los casos que pudiese operar, los resultados del capítulo V muestran que sólo podrían actuar reconociéndose el gen de la bacteriocina a sí mismo (a modo de gen egoísta), independientemente del grado de parentesco entre las cepas, puesto que no guardan una estrecha relación entre sí.

Hasta ahora el papel ecológico de las bacteriocinas generalmente se ha estudiado desde un punto de vista local entre cepa productora y sensible, dejando de lado que los microorganismos productores, resistentes y sensibles suelen vivir en ambientes de diferente grado de complejidad. Los principales estudios de inmunidad que podrían explicar los patrones de resistencia generalmente se han centrado en la propia inmunidad del organismo productor, pero no indagan en los patrones de resistencia de otros individuos que puedan coexistir con los productores. Así pues, tras el estudio local de los mecanismos de producción y resistencia, estudiamos la función de las bacteriocinas desde un punto de vista global (población y comunidad) (capítulo VI). Para ello tomamos como

modelo de estudio las poblaciones de enterococos y comunidades microbianas presentes en quesos elaborados con leche cruda. El queso se caracteriza por poseer una composición fisicoquímica muy heterogénea convirtiéndose en un entorno ideal donde se desarrollan comunidades microbianas constituidas por múltiples especies interactuantes, en el que los diferentes sustratos y gradientes físico-químicos generan múltiples nichos que podrán ocupar cepas especializadas (Siewerts et al., 2008). En concreto, los quesos elaborados con leche cruda presentan una microbiota especialmente compleja caracterizada por la sucesión de diferentes microorganismos (Irlinger & Mounier, 2009).

Por tanto, con el objetivo de aclarar este vacío en el conocimiento sobre el papel ecológico de las bacteriocinas, en el capítulo VI de la presente tesis se utilizaron 15 quesos elaborados con leche cruda de tres animales lecheros diferentes (vaca, cabra y oveja). Para determinar el efecto de la producción de las bacteriocinas en las comunidades de dichos quesos se comenzó con una caracterización y cuantificación de las mismas mediante medios de cultivo generales y análisis del ADNr 16S de la comunidad. Los títulos microbianos de los quesos analizados mediante recuento en placa se situaron en torno a $10^5 - 10^8$ CFU/g para las BAL globales y en torno a 10^2-10^6 CFU/g para los enterococos. Dichos valores son similares a los obtenidos en por otros autores para este tipo de muestras (Carraro et al., 2011; Martín-Platero et al., 2009). Mediante secuenciación de la región V4 del ARNr 16S, los principales géneros de BAL que se identificaron se correspondían con *Lactococcus* y *Streptococcus*, seguidos de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Staphylococcus*, siendo los principales géneros que habitualmente se encuentran con mayor frecuencia en quesos elaborados con leche cruda (Biolcati et al., 2020; Camargo et al., 2021). A partir de los diferentes medios de cultivos utilizados para los recuentos, se aislaron 5 colonias de enterococos y se procedió a su identificación, encontrando que la mayoría de ellas se identificaban con las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*, seguidas de *E. duras* y *E. hirae* (Gelsomino et al., 2002; Serio et al., 2007).

Posteriormente se determinó la capacidad antagónica que presentaban los enterococos de estas comunidades. Se detectó mayor producción antimicrobiana utilizando *E. faecalis* S-47 como cepa indicadora que frente a *L. innocua* CECT4030. Las bacterias Gram positivas producen bacteriocinas que poseen un espectro de acción muy variable, actuando generalmente frente a cepas estrechamente relacionadas (Cotter et al., 2013), así, en el caso de las lactococcinas A, B y M, producidas por *Lactococcus*,

presentan actividad antimicrobiana únicamente frente a cepas del mismo género (Darbandi et al., 2021). Sin embargo, también se han identificado bacteriocinas de bacterias Gram positivas con amplio espectro de acción pudiendo llegar a actuar sobre bacterias Gram-negativas como *Campylobacter jejuni* o *E. coli* (Pérez-Ramos et al., 2021). Además, específicamente las cepas de enterococos comúnmente poseen la capacidad de producir enterocinas, con espectro de acción relativamente amplio, con potencial de inhibir varias bacterias además de los enterococos, incluidos los patógenos *Listeria* y *Clostridium* (Giraffa, 2003), alargando la vida útil de los alimentos.

Tras la caracterización y cuantificación de las comunidades de BAL y la detección de las capacidades enterocinogénicas de las poblaciones de enterococos, pusimos de manifiesto una tendencia general a una de mayor diversidad en las comunidades de BAL asociadas a los productores de enterocinas, encontrándose diferencias significativas al emplear el índice de diversidad de Shannon. En el caso de la riqueza de ASVs, aunque la media era mayor con productores de enterocinas, las diferencias no llegaron a ser significativas. El índice de Shannon aumenta conforme aumenta el número de especies y más uniformemente se distribuyen estas especies. Por tanto, esto supone que en quesos con comunidades donde hay al menos un productor, hay un apreciable incremento de especies cuya abundancia se distribuye más equitativamente que en quesos en los que sus comunidades carecen de productores, es decir, en los que no hay productores hay un mayor sesgo hacia unas pocas especies muy dominantes. A pesar de que multitud de trabajos teóricos apoyan que el antagonismo promueve la diversidad y estabilidad de las comunidades microbiana. Los trabajos experimentales llevados a cabo muestran que las cepas productoras de bacteriocinas apenas influyen en la diversidad comunitaria, encontrándose un efecto más específico hacia ciertos géneros de la comunidad (Qiao et al., 2022; Riboulet-Bisson et al., 2012). Así pues, este trabajo supone un avance en el conocimiento del papel de las bacteriocinas como moduladoras de comunidades microbianas ácido-lácticas.

Dada la tendencia general de mayor diversidad en las comunidades con poblaciones productoras, siendo significativo en el caso del índice de Shannon, quisimos determinar la correlación entre el porcentaje de producción y diversidad. En este caso se volvió a poner de manifiesto una correlación significativa entre el índice de Shannon y el porcentaje de producción, siendo esta correlación negativa. Esto implica que la mayor diversidad microbiana se encuentra en niveles bajos a moderados de productores de

enterocinas entre los enterococos. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la baja proporción de productores de enterocina entre las poblaciones de enterococos aumenta la diversidad de BAL en las comunidades microbianas del queso. Dicho efecto puede deberse a que concentraciones muy elevadas de antimicrobianos pueden reducir la diversidad de los microorganismos desplazando a parte de los individuos de la comunidad, sin embargo, concentraciones moderadas de antimicrobianos pueden aumentar la biodiversidad de un área al promover la aparición de nuevos taxones o al evitar que una especie excluya competitivamente a otras (Abeles et al., 2016; Martínez, 2017; Paine, 1966).

Sin embargo, al estudiar el efecto de la producción de bacteriocinas en las poblaciones de enterococos, no pudimos determinar ningún efecto. Esta diferencia con respecto al efecto en las comunidades, podría deberse al espectro de acción de las bacteriocinas. Como se ha comentado con anterioridad, las bacteriocinas presentan un espectro de acción muy variable. En nuestro caso, las bacteriocinas pueden estar presentando un espectro de acción más específico afectando a otros miembros de la comunidad. Otra posibilidad es que las cepas productoras estén estrechamente relacionadas y puedan compartir los mismos mecanismos de inmunidad para los antimicrobianos que se producen (Cintas et al., 2001; Dimov et al., 2005). Sin embargo, aunque no podemos certificar diferencias significativas en la sensibilidad de enterococos pertenecientes al mismo queso con respecto a la sensibilidad mostrada por enterococos provenientes de diferentes quesos, la *p* se situó en 0,06, mostrando una tendencia mayoritaria al desarrollo *in situ* de cepas resistentes a los antimicrobianos producidos por las poblaciones coexistentes. Estos resultados también podrían explicar por qué no observamos ningún efecto en la diversidad poblacional de enterococos y sí en el resto de la comunidad.

Así pues, en conjunto, estos resultados sugieren que, más allá de su papel en la estructuración local de cepas productoras sensibles y resistentes durante su competencia por un nicho específico, las bacteriocinas podrían tener un efecto importante en la modulación de las comunidades microbianas. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder extender estos resultados a otros grupos bacterianos o a otros ecosistemas más complejos.

El trabajo recogido en la presente tesis ha permitido avanzar en el conocimiento disponible sobre las bases biológicas de los patrones de producción y resistencia de

péptidos antimicrobianos, como son las bacteriocinas. No solo se ha puesto de manifiesto desde un punto de vista molecular la importancia de la resistencia cruzada entre bacteriocinas de clases completamente diferentes, sino que además se ha encontrado diseminación de los genes de resistencia a las mismas de forma independiente a la producción. Siendo necesarios más estudios para poder llegar a predecir la resistencia cruzada entre bacteriocinas sobre todo a la hora de su aplicación en clínica. Además, se ha demostrado como la producción de bacteriocinas puede influir en la diversidad microbiana de un entorno determinado siendo un importante factor a tener en cuenta para el control de las comunidades de microorganismos permitiendo una mejora de ciertos procesos industriales. Evidenciándose, de esta forma, la importancia de conocer los factores, y más concretamente los factores bióticos, que rigen las comunidades microbianas para poder llegar a comprender cómo las poblaciones y comunidades microbianas responden a los cambios en el entorno y cómo se pueden conservar y manejar de manera efectiva.

2. Conclusiones

En función de los precedentes bibliográficos y de los resultados obtenidos en la presente Memoria, se extraen las siguientes conclusiones:

1. Los transportadores ABC constituyen una superfamilia de proteínas que engloba una gran variedad de transportadores asociados a múltiples funciones. Atendiendo a la similitud de la secuencia primaria y funcionalidad, el transportador ABC encontrado en el cluster de genes responsable de la bacteriocina AS-48, denominado Transportador-2, es homólogo al transportador ABC del cluster de genes de la bacteriocina MR10A/B. Esta homología no se encuentra entre ningún otro gen de los respectivos clusters génicos.
2. Las cepas productoras de bacteriocinas requieren de mecanismos de inmunidad hacia su propia bacteriocina, siendo los transportadores ABC uno de los más utilizados. En el caso del Transportador-2 de la bacteriocina AS-48, confiere además resistencia cruzada a las enterocinas MR10A/B, bacteriocinas que pertenecen a clases distintas (clases I y II respectivamente).
3. Los transportadores ABC están ampliamente distribuidos, sin embargo, el Transportador-2 se restringe a algunas poblaciones de enterococos.
4. El Transportador-2, además de asociarse a las enterocinas AS-48 y MR10A/B, se encuentra asociado a otras bacteriocinas con dominios estructurales similares tales como la carnociclina A y bacteriocinas de la familia de las Uberolisinas/carnociclinas, y con poca frecuencia no se encuentra asociado a ninguna bacteriocina.
5. La secuencia de los componentes Mr10FGH varía en función de la especie portadora, sin embargo, la secuencia del componente Mr10E varía en función de la secuencia del gen estructural de la bacteriocina asociada, lo cual pone de manifiesto el papel clave de esta proteína en la funcionalidad del transportador frente a la bacteriocina.

6. Las diversas funciones codificadas por los genomas de *E. faecalis* están bastante conservadas, a pesar de ser aisladas de ambientes muy diferentes. Además, estos muestran un variado gradiente de factores de virulencia que no permiten asignar la patogenicidad de una cepa en base a su genotipo sin experimentos de patogenicidad *in vivo*.
7. La distribución de las bacteriocinas con dominios tipo saposina (como AS-48 o MR10A/B) en los genomas de *E. faecalis*, muestra la prevalencia de la transferencia horizontal frente a la adquisición vertical, independientemente de que el cluster génico se localice en un plásmido o en el cromosoma.
8. La presencia de poblaciones de enterococos productores de bacteriocinas ha mostrado tener un efecto positivo en la biodiversidad de las comunidades de bacterias del ácido láctico, incrementando con ello su diversidad.
9. Aunque la presencia de enterococos productores de enterocinas incrementa la diversidad respecto a las comunidades donde están ausentes, su efecto varía en función de la proporción de poblaciones productoras. Concretamente, bajas proporciones de poblaciones productoras de bacteriocinas incrementan la biodiversidad de las comunidades de bacterias acidolácticas; esta diversidad se reduce al aumentar la proporción de poblaciones de enterococos antagonistas.

3. Referencias

- Abeles, S. R., Jones, M. B., Santiago-Rodriguez, T. M., Ly, M., Klitgord, N., Yooseph, S., Nelson, K. E., & Pride, D. T. (2016). Microbial diversity in individuals and their household contacts following typical antibiotic courses. *Microbiome*, 4(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0187-9>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Aun, E., Kisand, V., Laht, M., Telling, K., Kalmus, P., Väli, Ü., Brauer, A., Remm, M., & Tenson, T. (2021). Molecular Characterization of *Enterococcus* Isolates From Different Sources in Estonia Reveals Potential Transmission of Resistance Genes Among Different Reservoirs. *Frontiers in Microbiology*, 12, 601490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.601490>
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2020). Short communication: High-throughput sequencing approach to investigate Italian artisanal cheese production. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10015-10021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18208>
- Camargo, A. C., Costa, E. A., Fusiéger, A., Freitas, R. de, Nero, L. A., & Carvalho, A. F. de. (2021). Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. *Food Research International*, 139, 109803. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109803>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1), 131-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)
- Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., & Cardazzo, B. (2011). Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in Microbiology*, 162(3), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.002>
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, 30(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>
- Clemens, R., Zaszke-Kriesche, J., Khosa, S., & Smits, S. H. J. (2018). Insight into Two ABC Transporter Families Involved in Lantibiotic Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4, 91. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00091>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology*, 11(2), 95-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2021). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317-364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>
- de Freire Bastos, M. do C., Coelho, M. L. V., & Santos, O. C. da S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 161(4), 683-700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>

- Dimov, S., Ivanova, P., & Harizanova, N. (2005). Genetics of Bacteriocins Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 193. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817270>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & DeLong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5879), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of *Enterococci* in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560-3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3560-3565.2002>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of *enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2), 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., & Limitone, A. (2007). Cell-cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.012>
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence*, 3(5), 421-569. <https://doi.org/10.4161/viru.21282>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418(6894), Article 6894. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., & Malaiyan, J. (2020). Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC Research Notes*, 13, 170. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05018-0>
- Kodera, S. M., Das, P., Gilbert, J. A., & Lutz, H. L. (2022). Conceptual strategies for characterizing interactions in microbial communities. *IScience*, 25(2), 103775. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103775>
- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C. J., & Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by *enterococci* in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575), Article 7575. <https://doi.org/10.1038/nature15524>
- Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2017). Tracing the *Enterococci* from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell*, 169(5), 849-861.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.027>
- Martínez, J. L. (2017). Effect of antibiotics on bacterial populations: A multi-hierarchical selection process. *F1000Research*, 6, 51. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9685.1>
- Martinez-Bueno, M., Galvez, A., Valdivia, E., & Maqueda, M. (1990). A transferable plasmid associated with AS-48 production in *enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2817-2818. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2817-2818.1990>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010>
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial

- gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4245-4249. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05>
- O'Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, 8, 217-230. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>
- Oppegård, C., Emanuelsen, L., Thorbek, L., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2010). The Lactococcin G Immunity Protein Recognizes Specific Regions in Both Peptides Constituting the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1267-1273. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-09>
- Paine, R. T. (1966). Food Web Complexity and Species Diversity. *The American Naturalist*, 100(910), 65-75.
- Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Current opinion in microbiology*, 13(5), 632-639. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.004>
- Pandey, R., Usui, K., Livingstone, R. A., Fischer, S. A., Pfaendtner, J., Backus, E. H. G., Nagata, Y., Fröhlich-Nowoisky, J., Schmäser, L., Mauri, S., Scheel, J. F., Knopf, D. A., Pöschl, U., Bonn, M., & Weidner, T. (2016). Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water. *Science Advances*, 2(4), e1501630. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501630>
- Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms*, 9(10), 2107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102107>
- Qiao, Y., Qiu, Z., Tian, F., Yu, L., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2022). Effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* strains on the immune system and intestinal flora of normal mice. *Food Science and Human Wellness*, 11(2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.11.008>
- Raven, K. E., Reuter, S., Reynolds, R., Brodrick, H. J., Russell, J. E., Török, M. E., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2016). A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*, 26(10), 1388-1396. <https://doi.org/10.1101/gr.204024.116>
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M. H. J., Jeffery, I. B., O'Donnell, M. M., Neville, B. A., Forde, B. M., Claesson, M. J., Harris, H., Gardiner, G. E., Casey, P. G., Lawlor, P. G., O'Toole, P. W., & Ross, R. P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* Bacteriocin Abp118 on the Mouse and Pig Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*, 7(2), e31113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031113>
- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Serio, A., Paparella, A., Chaves-López, C., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2007). *Enterococcus* populations in Pecorino Abruzzese cheese: Biodiversity and safety aspects. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1561-1568. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.7.1561>
- Siewewerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: From Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997-5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Szabó, P., Czárán, T., & Szabó, G. (2007). Competing associations in bacterial warfare with two toxins. *Journal of Theoretical Biology*, 248(4), 736-744. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.06.022>

- Towle, K. M., & Vederas, J. C. (2017). Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *MedChemComm*, 8(2), 276-285. <https://doi.org/10.1039/C6MD00607H>
- Tymoszevska, A., Ovchinnikov, K. V., Diep, D. B., Słodownik, M., Maron, E., Martínez, B., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2021). *Lactococcus lactis* Resistance to Aureocin A53- and Enterocin L50-Like Bacteriocins and Membrane-Targeting Peptide Antibiotics Relies on the YsaCB-KinG-LlrG Four-Component System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(12), e00921-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00921-21>
- Vergis, E. N., Shankar, N., Chow, J. W., Hayden, M. K., Snyderman, D. R., Zervos, M. J., Linden, P. K., Wagener, M. M., & Muder, R. R. (2002). Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*, 35(5), 570-575. <https://doi.org/10.1086/341977>
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R. J., ... Woodford, N. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 13(47), 19046.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Yamada, Y., Tikhonova, E. B., & Zgurskaya, H. I. (2012). YknWXYZ Is an Unusual Four-Component Transporter with a Role in Protection against Sporulation-Delaying-Protein-Induced Killing of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4386-4394. <https://doi.org/10.1128/JB.00223-12>
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., & Sun, Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, 196, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>

