



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**Identificación e caracterización de
microorganismos contaminantes de produtos
lácteos, e busca de biomarcadores peptídicos
mediante LC-ESI MS-MS**

Ana González Abril

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES EN BIOLOXÍA
MICROBIANA E PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2019



DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE

Identificación e caracterización de microorganismos contaminantes de produtos lácteos, e busca de biomarcadores peptídicos mediante LC-ESI MS-MS

Dna. Ana González Abril

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1. A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2. De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3. A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
4. Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 12 de Xullo de 2019

Asdo. Ana González Abril



AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES

Identificación e caracterización de microorganismos contaminantes de produtos lácteos, e busca de biomarcadores peptídicos mediante LC-ESI MS-MS

D. Tomás González Villa
Dna. M^a Pilar Calo Mata

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. Ana González Abril, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 12 de Xullo de 2019

Asdo. Tomás González Villa

Asdo. M^a Pilar Calo Mata



CONFLITO DE INTERESES

**Identificación e caracterización de
microorganismos contaminantes de produtos
lácteos, e busca de biomarcadores peptídicos
mediante LC-ESI MS-MS**

Dna. Ana González Abril

O doutorando declara non ter ningún conflito de interese en relación a súa tese de doutoramento.

En Santiago de Compostela, 12 de Xullo de 2019

Asdo. Ana González Abril

Durante a realización da presente Tese Doutoral, Dona Ana González Abril foi beneficiaria dunha axuda de apoio a etapa predoutoral conducente ó título de Doutora, concedida pola Xunta de Galicia e financiada pola Unión Europea a través do Fondo Social Europeo e pola Secretaría Xeral de Universidades, pertencente á Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria da Xunta de Galicia.

O traballo realizado foi tamén financiado polos fondos do Ministerio de Economía e Competitividade de España co proxecto AGL2013-48244-R e, polo Fondo Europeo de Desenvolvemento Rexional (FEDER) (2007-2013).

AGRADECEMENTOS

Gustaríame agradecer despois de todos estes anos, ás persoas que dalgún modo contribuíron neste traballo:

Ós meus directores de Tese, o profesor Tomás González Villa por permitirme traballar no seu laboratorio dende aquel día no que con ilusión petei na súa porta, e á profesora Pilar Calo Mata, a ámbolos dous por todo o que me ensinaron e o seu apoio. Agradecerlles tamén a súa confianza en mi, os ánimos nos momentos máis difíciles e tódalas conversación das que aprendín tanto.

Ó profesor Vicente Notario por abrirme as portas do seu laboratorio en “Georgetown University” onde realicei a miña estancia predoutoral, e por ensinarme tantas cousas novas poñendo a súa total confianza en mi.

Á profesora Encarna Velazquez do departamento de Microbioloxía e Xenética da Universidade de Salamanca, pola súa axuda, apoio e colaboración no primeiro artigo da miña carreira como investigadora no cal puxo moito empeño e tempo. Á Mónica Carrera, Karola Bohème e Ignacio Ortea pola súa axuda para comprender mellor a proteómica.

Ós meus compañeiros de laboratorio Jose Luís e Lucia, por que sempre que necesitei da súa axuda parábanse a solucionar as miñas dúbidas. E sobre todo a Jose Luís polo seu apoio de principio a fin durante tódolos días no laboratorio. Agradecer tamén ás demais profesoras do grupo Trinidad e Sandra onde nas pausas de café pareime a observar e aprender das súas conversacións.

Ós meus amigos e a Javi por recordarme que son capaz de todo o que me propoña, polos ánimos cando os necesitaba e por facer seus os meus logros.

A miña familia. Ós meus pais por poñer sempre en primeiro lugar os meus estudos e as miñas preferencias na vida. Por sempre confiar en mi cando teño dúbidas. Ó meu irmán por ensinarme valores sen darse conta. Ós meus avós por que para eles sempre estarei no colexio. A miña tía e madriña por sempre estar. Por que sen todos eles nada disto sería posible.

*“Nothing in life is to be feared,
it is only to be understood...”*

- Marie Curie



A miña familia.



ÍNDICE

ABSTRACT	I
RESUMO	V
ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE DE TÁBOAS	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Microorganismos contaminantes de alimentos.....	1
1.1.1 Fungos contaminantes de alimentos.....	1
1.1.2 Bacterias Gram positivas contaminantes de alimentos.....	2
1.1.3 Bacterias Gram negativas contaminantes de alimentos.....	3
1.1.4 Bacterias contaminantes de alimentos formadoras de esporas.....	3
1.2 Técnicas de preservación de alimentos.....	6
1.3 A resposta adaptativa das bacterias que contaminan alimentos.....	6
1.4 Organismos contaminantes de produtos lácteos.....	8
1.4.1 <i>Bacillus</i> spp. contaminantes de produtos lácteos.....	10
1.4.2 <i>Streptococcus</i> spp. contaminantes de produtos lácteos.....	12
1.4.3 <i>Staphylococcus</i> spp. contaminantes de produtos lácteos.....	13
1.5 Identificación de microorganismos contaminantes de alimentos.....	13
1.5.1 Métodos baseados en ácidos nucleicos.....	14

1.5.2 Métodos baseados en biosensores	22
1.5.3 Métodos inmunolóxicos.....	24
1.5.4 Métodos de espectrometría de masas	25
1.5.4.1 MALI-TOF MS	29
1.5.4.2 LC-MS	31
1.5.4.3 Perspectivas de futuro dos espectrometros de masas	32
1.5.5 A co-evolución entre bacterias e bacteriofagos: identificación bacteriana mediante métodos baseados en fagos	33
1.5.5.1 Interaccións entre bacterias e bacteriofagos	33
1.5.5.2 Métodos baseados en bacteriofagos.....	37
1.5.5.3 Bacteriofagos de <i>Streptococcus</i> spp.	39
1.5.5.4 Bacteriofagos de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
1.5.6 Perspectivas de futuro na identificación bacteriana.....	41
1.6 Caracterización de novas cepas bacterianas	41
1.6.1 Métodos xenéticos	42
1.6.1.1 Secuenciación xenética.....	43
1.6.1.2 Hibridación DNA-DNA e contido G+C	44
1.6.1.3 Secuenciación xenómica.....	44
1.6.2 Caracterización fenotípica: Morfoloxía, fisioloxía e bioquímica	46
1.6.3 Mínimos estándares	48
2. OBXECTIVOS.....	53
2.1 Obxectivos xerais da tese.....	53

2.2	Obxectivos do capítulo I.....	53
2.3	Obxectivos do capítulo II.....	54
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1	Microorganismos, medios de cultivo, plásmidos e oligonucleótidos empregados.....	59
3.1.1	Microorganismos	59
3.1.1.1	Microorganismos illados de leite condensado contaminado	59
3.1.1.2	Microorganismos tipo de <i>Bacillus</i> spp. empregados	59
3.1.1.3	Microorganismos de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i> produtores de mastite.....	60
3.1.1.4	Outras cepas bacterianas.....	62
3.1.2	Medios de cultivo	63
3.1.3	Oligonucleótidos.....	64
3.1.4	Plásmidos.....	66
3.1.4.1	pUC19.....	66
3.2	Técnicas de manipulación de DNA.....	67
3.2.1	Extracción de DNA.....	67
3.2.1.1	Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	67
3.2.1.2	Extracción de DNA xenómico para Gram positivas.....	67
3.2.2	Amplificación do DNA	68
3.2.2.1	Amplificación da rexión 16S rRNA.....	68
3.2.2.2	Amplificación do xene <i>gyrB</i>	69

3.2.2.3 Amplificación dun fragmento do xene <i>tuf</i>	69
3.2.2.4 Amplificación da rexión hipervariable ITS1 e ITS2 de levaduras	70
3.2.2.5 Amplificación parcial do xene <i>HIS3</i>	70
3.2.3 Electroforese de DNA.....	71
3.2.3.1 Electroforese en xel de agarosa	71
3.2.4 Captura de imaxes e visualización de xeles.....	71
3.2.5 Purificación do DNA.....	72
3.2.5.1 Purificación do DNA a partir de xeles de agarosa	72
3.2.5.2 Purificación dende unha reacción enzimática.....	72
3.2.6 Cuantificación do DNA.....	72
3.2.7 Dixestión enzimática do DNA.....	72
3.2.7.1 Enzimas de restrición.....	72
3.2.7.2 Defosforilación do DNA.....	73
3.2.7.3 Fosforilación	73
3.2.7.4 Ligación de DNA.....	73
3.2.8 Transformación de microorganismos.....	74
3.2.8.1 Transformación de <i>E. coli</i>	74
3.2.8.1.1 Preparación de células competentes	74
3.2.8.1.2 Transformación de células competentes.....	75
3.2.8.1.3 <i>Screening</i> por PCR e corte con Pst1 e EcoR1 das colonias transformadas	75
3.2.9 Secuenciación do DNA.....	76

3.2.10	Secuenciación e análise do xenoma da cepa BC09 ^T	76
3.2.10.1	Extracción e secuenciación.....	76
3.2.10.2	Ensamblaxe e anotación do xenoma.....	76
3.2.10.3	Análise bioinformática do xenoma da cepa BC09 ^T e as cepas tipo máis próximas.....	77
3.2.10.3.1	Identidade media en nucleótidos (ANI).....	77
3.2.10.3.2	Hibridación del DNA-DNA <i>in silico</i> (dDDH)	77
3.2.11	Construción de árbores	78
3.2.11.1	Árbore filoxenética dos xenes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	78
3.2.11.2	Árbore filoxenómica da cepa BC09 ^T e as súas cepas tipo máis próximas.....	78
3.2.11.3	Árbore filoxenómica dos bacteriófagos de <i>Streptococcus</i>	78
3.2.11.4	Árbore filoxenética do xene holin dos bacteriófagos de <i>Streptococcus</i>	79
3.3	Técnicas microbiolóxicas de identificación de microorganismos	79
3.3.1	Obtención de cultivos puros	80
3.3.2	<i>Stock</i> de los cultivos puros illados	80
3.3.3	Caracterización fenotípica	80
3.3.3.1	Estudo da motilidade	81
3.3.3.2	Estudo das esporas	81
3.3.3.3	Probas fenotípicas.....	81
3.3.3.4	Contído G+C do DNA.....	83
3.3.3.5	Hibridación DNA-DNA.....	83

3.3.3.6	Análise dos ácidos graxos.....	83
3.3.3.7	Outros estudos quimiotaxonómicos.....	84
3.4	Técnicas de análise de proteínas.....	84
3.4.1	Estudo do patrón proteico <i>fingerprint</i> das cepas bacterianas mediante MALDI-TOF MS.....	84
3.4.1.1	Extracción de proteínas para espectrometría de masas por MALDI-TOF MS.....	84
3.4.1.2	Análise en espectrometría de masas MALDI-TOF MS.....	85
3.4.1.3	Procesado de datos analizados por MALDI-TOF MS.....	85
3.4.2	Busca de péptidos biomarcadores mediante LC-MS/MS.....	86
3.4.2.1	Extracción de proteínas para espectrometría de masas por LC-MS/MS.....	86
3.4.2.2	Cuantificación da proteína soluble.....	86
3.4.2.3	Dixestión das proteínas con tripsina.....	87
3.4.2.4	Desalación e purificación dos péptidos.....	87
3.4.2.5	Análise en espectrometría de masas LC-MS/MS.....	88
3.4.2.6	Procesado de datos analizados por LC-MS/MS.....	89
3.4.2.7	Selección de potenciais biomarcadores peptídicos.....	89
4.	RESULTADOS E DISCUSIÓN	93
4.1	Capítulo I: Busca de novos illados, identificación de contaminantes de leite condensado e, descrición de <i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i> subsp. nov. e <i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i> subsp. nov.....	93
4.1.1	Identificación das cepas de levaduras.....	93

4.1.1.1	Amplificación e secuenciación da rexión ITS	93
4.1.1.2	Deseño dos oligonucleótidos e a secuenciación da rexión <i>HIS3</i> ...	94
4.1.2	Identificación das cepas bacterianas	96
4.1.2.1	Amplificación e secuenciación do 16S rRNA.....	96
4.1.2.2	Deseño dos oligonucleótidos e secuenciación de <i>gyrB</i>	102
4.1.3	Caracterización da cepa BC09 ^T	113
4.1.3.1	Caracterización morfolóxica, macroscópica e microscópica	113
4.1.3.2	Estudo xenotípico	116
4.1.3.2.1	Arbores filoxenéticas dos xenes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	116
4.1.3.3	Estudo xenómico	120
4.1.3.3.1	ANIb (Identidade nucleotídica media) e dDDH (Hibridación DNA-DNA <i>in silico</i>).....	121
4.1.3.3.2	Árbore filoxenómica.....	122
4.1.3.4	Estudo proteómico mediante MALDI-TOF	124
4.1.3.5	Estudo quimitaxonómico e fenotípico	131
4.1.3.6	Caracterización fenotípica mediante probas bioquímicas	134
4.1.4	Descrición de <i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i> subsp. nov.	139
4.1.5	Descrición de <i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i> subsp. nov.	140
4.2	Capítulo II: Caracterización de péptidos biomarcadores mediante LC-ESI-MS/MS, para a identificación de especies de <i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> produtoras de mastite.	142

4.2.1 Caracterización dos péptidos para a identificación de <i>Streptococcus</i> spp. mediante LC-ESI-MS/MS.....	142
4.2.1.1 Repositorio proteómico de <i>Streptococcus</i> spp. produtoras de mastite.....	142
4.2.1.2 Caracterización dos péptidos de factores de virulencia para a identificación de <i>Streptococcus</i> spp. produtoras de mastite.....	143
4.2.1.2.1 Péptidos de toxinas determinados para <i>Streptococcus</i> spp.....	149
4.2.1.2.2 Péptidos determinados implicados na resistencia a antibióticos e a telurito.....	150
4.2.1.2.3 Péptidos determinados de proteínas implicadas na evasión inmune e colonización.....	151
4.2.1.2.4 Péptidos determinados de proteínas implicadas na produción de lantibióticos.	153
4.2.1.2.5 Péptidos determinados de transportadores ABC, asociados a factores de virulencia	154
4.2.1.3 Caracterización dos péptidos de orixe fágico para a identificación de <i>Streptococcus</i> spp. produtoras de mastite	155
4.2.1.3.1 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus uberis</i>	169
4.2.1.3.2 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus parauberis</i>	171
4.2.1.3.3 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	172
4.2.1.3.4 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus agalactiae</i>	173

4.2.1.3.5 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus canis</i>	174
4.2.1.3.6 Péptidos de fagos determinados para <i>Streptococcus gallolyticus</i>	174
4.2.1.3.7 Estudo filoxenómico dos fagos de <i>Streptococcus</i> determinados.....	175
4.2.1.3.8 Estudo filoxenético do xene holin dos fagos de <i>Streptococcus</i> determinados	180
4.2.2 Caracterización dos péptidos para a identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante LC-ESI-MS/MS.....	182
4.2.2.1 Repositorio proteómico de <i>S. aureus</i> produtoras de mastite.....	182
4.2.2.2 Caracterización dos péptidos de orixe fájico para a identificación de <i>S. aureus</i>	182
4.2.2.2.1 Péptidos de fagos determinados para <i>S. aureus</i>	189
4.2.2.2.2 Estudo filoxenómico dos fagos de <i>S. aureus</i> determinados	190
4.2.2.2.3 Estudo filoxenético do xene <i>holin</i> dos fagos de <i>S. aureus</i> determinados	195
4.2.3 Perspectivas de futuro dos péptidos biomarcadores determinados de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i> produtoras de mastite	197
5. CONCLUSIONS/CONCLUSIÓNS.....	205
6. REFERENCES.....	213
7. PUBLICATIONS	247

ABSTRACT

Milk is a dairy product with high concentration of nutrients such as proteins, fats, carbohydrates, vitamins, minerals and amino acids. Its high nutritional value, neutral pH (6.6-6.8) and high-water content make it an ideal environment for microorganism growth. Within the microorganism that can be found in milk, many of them are lactic acid bacteria such as *Streptococcus*. Species of *Bacillus* and *Staphylococcus* are also present being a cause of milk spoilage.

Bacillus is the most diverse genus and can be found in several environments. Despite the existence of numerous species of this genus, they are not pathogenic with the exception of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. Some species of *Streptococcus* are in fact pathogenic and are frequently isolated from dairy products. Species involved in both clinical and subclinical mastitis are *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. Moreover, *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus parauberis* have been reported as minor mastitis agents. *Staphylococcus aureus* is considered the major pathogen in food spoilage, due to the intoxication it causes and their resistance to pasteurization temperature. *S. aureus* is transferred to milk through the equipment in use, human management contact or by the mammal channel producing mastitis, when milk passes through.

Classical and culture-based methods for bacteria identification and characterization are slow and labour-intensive. Therefore, molecular microbial diagnostic methods based on genomics and proteomics allow a faster and more effectively species identification. To appropriately characterize and identify different strains, several genes such as 16S rRNA and, genomic and proteomic techniques such as MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) and LC-ESI-MS/MS (liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry) were also applied. Nevertheless,

Abstract

to correctly describe a new strain it is necessary to assess phenotypic probes and chemotaxonomic results following the recommendations of minimal standards for each taxon.

LC-ESI-MS/MS has been used for the analysis of bacterial pathogen strain-specific diagnostic peptides allowing the characterization and identification of bacterial strains. These diagnostic peptides determined by mass spectrometric LC-ESI-MS/MS techniques, could be useful for identification of food spoilage microorganism. Particularly, peptides which belong to specific function proteins, such as virulence factors and phage protein origin because of their specificity to bacterial host.

Chapter I of this research focuses on identification of strains isolated from a contaminated sample of condensed milk and the characterization of a new subspecies of *Bacillus safensis*. The sequencing of genes such as 16S rRNA, *gyrB* and *tuf* for bacteria and, *ITS* and *HIS3* for yeast, determined the phylogenetically closest species for the isolated strains. BC05 strain belongs to *Paenibacillus polymyxa*, BC08 strain is phylogenetically very close to *Bacillus paralicheniformis* and BC03 strain belongs to the yeast species *Zygosaccharomyces rouxii*. However, for BC09^T strain a more in deep research has been realized for its characterization. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA, *gyrB* gene and *tuf* gene sequences placed strain BC09^T into the genus *Bacillus* with its closest relatives being *B. safensis* and *Bacillus australimaris*. Genome sequencing has been performed, analysed and compared with its closest relatives type strains species by parameters such as DNA–DNA digital hybridization (dDDH) and average nucleotide identity BLAST (ANIb). ANIb values for BC09^T compared to *B. safensis* and *B. australimaris* type strains were 95.7 and 67.6%, respectively, and dDDH values were 67 and 56 %, respectively. Moreover, phenotypic and chemotaxonomic studies have been performed through the determination of fatty acids, polar lipids and peptidoglycans. MK-7 was the only menaquinone detected and iso-C15:0 and anteiso-C15:0 were the major fatty acids. Additionally, mayor differences

in polar lipids profile of BC09^T were found, compared with its closest relative type strains species is the absence of phosphoglycolipid in these last both, and phosphatidylglycerol absence in *B. safensis*. Furthermore, proteomic analysis has been performed by comparing spectral protein profile “fingerprint” of BC09^T and its closest relatives type strains species by MALDI TOF. Specific mass peaks were determined for BC09^T and each species. Phylogenetic, chemotaxonomic and phenotypic analyses showed that strain BC09^T represents a new subspecies of *B. safensis*, for which the name *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov. is proposed. The type strain is BC09^T (=LMG 30124^T, =CECT 9344^T).

Chapter II of this thesis focuses on the analysis of tryptic digestion peptides from mastitis producer *Streptococcus* spp. and *S. aureus* isolated from milk, by LC-ESI-MS/MS. A total of 100 µg protein extraction was digested with trypsin, cleaned on a C18 microSpin TM, and then analysed by LC-MS/MS. Proteomic data was processed by SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4 package, Thermo Scientific) against Bacteria in the UniProt/TrEMBL database. Moreover, analysis of specific peptides belonging to phage protein origin and virulence factor were performed. The aim was to search for specific biomarkers that are useful for a rapid identification of such studied strains. Phage origin peptides that belongs to proteins such as phage repressors, phage endopeptidases, structural phage proteins and non-characterized phage proteins were determined. In addition, specific peptides of different virulence factors such as toxins and M protein among others, were determined. These peptides are thought to be useful as biomarkers for identification and characterization of producer mastitis strains. The phage peptide MATNLGQAYVQIMPSAK is very specific of *S. agalactiae* and IRLPYDVK, LYVGVFNPEATK, IYNEI-DEALKSK, SIINGKLD SQWTV PNEHK, and, MNDSNQGLQAN-PQYTIHYLSQEITR peptides are very specific of *S. aureus*. DLWC-NMIIAAK peptide was selected as a potential diagnostic peptide, very specific of *S. dyagalactiae*, belonging to a virulence factor implicated in the transporter of a lantibiotic.

RESUMO

O leite é un alimento moi rico en nutrientes como proteínas, graxas, carbohidratos, vitaminas, minerais e aminoácidos. O seu alto valor nutricional, o seu pH neutro (6.6-6.8) e o seu alto contido en auga, fai do leite un ambiente ideal para o crecemento de moitos microorganismos. Entre os microorganismos que encontramos no leite, moitos producen fermentacións lácticas como *Streptococcus*, e outros causan contaminacións como *Bacillus* e *Staphylococcus*.

Bacillus é o xénero máis diverso e pode encontrarse en ambientes moi variados. A pesar da existencia de tan numerosas especies neste xénero, considéranse non patóxenas, a excepción de *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. Certas especies do xénero *Streptococcus* son patóxenas e frecuentemente illadas de produtos lácteos. Especies como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus canis* son os principais microorganismos causantes da mastite. Tamén estudouse como *Streptococcus parauberis* e *Streptococcus gallolyticus* son axentes minoritarios produtores de mastite. Por outro lado, *Staphylococcus aureus* é considerado o maior patóxeno contaminante de alimentos, debido a que produce serias intoxicacións alimentarias e a que pode resistir as temperaturas de pasteurización. *S. aureus* é transferida ó leite a través do equipamento, o manexo humano ou do canal da mama producindo mastite, cando a leite pasa por el.

Para a identificación e caracterización dos microorganismos, os métodos clásicos baseados no cultivo son lentos e laboriosos. Os métodos de diagnóstico moleculares baseados na xenómica e proteómica permiten unha identificación das especies máis rápida e efectiva. Entre estas metodoloxías encóntranse, o estudo de xenes como o 16S rRNA, o estudo do xenoma e o emprego de técnicas proteómicas como MALDI TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) e LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography-electrospray ionization-tan-*

Resumo

dem mass spectrometry) para a caracterización e identificación das cepas. Aínda así, para a descrición dunha nova cepa é necesaria a aportación dos resultados obtidos a partir de probas bioquímicas e de estudos quimiotaxonómicos segundo se describe nos mínimos estándares para cada taxón.

LC-ESI-MS/MS foi empregado con anterioridade para a análise de péptidos diagnóstico específicos de bacterias patóxenas que permiten a caracterización e identificación de cepas bacterianas. Estes péptidos biomarcadores determinados mediante as técnicas de espectrometría de masas LC-ESI-MS/MS, poden ser útiles para a identificación dun microorganismo contaminante de alimentos. Sobre todo, péptidos pertencentes a proteínas de función específica como os factores de virulencia es as proteínas de orixe fáxico pola súa especificidade coa bacteria que infecta.

Ó capítulo I deste traballo centrase na identificación das cepas illadas dun sobre contaminado de leite condensada e a caracterización dunha nova subespecie de *Bacillus safensis*. Determinouse mediante a secuenciación de xenes como o 16S rRNA o *gyrB* e o *tuf* no caso de bacterias e, *ITS* e *HIS3* para levaduras, que a cepa illada BC05 pertence a especie *Paenibacillus polymyxa*, a cepa BC08 é moi próxima filoxenéticamente a *Bacillus paralicheniformis* e BC03 pertence á especie de levaduras *Zygosaccharomyces rouxii*. Sen embargo, no caso da cepa BC09^T, levouse a cabo un estudo máis extenso para a súa caracterización. Segundo a secuenciación e conseguinte análise filoxenética baseadas no 16S rRNA, o xene *gyrB* e *tuf*, determinouse que as especies máis próximas á cepa BC09^T son *B. safensis* seguido de *Bacillus australimaris*. Para a súa caracterización realizouse a secuenciación do xenoma e o análise de este mediante parámetros como a hibridación DNA-DNA *in silico* (dddH) e a identidade nucleotídica media BLAST (ANIb) comparandoos co das cepas tipo das dúas especies máis próximas. Determináronse medias para o dddH de 67 e 56 %, respectivamente entre a cepa BC09^T e as cepas *B. safensis* e *B.*

australimaris. Os ANIb calculados entre a cepa BC09^T e as dúas máis próximas son 95.7% e 56% respectivamente. Realizouse tamén o estudo fenotípico e quimiotaxonómico coa determinación de ácidos graxos, lípidos polares e péptidoglicanos. A única menaquinona detectada para a cepa BC09^T foi MK-7 e os principais ácidos graxos son iso-C15:0 e anteiso-C15:0. As principais diferenzas no patrón de lípidos polares da cepa BC09^T con as cepas tipo de *B. safensis* e *B. australimaris* é a ausencia de fosfoglicolípidos nestas dous últimas e a do fosfatidilglicerol en *B. safensis*. Tamén realizouse o estudo proteómico e a comparación entre os picos do espectro de proteínas “*fingerprin*”, determinando os picos característicos da cepa BC09^T e das especies máis próximas a ela mediante MALDI TOF. Segundo tódolos resultados, tanto as análises filoxenéticas como quimiotaxonómicas e fenotípicas, determinan que a cepa BC09^T representa unha nova subespecie de *B. safensis*, co nome de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., sendo a cepa tipo BC09^T (=LMG 30124^T, =CECT 9344^T).

No capítulo II desta tese, levouse a cabo o estudo dos péptidos tripticos analizados por LC-ESI-MS/MS de *Streptococcus* spp. e *S. aureus* illadas de leite e produtoras de mastite. 100 µg da extracción proteica foi dixerida con tripsina, lavada en columnas C18 microSpinTM e analizada por LC-MS/MS. Os datos proteómicos foron procesados por SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4 package, Thermo Scientific) fronte a Bacteria da base de datos UniProt/ TrEMBL. Co obxectivo de determinar péptidos biomarcadores para estas cepas, estudáronse os péptidos específicos de orixe fáxico e pertencentes a factores de virulencia. Determináronse para as cepas analizadas, péptidos específicos de orixe fáxico de proteínas como proteínas estruturais de fagos, represores, endopeptidasas e proteínas non caracterizadas de fagos. Ademais, no estudo dos factores de virulencia determináronse péptidos específicos de toxinas e da proteína M entre outras, todos eles útiles como péptidos diagnóstico na identificación e caracterización de cepas produtoras de mastite. O péptido de orixe fáxico MATNLGQAYVQIMPSAK é moi específico para a especie *S. agalactiae* e os péptidos IRLPYYDVK,

Resumo

LYVGVFNPEATK, IYNEIDEALKSK, SIINGKLDSQWTVNEHK, e MNDSNQGLQANPQYTIHYLSQEITR son moi específicos para *S. aureus*. Seleccionouse tamén o péptido DLWCNMIIAAK pertencente a un transportador de lantibiótico implicado na virulencia das bacterias e moi específico para *S. dyagalactiae*, como potencial biomarcador.



ABREVIATURAS

μm: Micrometros

2-DE: Xel de electroforese bidimensional

aa: Aminoácidos

ACN: Aceto nitrilo

AFLP: *Amplified fragment lenght polymorphism*

AFLP: *Amplified fragment-length polymorphism PCR*

ANI: Identidade media de nucleótidos

ATP: Adenosina trifosfato

BLASTn: *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTp: *Protein Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: Albúmina sérica bovina

BTS: *Bacterial test standard*

CETAL: Centro Tecnolóxico Agroalimentario

CID: *Collision-induced dissociation*

CRISPR: Repeticións Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente interespaciadas

Da: Daltóns

dDDH: Hibridación DNA-DNA *in silico* (*digital DNA-DNA Hibridation*)

DDH: Hibridación DNA-DNA

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNasa: Desoxirribonucleasa

Abreviaturas

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensaio de inmunoabsorción ligado a enzima

ESI: *Electrospray ionization*

Etc.: Etcétera

FA: Ácido fórmico

FDR: False discovery rate

FESEM: Microscopía electrónica de varrido de emisión de campo

FISH: Hibridación fluorescente *in situ*

FT-MS: Resonancia ciclotrónica de iones de transformada de Fourier

g: Fuerza centrífuga relativa

g: Gramo

GC: Cromatografía de gas

GNAT: *Gcn5-related N-acetyltransferases*

h: Horas

H2OmQ: Auga Milli-Q® (ultrapura)

HCl: Ácido clorhídrico

HGT: Tranferencia horizontal de xenes

HPA: *Hybridization Protection Assays*

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

IAA: Iodoacetamida

ICSB: *International Committee on Systematic Bacteriology*

ICSP: *International Committee on Systematic of Prokaryotes*

IDT: *Integrated DNA Technologies*

IMS: Separación inmunomagnética

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IS1: ión 1

IS2: ión 2

IT: Analizador de trampa iónica

kb: Kilobase

kDa: KiloDalton

KNO₃: Nitrato potásico

KOH : Hidróxido de potasio

Kv: Kilovoltio

LAB: Bacterias acidolácticas

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucles

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

LC-MS/MS: *Liquid chromatography–mass spectrometry*

LCR: Reacción en cadea da ligasa

LDR: Reacción da detección da ligasa

LiPA: *Line probe assay*

LSSCP: “*Low-Stringency Single-Specific-Primer*”

Abreviaturas

m/z: Relación masa carga

M: Molar

MALDI-TOF: *Matrix assisted laser desorption and ionization time of-flight*

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MeOH : Metanol

Meso-DAP: Ácido meso-diaminopimelico

mg: Miligramos

min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MOPS: 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid

mPCR: MúltiplePCR

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MR-VP: *Methyl-red Voges-Proskauer*

MS: Espectrometría de masas

MUM: *Maximal Unique Matches*

MV: Máxima verosimilitud

MW: Peso molecular

NA: *Nutrient Agar*

NaOH: Hidróxido de sodio

NASBA: Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos

NB: *Nutrient Broth*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nd.: Non determinado

ng : Nanogramos

NGS: Novas xeración de secuenciación

nt: Nucleótidos

N-terminal: Extremo amino terminal

°C: Símbolo de temperatura en grados Celsius

OGRI: *Overall Genome Related Index*

OGYE: *Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract*

Ori: Orixe de replicación

p/v: Porcentaje peso-volumen

p: *p*-valor

pb: Pares de bases

PCA: *Plate Count Agar*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank

PFGE: *Macro restriction analysis after pulsed field gel electrophoresis*

PMF: Espectros de mapeo peptídico

PMSF: fenilmetilsulfonilo

PNA: *Peptide Nucleic Acid*

PRCIs: Illas cromosómicas relacionadas con fagos

Abreviaturas

qPCR: PCR a tempo real

RAPD: *Random amplified polymorphic DNA*

RBP: Proteínas de fagos de unión ó receptor

Reasas: *Cognate restriction endonuclease*

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*

RNA: Ácido ribonucleico

RNasa: Ribonucleasa

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundo

SAP: Fosfatasa alcalina de camarón (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)

SPR: Resonancia plasmónica de superficie

SRA: *Sequence Read Archive*

SRNAs: RNAs pequeños (*Small RNAs*)

SSCP: Polimorfismo de Conformación de Cadea Simple

TBC: Recuento total de bacterias

TCA: Ácido tricloroacético

TDH: Hemolisina directa termoestable

TFA: Trifluoroacetico

TOF: Tempo de voo

TRH: Hemolisina relacionada con TDH

TSA: Agar triptico de soja (*Tryptic Soy Agar*)

TSB: Medio triptico de soja (*Tryptic Soy Broth*)

U: Unidade de actividade enzimática

UFC: Unidade formadora de colónia

UHT: Temperatura ultra alta (*Ultra High Temperature*)

UVA Ultravioleta

v/v: Porcentaxe volumen-volumen

v: Volume

VIDAS: Sistema de inmunodiagnos VITEK

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

YPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose*

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

μ m: Micrometro

μ M: Micromolar

μ scan: MicroScan



ÍNDICE DE TÁBOAS

Táboa 1. Principais bacterias formadoras de esporas responsables da contaminación de diferentes alimentos e as súas características fisiolóxicas.....	4
Táboa 2. Técnicas de detección de patóxenos baseadas en ácidos nucleicos.	21
Táboa 3. Ferramentas bioinformáticas para o estudo e comparativa de xenomas.....	45
Táboa 4. Cepas tipo de <i>Bacillus</i> spp. empregadas como referencia neste estudo.	59
Táboa 5. Cepas de <i>Streptococcus</i> spp. empregadas neste estudo.	60
Táboa 6. Cepas de <i>S. aureus</i> empregadas neste estudo.....	61
Táboa 7. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas neste estudo.....	62
Táboa 8. Oligonucleótidos empregados neste estudo.....	65
Táboa 9. Enzimas de restrición empregadas na dixestión de DNA.....	73
Táboa 10. Códigos de acceso do 16S rRNA das cepas tipo e BC09 ^T	117
Táboa 11. Códigos de acceso do xene <i>gyB</i> das cepas tipo e BC09 ^T	119
Táboa 12. Características da secuencia xenómica da cepa BC09 ^T	121
Táboa 13. Valores de dDDH e ANI _b entre BC09 ^T e as cepas máis próximas a ela.....	122
Táboa 14. Códigos de acceso do xenoma das cepas tipo e BC09 ^T	123
Táboa 15. Picos característicos de BC09 ^T e as cepas máis próximas a ela.....	126
Táboa 16. Composición dos ácidos graxos da cepa BC09 ^T e as especies máis próximas.....	131

Índice de Táboas

Táboa 17. Lípidos polares determinados para a cepa BC09 ^T e as especies máis próximas.....	133
Táboa 18. As características fenotípicas das cepas BC09 ^T e as cepas máis próximas.....	135
Táboa 19. As diferencias das características fenotípicas das cepas BC09 ^T e as cepas máis próximas.....	137
Táboa 20. Tódolos péptidos específicos de factores de virulencia determinados para as cepas de <i>Streptococcus</i> analizadas.....	144
Táboa 21. Tódolos péptidos de orixe fájico determinados para as cepas de <i>Streptococcus</i> analizadas.....	156
Táboa 22. Liñaxe, autores e números de acceso dos xenomas no NCBI dos fagos determinados con 100% de homoloxía fronte ós péptidos identificados.....	162
Táboa 23. Potenciais péptidos biomarcadores de <i>Streptococcus</i> de orixe fájico e a relación de estes péptidos cos <i>Clusters</i> xerados na árbore filoxenómica.....	178
Táboa 24. Tódolos péptidos de orixe fájico determinados para as cepas de <i>S. aureus</i> analizadas.....	183
Táboa 25. Liñaxe, autores e números de acceso dos xenomas no NCBI dos fagos determinados con 100% de homoloxía.....	187
Táboa 26. Potenciais péptidos biomarcadores de <i>S. aureus</i> de orixe fájico e a relación de estes péptidos cos <i>Clusters</i> xerados na árbore filoxenómica.....	192





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abundancia relativa dos xéneros de microorganismos encontrados en leite crú.....	9
Figura 2. Imaxe do 16S rRNA ribosómico de <i>E. coli</i> K12 MG1655.....	15
Figura 3. Imaxe esquemática dos dispositivos baseados en biosensores.....	23
Figura 4. Imaxe esquemática da espectrometría de masas e das fontes de ións ESI e MALDI.....	27
Figura 5. Imaxe esquemática de MALDI acoplada a TOF (MALDI TOF) e a TOF-TOF (MALDI TOF-TOF).	28
Figura 6. Técnicas de espectrometría de masas empregadas comúnmente na identificación e tipado de bacterias.....	32
Figura 7. Métodos baseados en bacteriofagos para a detección de bacterias.....	38
Figura 8. Imaxe da organización dos diferentes módulos do xenoma dos bacteriofagos das familias <i>Siphoviridae</i> , <i>Podoviridae</i> e <i>Myoviridae</i>	40
Figura 9. Esquema do vector pUC19.....	66
Figura 10. Imaxe do servizo web GGDC.....	77
Figura 11. Imaxe do servizo Web server VICTOR.....	79
Figura 12. Aliñamento das secuencias do ITS da cepa BC03 e as das especies <i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ABT301 ^T , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS 12631 ^T e <i>Zygosaccharomyces mellis</i> CBS 736 ^T	94
Figura 13. Secuencias do xene <i>HIS3</i> da cepa BC03 fronte as secuencias das especies <i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> ABT301 ^T , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS 12631 ^T e <i>Zygosaccharomyces mellis</i> CBS 736 ^T	95

Índice de Figuras

Figura 14. Electroforese en xel de agarosa dos fragmentos do xen 16S rRNA.....	97
Figura 15. Secuencias parciais do 16S rRNA da cepa BC05, <i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842 ^T , <i>Paenibacillus brasiliensis</i> PB172 ^T , <i>Paenibacillus peoriae</i> DSM 8320 ^T , <i>Paenibacillus jamilae</i> CECT 5266 ^T , <i>Paenibacillus terrae</i> AM141 ^T e <i>Paenibacillus kribbensis</i> AM49 ^T	98
Figura 16. Aliñamento das secuencias do 16S rRNA da cepa BC08 fronte as cepas tipo <i>B. sonorensis</i> NBRC 101234 ^T , <i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 ^T , <i>B. paralicheniformis</i> KJ-16 ^T , <i>B. glycinifermentans</i> GO-13 ^T e <i>B. haynesii</i> NRRL B-41327 ^T	100
Figura 17. Aliñamento das secuencias do xene 16S rRNA da cepa BC09 ^T , e as cepas tipo de <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T , <i>B. safensis</i> FO-36 ^T , <i>B. australimaris</i> NH7I_1 ^T , <i>B. zhagzhoensis</i> DW5-4 ^T , <i>B. xiamenensis</i> HYC-10 ^T e <i>B. altitudinis</i> 41KF2b ^T	102
Figura 18. Aliñamento dos oligonucleótidos deseñados dos xenes de <i>gyrB</i> (ScrBaci1pbF e ScrBaci311pbR) coas secuencias das especies do xénero <i>Bacillus</i> e <i>Paenibacillus</i> obtidas do GenBank.....	103
Figura 19. Secuencias do xene <i>gyrB</i> da cepa BC08 fronte as cepas tipo <i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T , <i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 ^T , <i>B. paralicheniformis</i> KJ-16 ^T , <i>B. glycinifermentans</i> GO-13 ^T e <i>B. haynesii</i> NRRL B-41327 ^T	106
Figura 20. Aliñamento das secuencias do xene <i>gyrB</i> de las cepa BC09 ^T , e as cepas tipo de <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T , <i>B. safensis</i> FO-36 ^T , <i>B. australimaris</i> NH7I_1 ^T , <i>B. zhagzhoensis</i> DW5-4 ^T , <i>B. xiamenensis</i> HYC-10 ^T e <i>B. altitudinis</i> 41KF2b ^T	108
Figura 21. Secuencias parciais do xene <i>tuf</i> da cepa BC08 fronte as cepas tipo <i>B. sonorensis</i> NBRC 101234 ^T , <i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 ^T , <i>B. paralicheniformis</i> KJ-16 ^T , <i>B. glycinifermentans</i> GO-13 ^T e <i>B. haynesii</i> NRRL B-4132 ^T	109

Figura 22. Aliñamento das secuencias do xene <i>tuf</i> da cepa BC09 ^T , e as cepas tipo de <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T , <i>B. safensis</i> FO-36 ^T , <i>B. australimaris</i> NH7I_1 ^T , <i>B. zhagzhoensis</i> DW5-4 ^T , <i>B. xiamenensis</i> HYC-10 ^T e <i>B. altitudinis</i> 41KF2b.	110
Figura 23. Colonias das cepas BC09 ^T (esquerda) e <i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T (dereita) tras 10 días cultivadas en TSA nas mesmas condicións.	114
Figura 24. Imaxe ó microscopio electrónico (TEM) onde se amosa o flaxelo polar da cepa BC09 ^T	114
Figura 25. Imaxes ó microscopio óptico (A) e microscopio de barrido de emisión de campo (FESEM) (B) onde se amosan as esporas ovais producidas pola cepa BC09 ^T e (C) pola cepa <i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	115
Figura 26. Árbore filoxenética baseada no modelo <i>Neighbour-Joining</i> kimura-2 (Kimura,1980) das secuencias máis próximas do xene 16S rRNA (1473 nucleótidos) de BC09 ^T e os taxóns máis próximos do xénero <i>Bacillus</i>	118
Figura 27. Arbore filoxenética baseada no modelo <i>Neighbour-Joining</i> (Saitou e Nei, 1987) co parámetro de kimura-2 (Kimura,1980) das secuencias máis próximas do xene <i>gyrB</i> (1069 nucleótidos) de BC09 ^T e os taxóns mais próximos do xénero <i>Bacillus</i>	120
Figura 28. Arbore filoxenómica baseada no modelo <i>Neighbour-Joining</i> kimura-2 (Kimura,1980) construído a partir do xenoma de BC09 ^T e dos das especies mais próximas empregando o programa bioinformático UBCGs.	124
Figura 29. Espectros “ <i>fingerprint</i> ” obtidos da análise das cepas BC09 ^T , <i>B. safensis</i> FO-36b ^T , <i>B. australimaris</i> MCCC 1A05787T, <i>B. zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 ^T , <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T e <i>B. xiamenensis</i> HYC-10T e <i>B. altitudinis</i> 41KF2b ^T por MALDI-TOF MS.	128

Índice de Figuras

Figura 30. Xel virtual co aliñamento dos espectros de masas da cepa BC09 ^T e as mais próximas a ela, usando a ferramenta ClinProTools.	129
Figura 31. Análise do compoñente principal (PCA) das cepas de <i>Bacillus</i> estudadas empregando a ferramenta ClinProTools.	130
Figura 32. MSP (<i>Mean spectra Projection</i>) dendograma das cepas BC09 ^T , <i>B. altitudinis</i> 41KF2b ^T , <i>B. australimaris</i> MCCC 1A05787 ^T , <i>B. xiamenensis</i> HYC-10 ^T , <i>B. zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 ^T , <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T , e <i>B. safensis</i> FO-36b ^T	130
Figura 33. Patrón de lípidos da cepa BC09 ^T	132
Figura 34. Imaxe do patrón de lípidos das cepas <i>B. australimaris</i> MCCC 1A05787 ^T (a) e <i>B. safensis</i> FO-36b ^T (b).	134
Figura 35. Arbore filoxenómica dos fagos de <i>Streptococcus</i> determinados con 100% homoloxía fronte os péptidos identificados e os fagos <i>Lambda</i> (NC_001416.1), <i>T4</i> (NC_000866.4) e <i>T7</i> (NC_001604.1).	176
Figura 36. Árbore filoxenética das secuencias do xene <i>holin</i> dos bacteriofagos determinados, baseada no modelo <i>Maximum-Likelihood</i> (ML) (Rogers & Swofford, 1998) co parámetro de kimura-2 (Kimura,1980).	181
Figura 37. Arbore filoxenómica dos fagos determinados para as cepas de <i>S. aureus</i> con 100% homoloxía fronte ós péptidos identificados e os fagos <i>Lambda</i> (NC_001416.1), <i>T4</i> (NC_000866.4) e <i>T7</i> (NC_001604.1).	191
Figura 38. Arbore filoxenética das secuencias do xene <i>holin</i> dos bacteriofagos determinados de <i>S. aureus</i> , baseada no modelo <i>Maximum-Likelihood</i> (ML) (Rogers & Swofford, 1998) co parámetro de kimura-2 (Kimura,1980).	196
Figura 39. Árbore filoxenómica dos fagos determinados para as cepas de <i>S.aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp. con 100% homoloxía fronte os péptidos identificados e os fagos <i>Lambda</i> (NC_001416.1), <i>T4</i> (NC_000866.4) e <i>T7</i> (NC_001604.1).	200







INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microorganismos contaminantes de alimentos

As contaminación de alimentos produce grandes perdas económicas na industria alimentaria. Os consumidores demandan a preservación das características organolépticas, nutricionais e as propiedades beneficiosas para a saúde nos produtos que compran. Para conservar todas estas características dos produtos alimentarios, a industria modifica e mellora a tecnoloxía, os métodos de esterilización e tratado dos produtos co obxectivo de evitar as contaminación (André et al., 2017). Sen embargo, é necesario un mellor coñecemento da fisioloxía e ecoloxía dos microorganismos contaminantes para prever as contaminacións e establecer novos métodos rápidos e seguros de detección de ditos contaminantes.

Diferentes estudos expuxeron as principais especies de microorganismos contaminantes de alimentos, segundo as características e o tipo de alimentos que contaminan. As bacterias formadoras de esporas xogan un importante papel como contaminantes de alimentos xa que son moito máis resistentes fronte as estratexias de esterilización e conservación (André et al., 2017).

1.1.1 Fungos contaminantes de alimentos

A contaminación dos alimentos por fungos provén principalmente da maquinaria de procesado empregada, onde fungos filamentosos, levaduras e móhoos como *Geotrichum candidum* adhírense as superficies e se transportan polo aire transferíndose ó produto. Moitas levaduras son capaces de producir *biofilms*, o que fai que sexa moi complicado de eliminar. Outros fungos contaminantes de alimentos son *Pichia burtonii*, *Penicillium expansum* e *Byssoschlamys* spp. (Snyder & Worobo, 2018). Certas especies de levaduras do xénero *Zygosaccharomyces* poden

Introdución

crecer en alimentos con altos valores osmóticos. Estas levaduras encontráronse en concentrados de froita, mel e marmeladas entre outros (Escott et al., 2018).

1.1.2 Bacterias Gram positivas contaminantes de alimentos

As bacterias Gram positivas, e sobre todo bacterias de *Firmicutes*, son os principais contaminantes de alimentos de orixe animal. Particularmente, as bacterias ácidolácticas (LAB): *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* ou *Carnobacterium*, e tamén *Enterococcus*, están frecuentemente asociados a contaminación de alimentos. En xeral as bacterias LAB son beneficiosas pola súa característica de fermentar variedade de alimentos e materias primas contribuíndo ó seu sabor, textura, olor e preservación. Sen embargo, algunhas especies como *Lactobacillus alimentarius* é contaminante de alimentos marinados; *Carnobacterium divergens* e *Carnobacterium maltaromaticum* están asociadas a contaminación en carne e marisco durante o seu procesado; e, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* tamén asocianse a contaminacións de carne procesada. *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc gasicomitatum* e *Weissella confusa* son contaminantes de alimentos mariños (Remenant et al., 2015).

A demais das especies LAB, outras bacterias Gram positivas son importantes contaminantes de alimentos, como *Brochothrix thermosphacta*, unha bacteria ubicua na cadea do procesado da carne, que contamina a materia prima de múltiples produtos. Describiuse que *Alicyclobacillus* é o único xénero acidofílico formador de esporas, capaz de contaminar produtos con pH de 2.5 ata 3.5 (André et al., 2017). Especies de *Clostridium* como por exemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium barati* e *Clostridium butyricum* (Remenant et al., 2015), entre outros, son causantes da contaminación de latas pasteurizadas, almacenadas en condicións ácidas pHs (4-4.5), coma as froitas en almibar ou tomate enlatado (André et al., 2017). Outras especies coma *Clostridium estertheticum*, *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium frigidicarnis*,

Clostridium gasigenes, *Clostridium algidixylanolyticum*, *Clostridium frigidum* e *Clostridium bowmanii*, asociadas a contaminacións de carne refrixerada empaquetadas en vacío, causan abundante produción de gas, hinchamento do plástico, forte olor e, perda de cor e textura da carne (André et al., 2017). Contaminacións de materias primas son comunmente asociadas a contaminacións por *Bacillus* spp. *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* son responsables en numerosas ocasións da contaminación de produtos da panificación (André et al., 2017). *Bacillus cereus* comunmente presente en aceite, grans, vexetais, arroz, ovo, leite e carne, é capaz de crecer nun rango de 4 a 50 °C (Soni et al., 2016; Tewari & Abdullah, 2015).

1.1.3 Bacterias Gram negativas contaminantes de alimentos

Moitas bacterias Gram negativas tamén relaciónanse con contaminación de alimentos. As enterobacterias teñen a habilidade de metabolizar aminoácidos en compostos volátiles, e entre elas os xéneros *Serratia*, *Hafnia* e *Yersinia* xogan un rol importante na contaminación de carnes, pescados, produtos lácteos, ovos e procesados. *Shewanella báltica* e *Photobacterium phosphoreum*, provenientes do mar contaminan pescado fresco e afumado. *Pseudomonas* spp., en particular *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fragi*, contaminan todo tipo de materias primas conservadas en condicións aerobias a baixas temperaturas (Remenant et al., 2015).

1.1.4 Bacterias contaminantes de alimentos formadoras de esporas

As bacterias formadoras de esporas son as máis resistentes e as máis comúns en alimentos tratados (Táboa 1). As esporas son capaces de resistir químicos como desinfectantes e tratamentos físicos tipicamente usados na industria alimentaria. As esporas xerminan tras o procesado dos alimentos cando as condicións son beneficiosas tanto nos produtos finais ou no sistema dixestivo producindo enfermidades gastrointestinais

Introdución

(André et al., 2017; Wells-Bennik et al., 2016). As bacterias formadoras de esporas nos alimentos clasifícanse en grupos, Bacillales eróbcos, Clostridiales, anaerobios estrictos e Thermoanaerobacterales anaerobios termofílicos. Entre os primeiros encóntranse os xéneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, e *Paenibacillus*. Dentro dos Clostridiales encóntranse os xéneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Entre os xéneros descritos dentro de Thermoanaerobacterales, están *Thermoanaerobacter*, *Acetogenium*, *Thermobacteroides*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldanaerobacter*, *Caldanaerobius* e *Gelria*. As especies máis coñecidas en contaminación de alimentos con propiedades patoxénicas son *B. cereus* e *Clostridium botulinum*, coñecidas como as grandes formadoras de esporas en alimentos onde tamén cabe destacar *C. perfringens* (André et al., 2017; Wells-Bennik et al., 2016). Por outro lado, especies como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Clostridium tyrobutyricum*, e *Geobacillus stearothermophilus* (Soni et al., 2016) producen ademais enzimas que rompen os compoñentes dos alimentos, diminuíndo o seu valor nutricional e variando sabor e olor. Cabe destacar que diferentes cepas dunha mesma especie pode producir esporas con diferentes propiedades de resistencia que outras. As especies formadoras de esporas máis resistentes ó calor son *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica*, anteriormente coñecida como *Clostridium thermoaceticum* e *Thermoanaerobacterium* spp. illadas de alimentos enlatados con baixo pH (André et al., 2017).

Táboa 1. Principais bacterias formadoras de esporas responsables da contaminación de diferentes alimentos e as súas características fisiolóxicas. Extraído e modificado de André et al. (2017). Co permiso de ELSEVIER T^a, temperatura; opt; temperatura ópima.

Alimento	Especies	Rangos de crecemento (T ^a e pH)	Resistencia ó calor
Produtos de panadería	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	15°C a 50°C, opt. 30-40°C	2,5 min a 110 °C; 2,1 min a 115 °C
	<i>Clostridium algidicarnis</i>	>4 to 37 °C, opt 25-30°C	230 min a 90°C; 5 min a 95 °C

Táboa 1. (Continuación)

Alimento	Especies	Rangos de crecemento (Tª e pH)	Resistencia ó calor
Carnes empaquetadas en vacío e refrixeradas	<i>Clostridium putrefaciens</i>	<0°C-<37°C	14 min a 80°C
	<i>Clostridium estertheticum</i>	1 °C a 15 °C	48 s a 100°C
	<i>Clostridium gasigenes</i>	1,5 °C a 26 °C, opt 20-22°C	Non resultados dispoñibles
Leite pasteurizado	<i>Bacillus</i>		
	<i>Paenibacillus</i>		
Leite esterilizado	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	0 a 50°C	6 s a 140°C
Leite deshidratado	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		3 min a 121°C
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	43 a 62°C, opt 57°C	2 min a 110°C
Leite fermentado	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<12°C a 43°C	0,053 min a 120°C
	<i>Clostridium butyricum</i>	dende 10 °C, opt 30-37°C	0,045 min a 120°C; 4,7 min a 100°C
	<i>Clostridium sporogenes</i>	<25 a >45°C, opt 30-40 °C	1,28 min a 121°C; 2,2 min a 105°C
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	25 °C a 45°C, opt 37°C	Non resultados dispoñibles
Enlatados con pH ácido	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	25°C a 60 °C, pH 2.2-5.8	1.7 min a 95°C; 2.3 min a 102°C
Enlatados con pH ácido moderado	<i>Clostridium pasteurianum</i>	límite de pH 3,5	4,31 min a 100°C; 13,6 min a 90°C; 3,8 min a 95°C
	<i>Bacillus coagulans</i>	<30°C a <61°C, opt 40-57°C pH limit 4.0	92,3 min a 110°C
Enlatados con lixeiro pH ácido	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	30°C a 70 °C	3 min a 121°C
	<i>Moorella thermoacetica</i>	1 a 65°C	10 min a 130°C

1.2 Técnicas de preservación de alimentos

Na industria dos alimentos existen variedade de tecnoloxías para a preservación dos alimentos como, procesado térmico, alta presión hidrostática, pulsos de campos eléctricos, radiación, refrixeración, secado, etc..., que úsanse individualmente ou en combinación para una maior efectividade (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Actualmente existen métodos alternativos de esterilización de alimentos como o uso de plasma atmosférico frío (gas ionizado de helio, argon, nitróxeno ou aire) e, a exposición de superficies e dos alimentos a luz ultravioleta (UVA). Sen embargo, numerosas esporas bacterianas son capaces de resistir altas exposicións a UVA (Wells-Bennik et al., 2016). Tamén existe o uso de antibacterianos e extractos naturais como aceites esenciais con compoñentes activos e propiedades antimicrobianas.

1.3 A resposta adaptativa das bacterias que contaminan alimentos

Os alimentos en ocasións son ambientes complexos nos cales as bacterias teñen que enfrontarse a condicións de estrés coma unha limitada dispoñibilidade de nutrientes, un pH adverso, alta osmolaridade, oxidación e temperaturas extremas entre outros. As bacterias adáptanse a este tipo de situacións a través de modificacións fisiolóxicas e estruturais na célula mediante a regulación da maquinaria xenética. As mutacións xenómicas estocásticas son seleccionadas positivamente e fixadas na poboación bacteriana para o seu beneficio fenotípico. Outras veces en resposta ó estrés as bacterias son capaces de regular os patróns de expresión de diversos xenes. Sistemas homeostáticos poden manter o pH dentro da célula a pesar de que o pH externo cambie mediante bombas con antiportadores de potasio-protón ou sodio-protón. Por outro lado, poden ocorrer respostas fisiolóxicas no DNA, lípidos e proteínas reguladoras que reparan o DNA e outras proteínas. Modificacións na composición das estruturas principais da célula como as envolturas, a membrana citoplasmática e a parede son tamén unha resposta ó estrés (Alvarez-Ordóñez et al., 2015).

Un exemplo de adaptación ó estrés que se produce na preservación de alimentos é *B.cereus*. Ademais de producir esporas resistentes ó calor, algunhas cepas de esta especie son psicrófilas e poden crecer en comida refrixerada. As baixas temperaturas reducen a fluidez da súa membrana aumentando a proporción de ácidos graxos nela. As baixas temperaturas tamén afectan á maquinaria da tradución inactivando a función dos mRNA. Encontrause que *B. cereus* presenta numerosas RNA helicases, proteínas que actúan en resposta a este estrés participando na biosíntese de ribosomas. Outras especies de *Bacillus* son capaces de crecer a modioño por debaixo dos -20°C . Por outro lado, un transposón proveniente de *B. cereus*, obtido mediante transferencia horizontal en cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, e *Bacillus sporothermodurans*, aporta propiedades de resistencia ó calor variando a cantidade de auga na célula (Wells-Bennik et al., 2016). Existen máis mutacións de proteínas, xenes, transposóns, toxinas e sistemas, implicados en favorecer o crecemento de *B. cereus* e outras especies a baixas e altas temperaturas (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). A toxina cereulide é unha molécula resistente a altas temperaturas e a cambios de pH, o xene codifícase nun megaplásmido virulento relacionado co plásmido pX01 de *Bacillus anthracis* (Ehling-Schulz et al., 2015; Wells-Bennik et al., 2016). Outro exemplo, é o caso da cepa *Streptococcus thermophilus* CJ18, que presenta un operón implicado no transporte de oligopéptidos que favorece a toma de péptidos e aminoácidos durante o crecemento en leite (Quigley et al., 2013).

Algúns autores describen como determinadas bacterias son capaces de crecer mellor en alimentos que nos medios de cultivo do laboratorio. Isto suxire que estas bacterias son capaces de beneficiarse das propiedades físico-químicas dos alimentos que contaminan ou empregar algún compoñente do mesmo alimento (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Os mecanismos que facilitan as bacterias crecer en ambientes que prodúcenlle estrés están directamente relacionados cos factores de virulencia, xa que é coñecido como moitos de estes mecanismos tamén están involucrados durante a infección de estas. A maioría dos factores de virulen-

Introdución

cia, son transmitidos por bacteriofagos ás bacterias hospedadoras cando son infectadas por transferencia horizontal de xenes (HGT) (Feiner et al., 2015), ademais da transferencia de plásmidos integrativos e transposóns. As bacterias que incorporan os factores de virulencia convértese en patóxenos capaces de sobrevivir con maior facilidade (Harald Brüssow et al., 2004). Máis a diante no apartado “1.5.5.1”, descríbese máis en profundidade como os bacteriofagos son capaces de modificar a capacidade de supervivencia das bacterias.

1.4 Organismos contaminantes de produtos lácteos

O leite é un alimento moi rico en nutrientes como proteínas, graxas, carbohidratos, vitaminas, minerais e aminoácidos. O leite que se consume, proven de gran variedade de animais como a vaca, cabra, ovella, búfalo e tamén humano (Figura 1). O seu alto valor nutricional, o seu pH neutro e o seu alto contido en auga, fai do leite (6.6-6.8) un ambiente ideal para o crecemento de moitos microorganismos. Moitos de estes microorganismos producen fermentacións lácticas como especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e algúns fungos. Outros microorganismos no leite que causan contaminacións son *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., e *Acinetobacter* spp., e outros microorganismos coma lactobacilli e bifidobacteria son beneficiosos para a saúde. Po lo contrario, especies de *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e fungos produtores de micotoxinas causan enfermidades (Quigley et al., 2013).

En estudos onde as mostras eran leite fresca, chegaronse a encontrar máis de 5000 esporas por mL. A literatura confirma que *B. cereus* é a especie que máis frecuentemente contamina produtos lácteos refrixerados seguido de outras especies de *Bacillus* e *Geobacillus pallidus*.

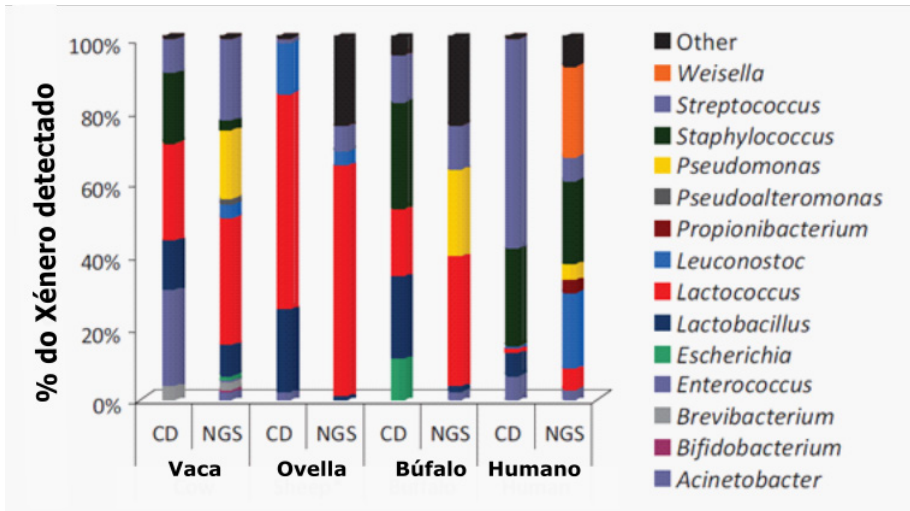


Figura 1. Abundancia relativa dos xéneros de microorganismos encontrados en leite crú. Amósanse as bacterias máis comúns en mostras de leite crú de diferente orixe animal. A gráfica, basease en numerosos estudos realizados en localizacións diferentes e empregando diferentes métodos. Os resultados dos estudos dependentes de cultivo (CD) son representados no porcentaxe total dos illados, mentres que os resultados das tecnoloxías baseadas nas novas xeracións de secuenciación de DNA (NGS) son representados no porcentaxe total de lecturas. Os resultados do leite de ovella mediante NGS foron extrapolados de datos obtidos a partir do estudo de queixos madurados, empregando leite crú. Extraído e modificado de “The complex microbiota of raw milk” Quigley et al. (2013), co permiso de Oxford University Press.

A pasteurización do leite é un tratamento no cal a temperatura elevase a 72°C durante 15 segundos, o que non destrúe as esporas de especies mesófilas ou termodúricas e estas poden crecer durante o seu almacenaxe de dous a tres semanas máis tarde. No leite pasteurizada encontrábase especies de *Sporosarcina*, *Paenisporosarcina*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus* e *Bacillus* capaces de resistir a este proceso (André et al., 2017; Ivyet al., 2012; Opal et al., 2015).

A esterilización do leite (UHT) levase a cabo a 130°C durante catro segundos, debido a unha maior temperatura que a empregada para a pasteurización (destrúe inclusive as esporas de *C. botulinicum*) as especies encontradas no leite son *Bacillus coagulans*,

Introdución

Geobacillus stearothermophilus e *B. sporothermodurans*, as cales presentan unhas esporas altamente resistentes (André et al., 2017). A leite deshidratada ou en po considérase un posible vector de esporas que xerminan no produto final. As especies que predominan son *G. stearothermophilus* e *Paenibacillus flavithermus* (André et al., 2017). Bacterias formadoras de esporas como especies de xénero *Bacillus* e *Clostridium* encontráronse en produtos lácteos incluso despois de ser pasteurizados, esterilizados, deshidratados ou fermentados (André et al., 2017).

Na fermentación de queixos só anaerobias estrictas son responsables da súa contaminación coma é o caso de especies de *Clostridium* (André et al., 2017). Outros produtos lácteos coma o leite condensado, debido a súa alta osmolaridade, pola alta concentración de azucres e a baixa cantidade de auga, dificulta o crecemento de microorganismos (Šostakienė & Blazgienė, 2010). Varias especies de *Bacillus* foron orixinalmente illadas de produtos lácteos (Coorevits et al., 2011; Miller et al., 2016), sen embargo, ata agora ningún *Bacillus* fora illado de leite condensado (Abril et al., 2019).

1.4.1 *Bacillus* spp. contaminantes de produtos lácteos

O xénero *Bacillus* comprende numerosas especies Gram positivas ou Gram variables, especies Gram positivas en fases temperás do seu crecemento e Gram negativas, presentan forma bacilar e xeralmente forman esporas. Cave destacar que é con probabilidade o xénero máis diverso, polo que presentan entre eles características fenotípicas moi diferentes. O seu principal hábitat adóitase considerar o solo, pero estudos suxiren que moi probablemente o solo teña un papel de reservorio para *Bacillus* spp. Coñécese que *Bacillus* ten a capacidade de colonizar case tódolos ambientes naturais, tan variados como aire, sedimentos de lagos, auga, salinas, augas termais ácidas, solos subantárticos, etc. (Gopal et al., 2015). A pesar da existencia de tan numerosas especies neste xénero, considéranse non patoxénicas, a excepción de *B. anthracis* e *B. cereus*.

As contaminacións da materia prima en alimentos están comunmente asociadas a *Bacillus*. As súas esporas poden soportar temperaturas próximas a os 100°C entre 10 e 56 minutos (André et al., 2017). *B. cereus* crece nun rango de 4 a 50°C, e as súas esporas son resistentes ó calor, tratamentos químicos, ácidos e radiacións ultravioleta, protóns e altas enerxías de carga iónica. Moitas cepas de *B. cereus* presentan adaptación para crecer a baixas temperaturas. Esta especie tamén produce numerosas substancias potencialmente patoxénicas como as hemolisinas, fosfolipasas, metaloproteínasas, colagenasas, betalactamasas, produción de biofilm e toxinas que resisten ó calor (Soni et al., 2016; Tewari & Abdullah, 2015). As toxinas típicas de *B. cereus* son a enterotoxina non hemolítica e hemolítica, e a endotoxina eméctica cereulide, causantes de enfermidades diarreica (Ehling-Schulz et al., 2015). Tipicamente, *B. cereus* contamina produtos lácteos refrixerados, así como o resto de especies do grupo *B. cereus* seguido de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *Bacillus smithii*. Estas especies son tamén predominantes nas contaminacións de leite pasteurizada, capaces de soportar tratamentos de 80°C durante 10 minutos. Outras especies de *Bacillus*; *Bacillus weihenstephanensis*, *B. pumilus* e *B. subtilis* illados do leite, producen tamén unha toxina similar á toxina cereulide producida por *B. cereus* (Gopal et al., 2015). Debido a situación ubicua das especies de *Bacillus*, o momento da contaminación pode ocorrer en calquera parte do procesado do leite. Ademais, unha vez o leite é contaminado por estas especies, todo o proceso seguinte verase afectado pola contaminación. Isto é debido a que as súas esporas poden adherirse ó material inerte e algunhas especies formar *biofilms*, o que fai moi difícil a súa posterior eliminación.

Bacillus thermolactis e *Bacillus wiedmannii* foron orixinalmente illados de produtos lácteos (Coorevits et al., 2011; Miller et al., 2016).

1.4.2 *Streptococcus* spp. contaminantes de produtos lácteos

O xénero *Streptococcus* consiste en bacterias Gram positivas, cocos con forma esférica u ovoide (as veces lanceolados como é o caso de *Streptococcus pneumoniae*) que forman pares ou cadeas e non forman esporas. Encóntranse amplamente distribuídos, principalmente nas mucosas de humanos e animais, sobre todo no tracto dixestivo; pero tamén encóntranse en substratos, auga, alimentos e plantas (Hardie & Whiley, 1997).

Certas especies de xénero *Streptococcus* son patóxenas e son frecuentemente illadas de produtos lácteos. Entre eles, o leite crú, cultivos *starters* naturais e callada de queixos. *Streptococcus thermophilus* é un LAB termófilo que empregase de cultivo *starter* na industria de produtos lácteos, ten a capacidade de converter rapidamente lactosa en lactato, e como consecuencia baixar o pH. Tamén produce importantes metabolitos e baixas cantidades de acetoina, diacetil e acetato. Por outro lado estudouse como *S. thermophilus* presenta xenos no seu xenoma, relacionados con factores de virulencia e outros xenos que foron obtidos por transferencia horizontal de outras bacterias que crecen tamén en produtos lácteos. Outros streptococci asociados a produtos lácteos son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis* e *Streptococcus macedonicus*. *Streptococcus macedonicus* produce características indesexables nos produtos lácteos que contamina. *S. bovis* é un patóxeno oportunista humano que en ocasións illouse de produtos fermentados (Quigley et al., 2013).

Outros streptococci detectados en leite bovina están asociados coa infección de mastite. A presenza de estes patóxenos nas mamas afecta a calidade do leite que produce, e por conseguinte a calidade do produto final. *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *Streptococcus canis* son os principais patóxenos causantes da mastite (Quigley et al., 2013; Dumke et al., 2015; Lundberg et al., 2014; Park et al., 2013; Richards et al., 2014). Tamén estudouse como *Streptococcus parauberis* (Park et

al., 2013) e *Streptococcus gallolyticus* (Dumke et al., 2015) son axentes minoritarios produtores de mastite.

1.4.3 *Staphylococcus* spp. contaminantes de produtos lácteos

O xénero *Staphylococcus* presenta unhas células Gram positivas, esféricas, comunmente formando racimos, non forman esporas e encontranse universalmente en mucosas e pel de humanos e animais.

Staphylococcus aureus é considerado o maior patóxeno contaminante de alimentos, debido a que produce serias intoxicacións alimentarias pola produción de toxinas estables ó calor, que poden resistir as temperaturas de pasteurización (Carrera et al., 2017). *S. aureus* pode ser transferida ó leite a través do equipamento, o manexo humano ou do canal da mama producindo mastite, cando a leite pasa por el (Quigley et al., 2013).

Staphylococcus caprae, *Staphylococcus capitis* ou *Staphylococcus sciuri* son especies asociadas a contaminacións de alimentos e producen patoloxías en humanos. Algunhas especies de *Staphylococcus* foron illadas do leite coma *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* (Quigley et al., 2013). Estas bacterias son tolerantes a altas concentración de sal e ambientes ácidos.

1.5 Identificación de microorganismos contaminantes de alimentos

A calidade dos alimentos e a hixiene do material é frecuentemente monitorizado realizando o reconto total de bacterias (TBC). O límite legal do TBC no leite cru son 100.000 células por mL. O control e o monitorizado de contaminantes nos alimentos tradicionalmente levase a cabo mediante técnicas de cultivo en placa con preenriquecemento, identificación morfoloxía das células ó microscopio e probas bioquímicas estandar coma os API (BioMerieux) (Logan & Berkeley, 1984), tanto para bacterias coma levaduras (Gopal et al., 2015; Rodrigues &

Introdución

Ferrari, 2018). A efectividade destes métodos depende moitas veces dos requirimentos nutricionais das especies a detectar, debido a que certas especies precisan medios e condicións moi específicas para crecer. Os métodos convencionais tamén precisan de dous a tres días e incluso ata unha semana para identificar o microorganismo, e non pódese detectar células mortas aínda cando están presentes sustancias tóxicas producidas por eles. Recentemente, outras técnicas máis rápidas, menos laboriosas, específicas e con maior sensibilidade comezaron a establecer nos laboratorios (Law et al, 2014; Rodrigues & Ferrari, 2018; Rohde et al., 2017). Técnicas baseadas en ácidos nucleicos coma as PCRs, métodos inmunolóxicos coma ELISAS e biosensores, utilízanse na actualidade para a detección de contaminantes nos alimentos (Gopal, et al., 2015). Outros métodos que comezan a emerxer e a usarse nos laboratorios, son as técnicas baseadas en espectrometría de masas coma o MALDI-TOF, os DNA microarrays, e os métodos de identificación baseados en bacteriofagos (Rohde et al., 2017).

1.5.1 Métodos baseados en ácidos nucleicos

As secuencias de DNA e RNA conteñen gran cantidade de información moi útil o cal permite identificar e discriminar entre grupos taxonómicos moi próximos filoxenéticamente. Dende mediados dos anos 80 a amplificación por PCR (reacción en cadea da polimerasa) foi a tecnoloxía máis empregada para a identificación de patóxenos en mostras de alimentos, e microorganismos en xeral. As principais vantaxes que se encontraron co seu desenvolvemento fronte as técnicas empregadas n aquel momento, foron a súa sensibilidade, especificidade e a capacidade de detección con pequenas cantidades de ácidos nucleicos na mostra (Umesha & Manukumar, 2018). Cabe destacar que o DNA non se degrada incluso en produtos procesados o que permite o seu análise en alimentos tratados ou degradados. O estudo de multitude de xenos levouse a cabo mediante esta técnica. Isto permitiu determinar aqueles que son de maior interese para a identificación de microorganismos, a si como para establecer relacións de parentesco.

Os ribosomas bacterianos constitúense de múltiples proteínas ribosómicas e tres RNAs ribosómicos esenciais para a síntese de proteínas, con almenos unha copia por xenoma e tamén presentes no xenoma mitocondrial (Xiang & Han, 2006; Wang & Qian, 2009). O xene 16S ribosomal (1483-1489 bp) é un xene moi empregado para a identificación bacteriana (Figura 2), debido a súa universalidade, a que presenta rexións moi conservadas e a súa vez rexións variables que permiten distinguir entre microorganismos próximos filoxeneticamente (Rodrigues & Ferrari, 2018). Ademais oligonucleótidos universais para a secuenciación do 16S rRNA foron deseñador por Wang & Qian (2009), e outros autores. Sen embargo, a gran homoloxía das secuencias deste xene entre certas bacterias, non permite a discriminación entre especies moi próximas, como é o caso de especies do xénero *Bacillus* (Caamaño -Antelo et al., 2015; Umesha & Manukumar, 2018).

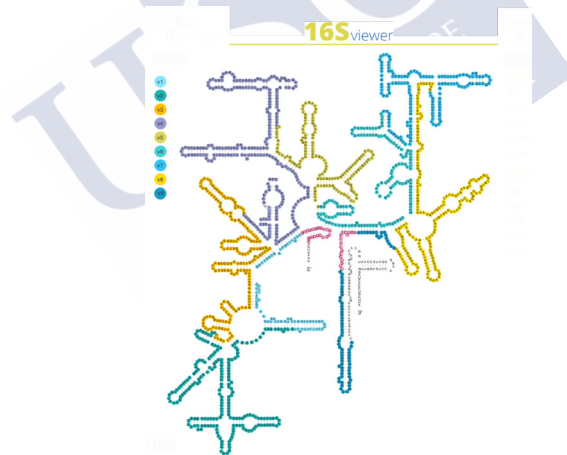


Figura 2. Imaxe do 16S rRNA ribosómico de *E. coli* K12 MG1655. Na imaxe aprecia-se a estrutura secundaria do rRNA do 16S de *E. coli* K12. En diferentes cores distínguense as nove subrexións (v1-v9), as cales no seu inicio teñen secuencias conservadas seguidas de secuencias variables. En cor rosa aprecia-se as secuencias de oligonucleótidos (8F (5'--> 3'): AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG e 1391R (5'--> 3'): GACGGGCGGTGTGTRCA (Relman & Falkow, 1992) empregados universalmente para a amplificación da secuencia. Imaxe obtida mediante o visor interactivo desenrollado por “Era7 Bioinformatics”, na páxina web http://themicrobiome.com/media/16S_viewer.cfm.

Introdución

Outro xene comunmente empregado para a identificación de bacterias despois do 16S rRNA, é o xene *gyrβ* que codifica para a subunidade β da proteína DNA girasa, unha topoisomerasa de tipo II implicada na replicación do DNA que encontrase de forma universal nas bacterias. A taxa de mutación deste xene é maior que para o 16S rRNA. A secuenciación deste xene foi empregada para estudos de filoxenia entre especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* e *Bacillus* entre outros. Ditos estudos determinaron que a comparación das secuencias de este xene é útil para establecer relación filoxenéticas e para a identificación de especies (Caamaño-Antelo et al., 2015; Wang et al., 2007).

Outros marcadores alternativos empregados na identificación de bacterias son tamén xenes universalmente conservados, coma o 23S rRNA, subunidades da ATPasa, e o xene *rpoβ* o cal codifica para a subunidade β da RNA polimerasa. O xene *tuf* codifica para o factor de elongación TU e tamén deseñaronse primers universais para a súa amplificación (Caamaño-Antelo et al., 2015). Empréganse tamén xenes de grupo específicos coma por exemplo o *pmoA* de metanotrofos (McDonald et al., 1997) ou *nirK* en bacterias nitrificantes (Cantera & Stein, 2007), xenes de virulencia coma enterotoxinas ou outros moi específicos de especie coma o xene *iap* para a identificación de *Listeria* spp. (Umesha & Manukumar, 2018).

No caso dos fungos, o cistrón eucariota consiste no 18S, 5.8S e nos xenes do 28S. Os procesos postrascriptoriais dividen o cistrón, eliminando os espaciadores internos. Os espaciadores internos ITS1 e ITS2 encontranse a ambos lados do 5.8S e empréganse constantemente para determinar relacións filoxenéticas en eucariotas (Schoch et al., 2012). Isto é debido a súa universalidade en eucariotas, a súa conservación, a baixa deriva xenética e a mesma vez o seu grado de variacións entre especies do mesmo xénero e presentar unha lonxitude adecuada para a secuenciación. Outro xene empregado para a identificación de levaduras é o xene *HIS3*, un xene conservado que presenta diferencias

entre especies moi próximas. Diversos oligonucleótidos foron deseñados para o estudo filoxenético de diversos xéneros, e diferentes especies de *Zygosaccharomyces* (Harrison et al., 2010).

Existen miles de secuencias de diferentes especies de estes xenes en bases de datos o que permite comparalas rapidamente mediante algoritmos bioinformáticos de búsqueda de secuencias similares como BLASTn (Altschul et al., 1990) para a identificación final do taxón e máis concretamente de especie e cepa.

A técnica de PCR, permitiu detectar facilmente as toxinas producidas por *C. botulinum*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus* e *E. coli O157*. Outras bacterias contaminantes de alimentos detectadas por PCR son *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Técnicas baseadas na PCR, como a múltiple PCR (mPCR) permite amplificar diferentes secuencias, usando varios oligonucleótidos a mesma vez (Umesha & Manukumar, 2018). Mediante esta técnica pode detectarse moi rápidamente a presenza de *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes* e *E. coli O157:H7* empregando cinco pares de oligonucleótidos para cinco xenes diferentes (*invA*, *16S rDNA*, *ipaH*, *hlyA* e *eaeA*). A metodoloxía de qPCR (PCR a tempo real) tamén permite identificar e cuantificar cepas de *S. aureus* que presentan o xene da enterotoxina *egc* en leite crú, *Salmonella* en froita e verdura, e *Vibrio parahaemolyticus* en pescados tropicais (Law et al., 2014). A combinación da mPCR coa qPCR permite determinar mediante multiplexqPCR a presenza de *E. coli* detectando secuencias dos xenes da toxina Shiga (*stx1* e *stx2*), a intimina (*eae*) e os xenes *wzx* (Law et al., 2014). Outro estudo presentou a metodoloxía para detectar oito contaminantes patóxenos de alimentos onde están incluídos *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli O157*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *C. jejuni*, *Enterobacter sakazakii* e *Shigella* spp. baseado na multiplexqPCR usando oligonucleótidos para detectar as secuencias dos xenes *ssaR*, *hlyA*, *rfbE*, *toxR*, *vvh*, *gyrA*, *16S rRNA* e *ipaH*. Mediante esta técnica *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, e *Vibrio vulnificus* tamén

Introdución

foron detectadas. (Law et al., 2014; Rodrigues & Ferrari, 2018). Existen numerosos kits baseados nestas técnicas coma: *Salmonella* BAXTM-PCR (DuPont Qualicon), AnDiaTec[®] *Salmonella* realtimePCRKit (AnDiaTec), ProbeliaTM, *Salmonella* sp. (Sanofi Diagnostics Pasteur), TaqManTM, *Salmonella* kit de detección (PE Applied Biosystems) e BAX[®]system Q7 real-time PCR (DuPont Qualicon), entre outros moitos para a detección de *Salmonella*. *L. monocytogenes* é outro patóxeno con gran interese en ser detectado nos alimentos e existen tamén numerosos kits para a súa identificación; BAX[®] *Listeria monocytogenes* Detection System (DuPontQualicon), TaqMan[®] *Listeria monocytogenes* DetectionKit(AppliedBiosystems), ADIAFOOD rapid pathogen detection systemfor *Listeria monocytogenes* (AES Chemunex), Probelia[®] *Listeria monocytogenes* PCR system (Biorad), Light Cycler[®] *Listeria monocytogenes* DetectionKit (Roche/Biotecon) e Gene Vision[®] Rapid Pathogen Detection System for *Listeria monocytogenes*. Existen tamén kits comerciais para a detección de outros patóxenos como *E. coli* e *Campylobacter* (Law et al., 2014).

Métodos alternativos de amplificación foron desenrolados, como a amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), a amplificación baseada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), reacción en cadea da ligasa (LCR), reacción da detección da ligasa (LDR), “*Low-Stringency Single-Specific-Primer*” (LSSCP), e Polimorfismo de Conformación de Cadea Simple (SSCP) (Umesha & Manukumar, 2018).

NASBA é unha metodoloxía na que a reacción ocorre en condicións isotérmicas, normalmente usase para a amplificación de RNA, convertido a DNA complementario mediante a transcriptasa inversa (Umesha & Manukumar, 2018). Kits comerciais coma NuclisensEasyQ[®]Basic Kit (bioMérieux) baseados na técnica de real-time NASBA empregase para a detección e identificación de *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *V. cholerae* (Law et al., 2014).

LAMP é unha técnica baseada na síntese de fragmentos longos de DNA mediante a enzima *Bst* polimerasa en condicións isotérmicas. A reacción tarda 60 minutos e úsanse 4 oligonucleótidos xerando secuencias de distinto tamaño formando estruturas con múltiples bucles. Diferentes tipos de ensaio baseados en LAMP foron desenrolados como é o múltiples LAMP, transcrición inversa LAMP, real-time LAMP e *in situ* LAMP. Debido a súa sensibilidade e rapidez de análise, existen kits comerciais que empréganse para a detección de especies de *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Shigella* e a verotoxina producida por *Escherichia* (Law et al., 2014).

Tras a amplificación, as plataformas de secuenciación e as técnicas nas que baséanse tamén están implicadas na correcta identificación dos contaminantes de alimentos. A tecnoloxía de secuenciación de Sanger (Sanger & Coulson, 1975) foi a primeira empregada polos investigadores, sen embargo, existen as novas xeración de secuenciación (NGS) que presentan importantes vantaxes fronte a secuenciación de Sanger, entre elas, a posibilidade da secuenciación do xenoma completo. As NGS son capaces de xerar gran número de lecturas nunha soa reacción, permitindo unha detección masiva de material xenético en pouco tempo e a baixo coste (Rodrigues & Ferrari, 2018). As plataformas da segunda xeración son *454 pyrosequencing* (Roche Applied Science, Basel, Switzerland), *Illumina/Solexa Genome Analyzer* (Illumina, San Diego, CA), *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection* (SOLiD) (Applied Biosystems, Foster City, CA) e *HeliScope Single Molecule Sequencer* (Helicos BioSciences, Cambridge, MA). A plataforma 454, *Illumina*, e *SOLiD* precisan de produtos amplificados previamente para a súa secuenciación, mentres que a plataforma *HeliScope* non require amplificación previa, sen embargo ten maior taxa de error. A terceira xeración deste tipo de plataformas pretende mellorar aínda máis e eliminar, as limitacións da segunda xeración de NGS. Estas plataformas son *Pacific Biosciences real-time single-molecule sequencing* (PacBioRS), *Compe-te Genomic's combined pro anchor hybridization and ligation* (cPAL) e *Ion Torrent of Life Technologies. Inc.* *Pacific Biosciences* permite seguir

Introdución

o proceso de secuenciación dos nucleótidos marcados con fluorescencia polo que non require de PCR previa e o tamaño de lectura é moi longo (8000bp), sen embargo, ten una alta taxa de error e é moi custoso. *Com-pete Genomic's combined pro anchor hybridization and ligation* (cPAL), deseñado para a secuenciación xenómica, ten unha moi alta precisión, gran produtividade e baixo coste, aínda que o proceso é moi laborioso debido ó corto tamaño das lecturas (28-100bp). Por último, *Ion Torrent of Life Technologies*, presenta o maior número de lecturas (4-80 millóns), pero precisa maior tempo de análise, presenta tamaños curtos de lectura (200-400bp) e problemas no ensamblaxe das secuencias.

Outras técnicas baseadas en ácidos nucleicos non precisan da secuenciación das secuencias para a identificación de microorganismos. A metodoloxía RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é un método moi sinxelo no que as enzimas de restrición sobre o xenoma xeran un patrón de bandas característico de cada especie. Esta técnica en combinación con PCR, usouse para a determinación de *Staphylococcus* e *Listeria* spp. Outra técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) máis complexa baseada en RFLP e acoplada a un analizador automático laser de fluorescencia permite identificar hasta nivel de cepas (Umesha & Manukumar, 2018). A hibridación fluorescente *in situ* (FISH) permite detectar directamente as células marcadas no microscopio de fluorescencia. FISH en combinación con citometría de fluxo permitiu de forma rápida detectar patóxenos como *Chlamydia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Outras técnicas baseadas en hibridación de ácidos nucleicos coma LiPA (*Line probe assay*), HPA (*Hybridization Protection Assays*) ou PNA (*Peptide Nucleic Acid*) (Umesha & Manukumar, 2018) empréganse para detectar microorganismos.

Outra técnica para a identificación de microorganismos baseada en ácidos nucleicos e a hibridación son os *microarrays* de DNA. Estes, están constituídos por unha colección de oligonucleótidos curtos, longos ou amplicóns de PCR, capaces de detectar pequenas secuencias de cen-

tos de xenes para unha mesma mostra a vez nunha placa de cristal ou silicona. Os fragmentos dos ácidos nucleicos da mostra son marcados con fluorescencia e posteriormente desnaturalizados. Estes fragmentos hibridan co seu oligonucleótido específico e finalmente pódese detectar a presenza do fragmento por a emisión da fluorescencia. *Softwares* específicos úsanse para a conversión da imaxe nos datos da expresión dos xenes (Law et al., 2014; Rodrigues & Ferrari, 2018; Umesha & Manukumar, 2018). Mediante esta técnica estudouse a detección de *Shigella* spp. e diferentes serotipos de *E. coli*. Un *microarray* foi deseñado para a detección de vinte dous contaminantes de alimentos entre eles; *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp., e *B. cereus*. *Microarrays* de DNA comerciais están dispoñibles, sen embargo, maiormente son deseñados para a análise da expresión de xenes. O *microarray* comercial StaphyChips® de Affymetrix e *Advanced Array Technology* é capaz de detectar quince especies de *Staphylococcus* incluíndo *S. aureus* resistentes a meticilina (Law et al., 2014).

Táboa 2. Técnicas de detección de patóxenos baseadas en ácidos nucleicos. Comparativa das técnicas de detección de microorganismos patóxenos contaminantes de alimentos, o seu límite de detección e o tempo de detección. Extraído e modificado de Umesha & Manukumar (2018). Co permiso de Taylor & Francis Academic Journal. CFU, unidade formadora de colonia; h, horas; min, minutos.

Método de detección	Microorganismo	Límite de detección	Tempo de detección
PCR Múltiple	<i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Yersinia</i>	10 ³ CFU/mL	24 h
PCR a tempo real	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>Salmonella</i> spp.	2 x 10 ² CFU/mL	24 h
	<i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i>	9.6 CFU/g	< 8h
	<i>Shigella</i>	2.0 CFU/g	< 8h

Introdución

Táboa 2. (Continuación)

Método de detección	Microorganismo	Límite de detección	Tempo de detección
NASBA	<i>Escherichia coli</i>	40 células/mL	4 h
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	101 CFU/ reacción	26 h
	<i>L. monocytogenes</i>	400 CFU/mL	72 h
	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus cereus e Bacillus circulans</i>	-	-
	<i>Salmonella enteritidis e Salmonella typhimurium</i>	<10 CFU/mL	< 90 min
LAMP	<i>Salmonella spp. e Shigella spp.</i>	5 CFU/10 mL	< 20 h
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10 CFU/ reacción	16 h
DNA microarray	<i>L. monocytogenes</i>	8 logCFU/mL	-
	<i>E. coli, Shigella spp., Salmonella spp., Proteus spp., C. jejuni, Listeria faecalis, Yersinia enterocolitica, V. parahaemolyticus, Vibrio fluvialis, b-hemolytic Streptococcus e S. aureus</i>	10 CFU/mL de cultivo puro	-

1.5.2 Métodos baseados en biosensores

Un biosensor é un dispositivo o cal converte unha sinal biolóxica en outra eléctrica e medible. Un biosensor consiste en dous elementos, o bioreceptor capaz de recoñecer ó analito, e o transdutor. O bioreceptor pode ser tanto enzimas, coma ácidos nucleicos, anticorpos ou receptores celulares, e ata polímeros. O transdutor é capaz de converter a sinal das interacción biolóxicas en sinais medibles (Umesha & Manukumar, 2018) (Figura 3). Os biosensores con sinal óptica baseados en resonancia plasmónica de superficie (SPR) son os máis comunmente empregados para a detección de patóxenos alimenticios. Existen biosensores ópticos comerciais coma o SPREETA biosensor para a detec-

ción de *E. coli* O157:H7 en leite, zumes de froitas e en carne picada. O seu límite de detección e de 10^2 - 10^3 UFC/mL. SPREETA biosensor tamén é capaz de detectar *Salmonella*. Outro kit comercial é BIACORE 3000 capaz de detectar *L. monocytogenes* cun límite de detección de 1×10^5 cells/mL. Biosensores con sinal electroquímica detectan con éxito *B. cereus* presentes en froitas e verduras cun límite de detección de 35-88 UFC/mL, *S. aureus* cun límite de 1 UFC/mL en dous horas, *E. coli* cun límite de detección de 10^1 - 10^7 UFC/mL. Foi publicado como mediante un biosensor potenciométrico, baseado en anticorpos foise capaz de detectar 10 células /mL de *E. coli* en vexetais (Law et al., 2014). Outros biosensores baséanse na detección de pequenos cambios na masa empregando un cristal piezoeléctrico o cal vibra a determinada frecuencia cando é inducido por unha sinal eléctrica. Neste caso os bioreceptores inmobilízanse no cristal e cando os analitos únense ó receptor, mídese un cambio de masa na superficie do cristal, mediante a modificación da frecuencia de vibración que se produce. Este tipo de biosensores non son os máis empregados para a detección de patóxenos contaminantes de alimentos, sen embargo, existen estudos onde detéctanse *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *E. coli* (Law et al., 2014).

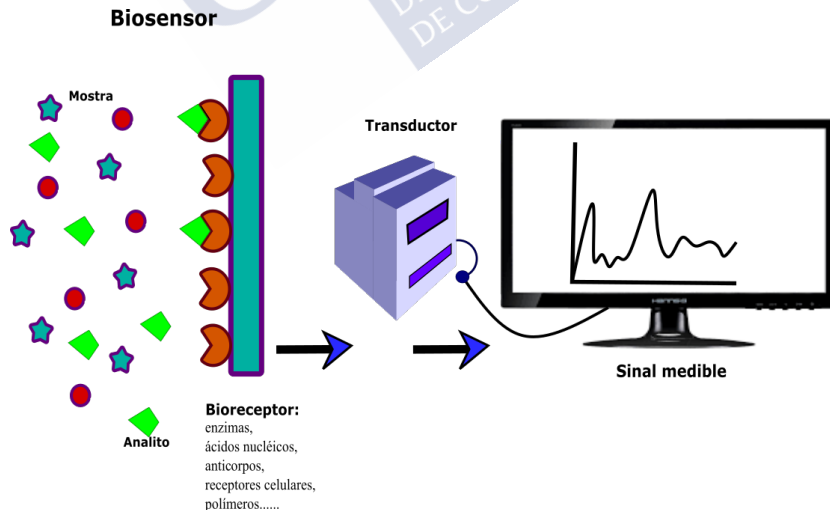


Figura 3. Imaxe esquemática dos dispositivos baseados en biosensores.

1.5.3 Métodos inmunolóxicos

A sensibilidade e especificidade dos métodos baseados nas interacción anticorpo-antíxeno, dependen da súa resistencia de unión. Por outro lado a efectividade destas técnicas tamén dependen da dispoñibilidade do analito a detectar, que nalgúns casos dependen do estadio das células e se están vivas ou mortas; cosa que non ocorre cos métodos baseados en ácidos nucleicos (Law et al., 2014; Rohde et al., 2017). As técnicas máis empregadas para a detección de patóxenos contaminantes de alimentos, son o ensaio de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) e o inmunoensaio de fluxo lateral.

O *sandwich* ELISA é a técnica ELISA máis efectiva para a detección desde tipo de patóxenos, e os antíxenos con especificidade fronte ós anticorpos primario e secundario, son as propias células bacterianas ou toxinas bacterianas. Diseñouse a detección do patóxeno *V. parahaemolyticus*, mediante *sandwich* ELISA fronte a hemolisina relacionada con TDH (TRH). Tamén existe un kit comercial BIOLINE *Salmonella* ELISA, para a detención de *Salmonella* en produtos alimenticios. ELISA é comunmente usada para a detección de outras toxinas presentes nos alimentos, coma as toxinas α , β , e ϵ , de *C. perfringens*, as enterotoxinas A, B, C e E de *Staphylococcus*, toxinas botulínicas e enterotoxinas de *E. coli*. Outros sistemas ELISA, automáticos de alto rendimento como VIDAS (sistema de inmunodiagnos VITEK) de BioMerieux e Assurance® EIA (inmunoensaio enzimático) de Biocontrol, encóntranse dispoñibles para a detección de patóxenos contaminantes de alimentos. VIDAS baseado en ELISA, empregando enzimas con fluorescencia presenta unha moi alta sensibilidade e pode completar os ensaios entre 45 minutos e dous horas. O dispositivo realiza automaticamente o ensaio, analiza os resultados e os interpreta como positivos ou negativos. VIDAS permite detectar *Salmonella* en froitas e vexetais; *L. monocytogenes* en pescado, porco, ternera, froitas e vexetais; *E. coli* O157:H7 en queixos froitas e vexetais; *Campylobacter* spp. en froitas e vexetais; e, enterotoxinas de *Staphylococcus* en leite e queixo. Por outro

lado, tamén existes kits comerciais de Assurance® EIA para a detección de *Salmonella*, *E. coli*, O157:H7, *L. monocytogenes*, e *Campylobacter* (Law et al., 2014; Rohde et al., 2017).

A técnica do inmunoensaio de fluxo lateral, é moi sinxela, rápida e non precisase ningún instrumental específico. A mostra migra ó longo do inmunoensaio por capilaridade, e o unirse ó anticorpo ou antíxeno marcado e fixado na membrana, pode apreciarse visualmente o resultado positivo en presenza de cor. Deseñáronse tiras inmunocromatográficas para a detección de *E. coli* O157 empregando oro coloidal como marcador das partículas. Outros patóxenos que detectáronse mediante esta técnica son *S. aureus*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni*. Están dispoñibles test inmunocromatográficos comerciais para a detección de patóxenos contaminantes de alimentos como Reveal® test kits (Neogen) para *Listeria*, *Salmonella* e *E. coli* O157, VIP®GOLD™ (BioControlSystems) para *Listeria*, *Salmonella*, e *E. coli*, e o kit DuPont™ Lateral Flow System (DuPontQualicon) para *Listeria* (Law et al., 2014; Rohde et al., 2017).

Outros métodos baseados na inmunoloxía son acoplados a outros para a detección dun patóxeno; este é o caso da detección de enterotoxinas de *Staphylococcus* por separación inmunomagnética (IMS) con perlas magnéticas unidas a anticorpos acoplada a MALDI-TOF/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) e tamén IMS acoplado a citometría de fluxo para a detección de *L. monocytogenes* (Umesha & Manukumar, 2018).

1.5.4 Métodos de espectrometría de masas

A espectrometría de masas é unha metodoloxía recente que estase a desenvolver moi rapidamente, permite unha rápida identificación de especies e incluso é capaz de discriminar entre subespecies e cepas. A parte da identificación de patóxenos en contaminación de alimentos, ten moitas máis aplicacións coma no control de calidade de auga e no

Introdución

diagnóstico rápido de enfermidades infecciosas. Outra aplicación de interese é o descubrimento de biomarcadores que permiten novas vías de identificación de microorganismos, e incluso establecer relacións entre organismos próximos (Cheng et al., 2016).

Mediante a espectrometría de masas pódese detectar e cuantificar ínfimas cantidades de pequenas moléculas, pequenos péptidos ou proteínas enteiras en complexas mesturas (Silva, 2018). A espectrometría de masas consiste nunha fonte de ións, un analizador ou filtro de masas onde analitos ionizados sepáranse polo seu ratio masa/carga (m/z) e finalmente o detector que amplifica e rexistra a sinal dos ións cos valores da súa m/z (Aebersold & Mann, 2003). A previa separación de proteínas pode realizarse mediante xel de electroforese bidimensional (2-DE), cromatografía de gas (GC), cromatografía líquida de alto rendemento (HPLC) seguido da detección de proteínas mediante a espectrometría de masas (MS). A identificación das proteínas ten lugar mediante a comparación de espectros de mapeo peptídico (PMF) ou dos espectros de fragmentación de péptidos apartir da información de bases de datos. Uniprot (<http://uniprot.org>) é unha base de datos de secuencias proteicas cos datos de Swiss-Prot, TrEMBL e PIR-PSDSSwiss-Prot. Para a identificación de peptidos e proteínas empreganse programas de busca como SEQUEST e MASCOT.

A espectrometría de masas empregada para a detección de patóxenos comunmente é MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) para a identificación dos patrón peptídicos “*fingerprint*” específicos de microorganismos, e LC-MS/MS (Liquid chromatography–mass spectrometry). LC-MS/MS empregase na identificación de biomarcadores peptídicos de microorganismos, para a secuenciación de péptidos e proteínas, e a identificación e cuantificación doutras moléculas de interese (Cheng et al., 2016; Silva, 2018). Un tipo de LC-MS/MS moi empregado é ESI-MS. ESI (*Electrospray ionization*) ioniza os analitos en disolución, ó contrario que a técnica de ionización MALDI, que cristaliza os analitos

nunha matriz (Figura 4). ESI-MS é máis empregado para a análise de mostras complexas (Aebersold & Mann, 2003).

Espectrometría de masas:



Fonte de ións:

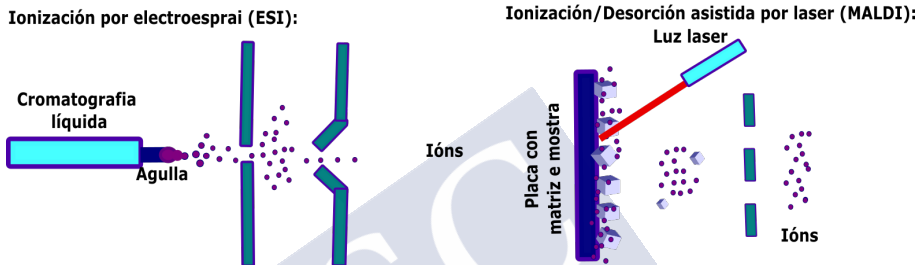


Figura 4. Imaxe esquemática da espectrometría de masas e das fontes de ións ESI e MALDI. Tanto MALDI como ESI son técnicas de ionización suaves e permiten a identificación de grandes moléculas incluíndo a identificación de proteínas enteiras (*top-down*) ou de péptidos obtidos da dixestión de proteínas (*botton-up*).

Existen catro tipos básicos de analizadores de masas empregados comunmente nos laboratorios, o analizador de trampa iónica (IT), tempo de voo (TOF), o cuadrupolo e a resonancia ciclométrica de iones de transformada de Fourier (FT-MS). MALDI é comunmente acoplada a un analizador TOF o cal mide directamente as masas dos péptidos ou proteínas ionizadas. Por outro lado, ESI é comunmente acoplado a IT onde prodúcese a fragmentación dos ións precursores seleccionados por CID (*Collision-induced dissociation*). Varios analizadores poden encontrarse acoplados en tamden co obxectivo de tomar as vantaxes de cada un deles. Esta combinación permite a selección dun tipo de ións no primeiro analizador e fragmentalos no segundo. Recentemente, podese acoplar a MALDI un IT e dous tipos de TOF, permitindo a fragmentación dos ions (MALDI-TOF-TOF) entre o primeiro TOF híbrido e o segundo analizador TOF (Figura 5).

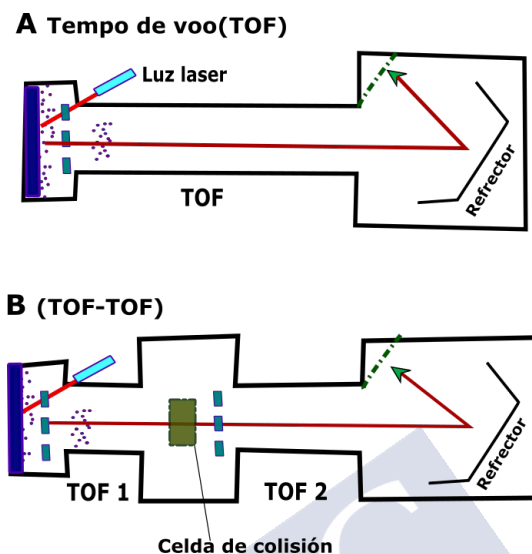


Figura 5. Imaxe esquemática de MALDI acoplada a TOF (MALDI TOF) e a TOF-TOF (MALDI TOF-TOF). A, Os ións son acelerados e separados ó longo do tubo segundo as súas velocidades. A traxectoria dos ións é modificada por un reflector e o detector amplifica a sinal e cuantifica a chegada dos ións. B, O instrumento TOF-TOF presenta unha celda de colisión entre os dous TOF. No primeiro TOF os ións son seleccionados, seguidamente fragmentados e separados no segundo TOF.

Aínda que o patrón de picos xerado por CID proporciona información sobre as secuencias peptídicas, MALDI séguese empregando principalmente para a obtención de patróns péptidicos “*fingerprint*” xa que LC-ESI-IT permite de forma automática analizar mesturas máis complexas de péptidos con moi alta sensibilidade (Aebersold & Mann, 2003). Bruker Daltonics, Thermo Fisher Scientific e SCIEX entre outros, ofrecen sistemas comerciais coas súas propias librerías. Sen embargo, os costes dos aparatos son elevados e o límite de resolución e a detección de mestura de cepas na mostra aínda é un desafío que estase a solucionar. Por outro lado a rapidez dos métodos de análise e o baixo coste na metodoloxía empregada fan que o número de publicacións en diferentes aspectos do seu uso en clínica para a identificación de microorganismos aumentara exponencialmente nos últimos anos (Siller-Ruiz et al., 2017).

1.5.4.1 MALI-TOF MS

MALDI Byotyper de Bruker e VITEK MS de Biomerieux, ambos, son plataformas de espectrometría de masas MALDI-TOF MS e empréganse na identificación de cepas descoñecidas nos procedementos normalizados para a detección de patóxenos alimentarios (Doern & Butler-Wu, 2016). Os extractos proteicos ou mesmo unha pequena porción do cultivo celular son directamente ionizados sen previa dixestión con proteasas. As mostras son normalmente tratadas con algún solvente orgánico coma ACN (acetonitrilo) ou TFA (trifluoroacetico) e un ácido coma o ácido fórmico. Seguidamente cristalizase coa matriz e cargase na placa de detección. A mostra é ionizada con láser, xerando ións cargados. A matriz encárgase de protexer as proteínas absorbendo parte da enerxía. As proteínas cargadas encóntranse aceleradas nun campo eléctrico e desprazanse ata o detector segundo a súa masa e carga. As masas (m/z) son medidas obtendo un patrón de masas “*fingerprint*” para cada especie ou cepa analizada (Figura 5). Os espectros compoñense de picos nun rango de 1000 a 30.000 m/z . As proteínas ionizadas por MALDI-TOF, por conseguinte son analizadas xerando o patrón de picos que principalmente son as proteínas ribosomais e tamén outras como, proteínas de unión a ácidos nucleicos e proteínas de choque térmico. O patrón obtido compáranse cos perfís das bases de datos para a identificación do perfil con maior similitude. Os perfís obtidos son únicos de cada bacteria, obtendo picos específicos sobre todo de xénero, pero tamén de especie e cepa (Cheng et al., 2016; Nomura, 2015; Rohde et al., 2017).

MALDI-TOF é utilizado tamén para obter o “*fingerprint*” da masa dos péptidos tras empregar proteasas para a dixestión de proteínas. As proteínas son normalmente enriquecidas previamente mediante xel de electroforese ou cromatografía antes de ser dixeridas. Os espectros obtidos compáranse cos espectros teóricos dos péptidos segundo a proteasa empregada para a dixestión das proteínas (Cheng et al., 2016). Outra forma de análise dos péptidos é fragmentando as proteínas ionizadas, por CID no mesmo MALDI-TOF-TOF MS (Fagerquist, 2017).

Introdución

Existen precedentes no emprego de MALDI-TOF para a análise e caracterización de microorganismos contaminantes de alimentos. Exemplo disto son os estudos en especies dos xéneros *Aeromonas*, *Acrobacter*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Bacillus* (Branquinho et al., 2014; Lasch et al., 2009; Starostin et al., 2015) e especies da familia *Enterobacteriaceae* (Cheng et al., 2016; Stephan et al., 2011). Mazzeo et al., 2006, inclúe estudos en especies de *Escherichia*, *Yersinia*, *Proteus*, *Morganella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc* e *L. monocytogenes* en carne e vexetais (Cheng et al., 2016). Tamén levaronse a cabo estudos en contaminacións de mariscos (Böhme et al., 2011; Böhme et al., 2012b; Böhme et al., 2013). Moitas outras especies Gram negativas, fora do ámbito alimentario como especies dos xéneros *Francisella*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* foron estudadas para a súa identificación por MALDI-TOF MS. Tamén outras especies Gram positivas coma especies de *Micrococcus*, *Gemella* e *Rothia*. A identificación de micobacterias e fungos foi estudada tamén, pero é máis complexa debido a heteroxeneidade dos patróns entre especies próximas (Siller-Ruiz et al., 2017). Toxinas como a toxina Shiga, e a toxina botulínica en carne e leite identificouse tamén por MALDI-TOF-TOF MS. Empregouse tamén MALDI-TOF para obter o patrón “*fingerprint*” das masas de ácidos graxos de bacterias (Cheng et al., 2016), e recentemente publicouse a detección de metabolitos de resistencia a antibióticos coma β -lactamasas (Doern & Butler-Wu, 2016). Recentes estudos foron capaces de detectar picos específicos por MALDI-TOF MS que permiten distinguir entre *S. aureus* con e sen resistencia a meticilina, e enterococcos con e sen resistencia a vancomicina. Estes estudos determinan que o emprego de MALDI-TOF MS permite incluso a identificación de patóxenos con determinadas resistencias (Fagerquist, 2017).

Existen varias bases de datos privadas como o “*Spectral Archive And Microbial Identification System*” (Saramis TM; AnagnosTec GmbH, Potsdam, Germany) e “*Microbelynx bacterial identification*

system” (Waters Corporation, Manchester, UK); e as propias bases de datos das empresas comerciais como “*MALDI Biotyper 2.0*” (Bruker Daltonic). Bases de datos publicas están dispoñibles para acceder libremente ós perfís característicos de especies contaminantes de alimentos, pero estas bases de datos inclúen só certos perfís de especies patóxenas. Actualmente estase a desenrolar unha base de datos na que colabora a Universidade de Santiago de Compostela chamada “*SpectraBank database*” (www.spectrabank.org, www.spectrabank.eu, www.spectrabank.es) (Böhme et al., 2012a) centrada en especies potencialmente presentes en alimentos, na que pretendese reunir información dos espectros “*fingerprint*” de microorganismos cun método establecido. Un protocolo estandarizado é importante para a obtención de resultados reproducibles.

1.5.4.2 LC-MS

As secuencias peptídicas obtense mediante os sistemas LC-MS/MS. A extracción proteica completa ou fraccións específicas son dixeridas con proteasas como a tripsina ou a quimiotripsina. Previamente, a redución dos enlaces disulfuro da proteína levase a cabo con axentes reductores como o DTT (ditiotreitól) e os grupos tiol son alquilados con, por exemplo iodamida para previr a nova formación de enlaces disulfuro (Silva, 2018). No LC-MS/MS, os péptidos son separados por cromatografía líquida, posteriormente son ionizados, fragmentados por CID (Disociación inducida por colisión) e finalmente detectados (Figura 6). As masas péptídicas son analizadas e comparadas fronte as bases de datos para a asignación da secuencia a cada péptido identificado (Cheng et al., 2016). O sistema LC-MS-MS tamén permite identificar e cuantificar unha proteína a estudo (Figura 6). Os ións cargados de interese son seleccionados por un cuadrupolo e seguidamente fragmentados (Cheng et al., 2016).

Determinouse mediante LC-MS-MS a presenza de varias toxinas como las toxinas Shiga, botulínicas, enterotoxinas de *S. aureus*, as dous

Introdución

principais toxinas de *C. difficile*, toxinas de *B. anthracis* e outras. Outro estudo determinou os péptidos específicos para distinguir entre as especies do grupo *B. cereus*, baseándose na comparativa dos seus perfís proteómicos (Pfrunder et al., 2016). O perfil proteómico analizado mediante LC-MS-MS de *S. aureus* foi tamén publicado (Carrera et al., 2017). Ademais, mediante LC-MS tamén podense detectar metabolitos producidos por determinados patóxenos, o cal permite a súa identificación (Silva, 2018).

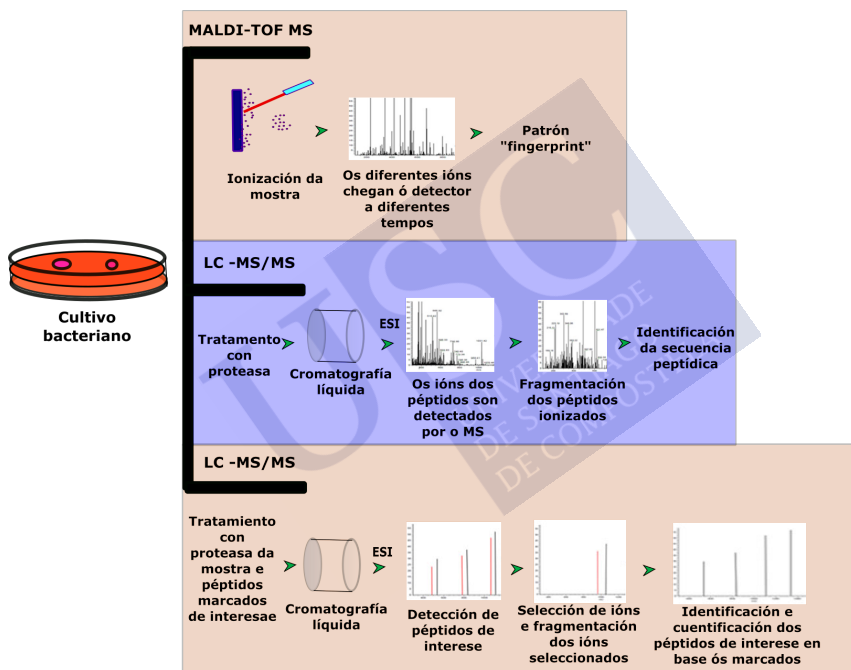


Figura 6. Técnicas de espectrometría de masas empregadas comúnmente na identificación e tipado de bacterias. Modificado de Cheng et al. (2016).

1.5.4.3 Perspectivas de futuro dos espectrometros de masas

As técnicas espectrométricas coma o MALDI TOF MS e LC-MS/MS, son rápidas, precisan de pouco material, son tamén moi específicas, sensibles, precisas e reproducibles. A súa reprodutibilidade e o uso

de programas informáticos para a análise dos resultados evita moitos erros humanos que poden producirse por exemplo, nas lecturas de probas fenotípicas ou visualizacións ó microscopio. Existen poucos límites nas posibilidades das mostras que pódense analizar. Permiten a identificación de microorganismos pola detección de perfís únicos de masas e múltiples biomarcadores. Estes biomarcadores son estudados previamente por ditas metodoloxías que posteriormente poden ser reproducidas para a identificación dos microorganismos.

O uso de biomarcadores proteicos provenientes de perfís proteómicos de MALDI-TOF é limitado xa que os picos dos espectros pertencen maiormente a proteínas ribosomais (Fagerquist, 2017). Por outro lado, empregando espectrofotómetros de masas con maior resolución, coma o LC-MS-MS permite xerar cantidades enormes de información sobre a proteómica dunha especie a estudo, e tras a análise dos datos pódense establecer novos biomarcadores específicos de xénero, especie e incluso cepa (Calo-Mata et al., 2016; Carrera et al., 2017; Pfrunder et al., 2016). Existe un continuo esforzo en mellorar a sensibilidade e resolución dos aparatos empregados; a si como no deseño de *softwares* que integren a xenómica na análise dos datos proteómicos e faciliten a interpretación dos resultados.

1.5.5 A co-evolución entre bacterias e bacteriofagos: identificación bacteriana mediante métodos baseados en fagos

1.5.5.1 Interaccións entre bacterias e bacteriofagos

Tanto os bacteriofagos coma as bacterias son as entidades máis abundantes e diversas en canto a súa xenética, debido a súa elevada taxa de mutación e os curtos tempos de xeración. A interacción entre fagos e bacterias é unha co-adaptación que permítelles unha co-evolución moi rápida e dinámica a cal xera en parte a conversión de bacterias inocuas en patóxena (Koskella & Brockhurst, 2014).

Introdución

Os bacteriofagos atemperados integran o seu xenoma nos cromosomas das bacterias, isto pode beneficiar ó hospedador bacteriano proporcionándolle novas funcións ou por outro lado interrompendo xenes e a súa expresión (Fortier & Sekulovic, 2013). A transdución mediada por fagos, permite tamén transferir xenes dunha bacteria doadora á receptora. As excisións e integracións méanse polas DNA recombinasas dos bacteriófagos (Menouni et al, 2015). Coñécese que fagos relacionados ocupan o mesmo lugar no xenoma das bacterias. Nunha cepa dunha mesma especie, un mesmo lugar xenómico pode estar ocupado por un fago, e noutra por o xenoma de outro fago diferente, ou vacío (Canchaya et al., 2004). Algúns fagos poden integrar aleatoriamente o seu xenoma nos cromosomas das bacterias, coma o fago Mu (o único requerimento é que o xene non este sendo expresado). Isto pode incrementar a variabilidade da poboación bacteriana (Feiner et al., 2015). O termo “lisoxenia activa” é empregado cando os fagos atemperados intégranse nos xenes funcionais das bacterias, e os fagos cooperan coa bacteria hospedadora para regular a expresión dos xenes interrompidos mediante varios mecanismos como factores de transcripción, sRNAs, reestruturación do DNA e outros (Argov et al., 2017). Por outro lado, o termo “conversión lisoxénica” ocorre cando os bacteriofagos codifican determinados factores que melloran a supervivencia dos seus hospedadores bacterianos. Neste caso as bacterias convértense en patóxenos. A adquisición de factores de virulencia nas bacterias ocorre maioritariamente por transferencia horizontal de xenes (HGT) transferidos por bacteriófagos (Feiner et al., 2015). A transferencia horizontal de xenes é a principal responsable da maioría das diferencias xenómicas intraespecie, e os bacteriofagos son os maiores contribuídores na diversificación do xenoma das bacterias, a parte dos plásmidos integrativos e os transposóns (Canchaya et al., 2004).

A co-evolución entre fagos e bacterias demostrouse pola presenza de factores de virulencia provenientes dos bacteriofagos que os infectan e permite ás bacterias infectar as células mamíferas. Algúns exemplos son as toxinas coma as toxinas de *S. aureus*, toxinas butilínicas, shiga,

toxinas del colera e diphteria entre outras. Outros factores de virulencia provenientes de fagos son, factores que promoven a adhesión, colonización, a resistencia e evasión do sistema inmune de células que infectan e tamén factores de transcrición que regulan xenes bacterianos. Publícase coma os bacteriofagos que son partículas negativamente cargadas estaban involucrados na formación de *biofilm* en *P. aeruginosa* cando inducían lise. Tamén encontrouse un xene codificado en bacteriofagos atemperados homólogo ó xene *Arg* implicado no *quorum sensing*. Reportouse tamén que fagos coñecidos de *S. aureus* codifican xenes de factores de virulencia encontrado en especies de *Staphylococcus* como a citotoxina de Pantón-Valentine leucocidina, staphyloquinasa, enterotoxinas, proteínas inhibitorias de quimitotaxis, ou toxinas exfoliativas. Outro exemplo da regulación fáxica na virulencia do hospedador bacteriano é a do fago atemperado ϕ 10403S cando integrase no xene *comK* de *L. monocytogenes*, permitindo neste caso impedir que a bacteria sexa fagocitada polos macrofagos durante a infección. A bacteriocina Colb da cepa SL 1344 de *S. enterica* é liberada cando prodúcese a lisis da célula liberando a mesma vez os fagos atemperados que encontráanse tamén no seu xenoma. A distribución e localización dos profagos nos xenomas bacterianos non é homoxénea, pero son abundantes en bacterias patóxenas. Bacterias que conteñen seis ou máis bacteriofagos no seu xenoma son comunmente patóxenas. A orientación para a integración xénica dos fagos é preferentemente o mesmo sentido ca dos xenes e a perda das secuencias adquiridas é tan posible como a súa integración, e leva a restrinxir a fixación dos xenes fáxicos beneficiosos para a bacteria (Canchaya et al., 2004).

As interaccións entre bacterias e os seus bacteriofagos non están limitadas só á virulencia, xa que tamén foron reportados casos de beneficios ecolóxicos entre fagos e bacterias. Un exemplo disto é o caso de *Shewanella oneidensis*, unha bacteria anaerobia psicotrópica que adapta-se a baixas temperaturas por excisión dun profago integrado no xene *ssrA*. Baixo temperaturas máis altas a bacteria silencia a excisión. A si como o xene *cI* reprime os xenes líticos nos bacteriofagos atemperados,

Introdución

coñécese que tamén pode reprimir xenes bacterianos. Un exemplo é como o xene *PckA* requirido para a gluconeogénesis é reprimido por cI do fago λ en *E. coli*. Tamén foi reportado que en sentido *upstream* do xene *PckA* existen secuencias con diferentes homoloxías ó operador (lugar de unión) do represor cI do fago λ (Argov et al., 2017).

Outros eventos involucrados na co-evolución entre bacteriofagos e bacterias son as illas patoxénicas e as illas cromosómicas relacionadas con fagos (PRCIs). Coñécese a existencia de illas patoxénicas derivadas de bacteriofagos no cromosoma de *E. coli* (EHEC) O157 enterohemorraxica (Argov et al., 2017; Feiner et al., 2015). CRISPR (Repeticións Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente interespa-ciadas) compóñense de repeticións de DNA separadas por espaciadores non repetidos de tamaño conservado que asócianse con nucleasas Cas formando o sistema CRISPR/Cas, o cal proporciona funcións adquiridas de inmunidade a bacterias fronte fagos líticos e plásmidos. Os fagos poden transportar CRISPR/Cas para insertar unha illa cromosómica na bacteria hospedador. Estudouse que especies de *Streptococcus* como *Streptococcus pyogenes*, *S. thermophilus* e *S. agalactiae* conteñen no seu xenoma sistemas CRISPR/Cas con fragmentos de orixe viral (Koskella & Brockhurst, 2014; Lopez-Sanchez et al., 2012).

Os bacteriofagos tamén adquiren secuencias beneficiosas procedentes de bacterias e as integran no seu xenoma como ocorre coas metiltransferasa que confirenlle protección fronte as REAsas dos seus hospedadores bacterianos (Murphy et al., 2013).

A gran especificidade dos bacteriofagos cos seus hospedadores e a co-evolución entre eles permite mediante métodos baseados nos bacteriofagos chegar a identificar unha especie bacteriana. A determinación do propio bacteriofago como a presenza de biomarcadores baseados nas súas secuencias xénicas ou proteicas, permite identificar unha bacteria que está presente na mostra. As seguintes técnicas empréganse para a identificación bacteriana mediante a determinación de fagos específicos.

1.5.5.2 Métodos baseados en bacteriofagos

A habilidade dos bacteriofagos para infectar especificamente e lisar os seus hospedadores bacterianos, fixo que durante moitos anos o tipado de fagos fose unha técnica empregada para a identificación de bacterias (Craigie & Yen, 1938). Outras vantaxes do uso de métodos baseados en bacteriofagos, ademais da súa alta especificidade, é a súa tolerancia en condicións críticas. Son capaces de discriminar entre células vivas e mortas, e teñen a capacidade para amplificar a sinal xa que a infección dun fago produce miles de partículas nas bacterias (Farooq et al., 2018). O tipado de fagos aínda empregase para a identificación e distinción de cepas dunha mesma especie con diferentes orixes.

A detección clínica de especies como *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *B. anthracis* e *S. aureus* pode levarse a cabo mediante métodos baseados en bacteriofagos. Os principais métodos empregados son a amplificación dos bacteriofagos e o uso de fagos recombinantes (Figura 7). Os fagos recombinantes ó replicarse na célula produce unha sinal detectable que pode funcionar como un indicador de viabilidade celular (Schofield et al., 2012). Un exemplo disto, é a integración dos xenes da luciferasa (*luxAB*) de *Vibrio harveyi* no xenoma dos bacteriofagos para a creación dun fago recombinante que produza bioluminiscencia cando infecta a célula empregando a maquinaria bacteriana. O ensaio de amplificación de fagos basease na mestura da mostra e os fagos seguido do seu cultivo para a infección das células, os fagos que quedan libres son inactivados e lavados, e as células son cultivadas en placas para a visualización posterior dos halos típicos que xeran os virus ó lisar as células bacterianas. Este método comeza a incrementar o seu éxito na actualidade e conseguiu detectar *Listeria* spp. e *Mycobacterium* spp. en leite.

Os biosensores tamén son comunmente empregados para a identificación de bacterias na detección de bacteriofagos completos ou compoñentes como péptidos e máis recentemente proteínas de fagos de unión

Introdución

ao receptor (RBPs) (Figura 7). Outro método centrase no uso dos fagos como elementos de captura no que os virións son unidos a micro ou nano partículas (Figura 7). Estes conxugados empréganse como ferramenta para a detección de bacterias (Chanishvili, 2015; Farooq et al., 2018; Lavigne et al., 2009; Rees & Voorhees, 2005; Richter et al., 2018; Singh et al., 2013). Recentemente, novas técnicas de espectrometría de masas coma MALDI-TOF MS e LC-MS empréganse para a identificación de bacterias a través da detección de proteínas dos fagos. Varios estudos identificaron especies como *E. coli*, *Yersinia pestis* e cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina mediante a metodoloxía de amplificación de bacteriófagos seguida da detección de determinados péptidos dos fagos por MALDI-TOF MS (Cox et al., 2012; Rees & Barr, 2017). LC-MS/MS empregouse para a detección dun péptido do fago lamda na identificación de *E. coli* (Serafim et al., 2017).

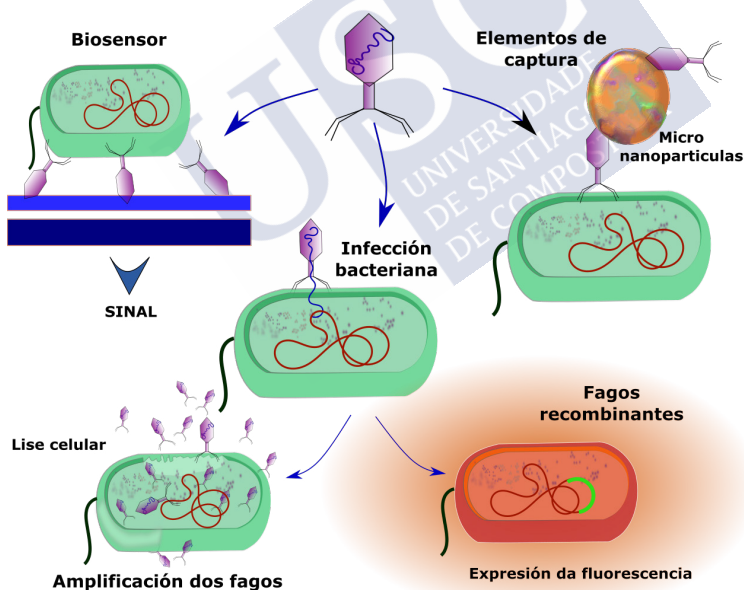


Figura 7. Métodos baseados en bacteriófagos para a detección de bacterias. Cando os fagos infectan as células, a proxenie dos fagos ou o seu contido pode ser detectado cando a célula lise. A expresión de xenos coma o de fluorescencia, insertados no xenoma das células por fagos atemperados recombinantes permite a súa detección. Os fagos tamén empréganse como elementos de captura e como bioreceptores nos biosensores. Modificado de Richter et al. (2018).

Un bo coñecemento previo dos fagos empregados na identificación das bacterias é moi importante. A continuación, expoñese un breve resumo dos bacteriófagos coñecidos para as especies de *Streptococcus* e *S. aureus*.

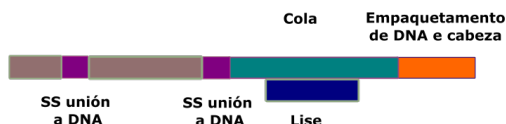
1.5.5.3 Bacteriofagos de *Streptococcus* spp.

Establecese que só un 3% dos fagos activos fronte a *Streptococcus* spp. encóntranse representados pola secuenciación do seu xenoma, na base de datos NCBI (Harhala et al., 2018). Diferentes bacteriofagos foron descritos para especies como *S. uberis* (Brandy, 1989), *S. agalactiae* (Bai et al., 2013; Domelier et al., 2009), e *S. dysgalactiae* (Davies et al., 2007) por diferentes metodoloxías tanto caracterización molecular coma secuenciación do xenoma. Certos fagos de *Streptococcus* da familia *Siphoviridae* son ben coñecidos coma Sfi21, Sfi11 e Sfi19 entre outros encontráronse principalmente en *S. thermophilus* (Brüssow & Desiere, 2001; Canchaya et al. 2004). Máis información está dispoñible para fagos desta familia (*Siphoviridae*) que infectan bacterias contaminantes de alimentos e produtos lácteos (Brüssow, 2001). Estudouse o xenoma de EJ-1, un fago que infecta *S. pneumoniae* da familia *Myoviridae* (Romero et al., 2004). *Siphoviridae* e *Myoviridae* son familias de fagos que pertencen ó orden Caudovirales, bacteriofagos con cola fina filamentosa, compostos dunha cápside icosaédrica con DNA de dobre cadea. Baseándose na cola, os bacteriofagos son clasificados nas principais familias; *Podoviridae*, con unha cola curta; *Siphoviridae*, con unha cola larga non contractil e *Myoviridae*, con unha cola larga contractil. Os xenomas organízanse en módulos funcionais como a lisoxenia, empacamento, cabeza e cola, replicación do DNA e lise (Figura 8) (Brüssow & Desiere, 2001; Deghorain & Van Melderen, 2012; Xia & Wolz, 2014).

Introducción

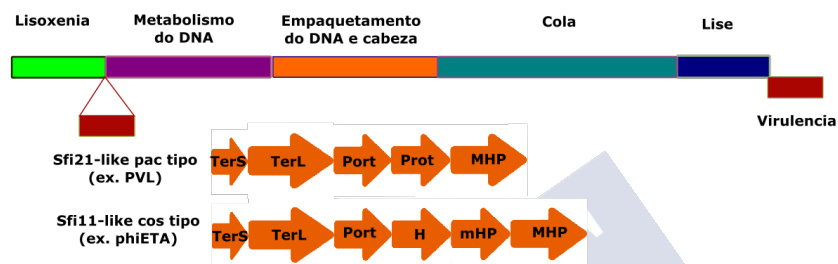
Podoviridae

Tamaño do xenoma: <20Kb



Siphoviridae

Tamaño do xenoma: 40Kb



Myoviridae

Tamaño do xenoma: >125Kb



Figura 8. Imaxe da organización dos diferentes módulos do xenoma dos bacteriofagos das familias *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Myoviridae*. As caixas de cores representan os diferentes módulos. Verde, módulo de lisoxenia; púrpura, módulo de replicación do DNA; laranxa, módulo de empacamento do DNA e a cabeza; azul, módulo da cola; vermello, os xenes de virulencia encontráanse con frecuencia *downstream* do módulo de lise. Amosanse os típicos xenes implicados no empacamento do DNA e a cabeza dos fagos tipo Sfi21 e Sfi11. Modificado de Deghorain & Van Melderren (2012).

1.5.5.4 Bacteriofagos de *Staphylococcus aureus*

Tódolos bacteriofagos coñecidos para *S. aureus* pertencen ó orden Caudovirales. Principalmente son bacteriofagos atemperados da familia *Siphoviridae*, que insértanse no xenoma a excepción daqueles que sufriron mutacións no módulo de lisoxenia e volvéronse líticos coma phiIPLA35, phiIPLA88 e SA11. Moy poucos fagos das familias *Podoviridae* como SAP-2 e *Myoviridae* coma o fago K, foron descritos para *S. aureus* (Deghorain & Van Melderren, 2012).

1.5.6 Perspectivas de futuro na identificación bacteriana

Os métodos baseados en ácidos nucleicos son sensibles e moi empregados na detección de patóxenos, pero requiren de persoal e instrumentos especializados. Os métodos baseados en biosensores son rápidos e de máis baixo coste, non require de persoal especializado e as mostras non precisan de pre-enriquecementos, sen embargo é necesario a mellora na detección de diferentes matrices de alimentos. Os métodos inmunolóxicos como ELISA e inmunoensaio de fluxo lateral teñen boa sensibilidade en ausencia de moléculas que podan interferir coma DNA, proteínas ou células. A combinación de varios métodos rápidos pode ser a solución para determinar con seguridade se un contaminante de alimentos está presente ou non nunha mostra; isto en cambio elevaría o coste de dita detección (Law et al., 2014). Mentres esta metodoloxía domina o mercado na identificación de patóxenos en alimentos, na actualidade, técnicas emerxentes como a espectrometría de masas, microarrays e técnicas baseadas en fagos comezan a empregarse. Os espectrometros de masas fai poucos anos comezaron a empregarse de forma rutinaria nos laboratorios clínicos pola súa rapidez e reproducibilidade, e seguen a presentarse avances cada pouco tempo. Unha das desvantaxes que se presentaban era a necesidade de establecer protocolos estandar e encontrar bases de datos dispoñibles. Os protocolos desenrolados por Bruker (Bruker Daltonics, Inc.) son os preferentes na actualidade. A pesar da gran variedade de técnicas, a maioría dos test validados son dirixidos a determinación de *S. enterica* e *Listeria* spp. Existe tamén a necesidade de desenrolar test validados para outros patóxenos (Rohde et al., 2017).

1.6 Caracterización de novas cepas bacterianas

A taxonomía en procariotas depende de tres elementos, a caracterización, a clasificación e a nomenclatura. A nomenclatura dun grupo de microorganismos depende da súa clasificación e a clasificación, depende da caracterización dos elementos dese grupo. A nomenclatura réxese

Introdución

polo Código Bacteriolóxico, por outro lado, os aspectos a ter en conta para a clasificación e caracterización dos microorganismos varía ó longo dos anos co desenvolvemento de novas metodoloxías que deben ser estandarizadas (Tindall et al., 2010).

Para o establecemento dun novo taxón, a cepa illada debe ser estudada coa maior profundidade posible. Debe incluírse a información sobre a localización xeográfica, aspectos do ambiente de onde foi illada e a designación das cepas incluíndo os números de acceso das coleccións de cultivos tipo onde foron depositadas. Debe ser tamén especificado o proceso de illamento da cepa incluíndo os medios empregados, a composición da atmosfera, o pH, temperatura e duración de cultivo (Logan et al., 2019). As bases de datos coma GenBank, DDBJ e EBI/EMBL, non aceptan novos nomes taxonómicos ata a posterior publicación do novo taxón. Na caracterización dunha cepa, os organismos de referencia deben ser tódalas cepas tipo relevantes para cada estudo. Cando establecece un novo xénero as especies tipo a comparar deben ser tódalas especies tipo próximas, incluído tódalas especies tipo dos xéneros relacionados e as do novo xénero a estudo. Por outro lado, totalas especies tipo dun xénero son os organismos de referencia, para establecer unha nova especie considerada coma un novo membro do mesmo xénero (Tindall et al., 2010; Logan et al., 2009).

1.6.1 Métodos xenéticos

A taxonomía de procariotas foi influenciada polos desenvolvementos nos métodos xenéticos. Previamente á secuenciación do xenoma empregábanse metodoloxías como o contido en G+C o cal está relacionado co uso de codóns, e os métodos de hibridación DNA-DNA e DNA-RNA o cal permitiu a comparación de secuencias xenéticas. A análise de xenes como o 16S rRNA coa PCR permitiu avanzar na taxonomía e no estudo da evolución en procariotas. Outras metodoloxías tamén empregadas e que aportan información a nivel de subespecie e/ou cepa son as técnicas baseadas en “*fingerprint*” de ácidos nucleicos

coma o AFLP (*amplified fragment-length polymorphism PCR*), PFGE (*macrorestriction analysis after pulsed field gel electrophoresis*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) entre outras (Busse et al., 2010; Murray & Schleifer, 1994).

1.6.1.1 Secuenciación xenética

A miúdo, a identificación dun taxón centrase na determinación do xene 16S rRNA. Co estudo xenético e a medida que as secuencias xenómicas foron publicadas nas bases de datos, a dispoñibilidade de novos xenes conservados fixo que puideranse comparar entre taxóns para ser empregadas na identificación e discriminación de cepas (23S rRNA, factor de elongación Tu, subunidade β da ATPasa, subunidade β da girasa, rpoB, recA, etc...).

A secuenciación do 16S rRNA é a base filoxenética da taxonomía bacteriana, e é necesario que tódalas secuencias das cepas tipo estean presentes nas bases de datos. A comparación das secuencias do 16S rRNA, permite determinar relacións filoxenéticas entre xéneros e especies, pero non sempre é apropiada para a clasificación de cepas a nivel de especie. Foi estudado e documentado que na maioría dos casos, dúas cepas que comparten menos do 97% da secuencia completa do 16S rRNA non son membros da mesma especie. Sen embargo, a única información da comparación do 16S rRNA non é válido para establecer unha nova especie, e outras metodoloxías deben ser empregadas a demais de probas fenotípicas para o establecemento dun novo taxón (Busse et al., 2010; Logan et al., 2019).

As ferramentas bioinformáticas, permítennos aliñar grandes cantidades de secuencias, mediante o aliñamento múltiple en programas coma CLUSTAL_X, CLUSTAL W, CLUSTAL X2, CLUSTAL W2, MEGA, T-COFFEE ou MUSCLE (Kumar et al., 2016; Thompson et al., 1997). Os programas bioinformáticos tamén permiten a construción de árbores filoxenéticas a partir da comparación de secuencias xénicas, os cales es-

Introdución

tablecen dunha forma visual distancias filoxenéticas entre os diferentes taxóns. Diferentes métodos empréganse para a construción das árbores (*Distance Matrix, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood ...*).

1.6.1.2 Hibridación DNA-DNA e contido G+C

As técnicas de hibridación foron introducidas nos anos 60. Valores iguais ou superiores ó 70% na hibridación DNA-DNA indica que as cepas a estudo posiblemente pertencen a mesma especie. A aportación dos valores de hibridación entre cepas que presentan igual ou maior similitude do 97% nas secuencias de 16S rRNA, é esencial para a descrición de novas especies. Establecer o contido en G+C é un requisito para coñecer as condicións de hibridación, recomendable na descrición dunha nova especie e esencial para o establecemento dun novo xénero (Logan et al., 2019).

1.6.1.3 Secuenciación xenómica

A tecnoloxía máis novedosa na taxonomía microbiana é a secuenciación xenómica. É unha metodoloxía que aporta unha gran cantidade de información para establecer relacións filoxenéticas e dende fai uns anos converteuse nun requisito para o establecemento de novas especies xa que na actualidade as novas plataformas da nova xeración da secuenciación xenómica (NGS) baixou o seu coste, subindo a calidade dos datos xerados. Parámetros estadísticos como o tamaño do xenoma, o número de contigs xerados, o parámetro N50, a cobertura de secuenciación a heteroxeneidade e a contaminación, foron desenrolados para describir a calidade do xenoma ensamblado final. *Softwares* informáticos filtran as lecturas de baixa calidade antes do ensamblaxe do xenoma xerando contigs. O ensamblaxe final do xenoma dunha cepa a caracterizar debe ser depositado na base de datos GenBank/EMBL/DDBJ e poden ser tamén depositados os datos crus do xenoma en bases de datos coma no SRA (*Sequence Read Archive*). Existe tamén gran cantidade

de ferramentas bioinformáticas para a clasificación e identificación de procariotas a partir de seu xenoma (Chun et al., 2018).

A dispoñibilidade das secuencias xénicas permítenos establecer unha serie de parámetros útiles para comparar os xenomas de dous taxóns. Previamente, en taxonomía o valor da hibridación DNA-DNA (DDH) era maioritariamente o que determinaba a relación entre dous cepas. Actualmente os valores da identidade media de nucleótidos (ANI) e a hibridación *in silico* DNA-DNA (dDDH) obtidos con ferramentas bioinformáticas (Táboa 3) para a comparación entre xenomas son máis relevantes para determinar a relación entre cepas e especies. Os valores propostos que determinan a fronteira entre especies son 95%-96% para ANI e 70% para dDDH (Chun et al., 2018; Richter & Rossello-Mora, 2009). Existen outros parámetros coma OGRI (*Overall Genome Related Index*), MUM (*Maximal Unique Matches*) que tamén establecen relacións entre xenomas de diferentes organismos.

O emprego do xenoma para a construción dunha árbore filoxenómica é moi recente (Chun et al., 2018; Na et al., 2018). Diversos programas bioinformáticos (Táboa 3) son capaces de construír árbores filoxenómicas a partir do aliñamento de *sets* de xenes conservados (*sets* de 31 a 400 xenes) en bacterias.

Táboa 3. Ferramentas bioinformáticas para o estudo e comparativa de xenomas. Nesta Táboa amósanse os *softwares* e serviciós web desenrolados para establecer parámetros útiles na comparación dos xenomas de dous taxóns, e parámetros estadísticos que determinan a calidade do xenoma, así como *softwares* para a construción de árbores filoxenómicas. Modificado de Chun et al. (2018). Licencia *Creative Commons*.

Software	Función	Tipo	URL
OrthoANI with usearch	Cálculo de ANI	Software independente	https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoaniu
OrthoANI with usearch	Cálculo de ANI	Servicio web	https://www.ezbiocloud.net/tools/ani

Introdución

Táboa 3. (Continuación)

Software	Función	Tipo	URL
Genome-to-Genome Distance Calculator	Cálculo de dDDh	Servicio web	http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/
ANI calculator	Cálculo de ANI	Servicio web	http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/
JSpecies	Cálculo de ANI	Software independente	http://imedea.uib-csic.es/jspecies/
JSpeciesWS	Cálculo de ANI	Servicio web	http://jspecies.ribohost.com/
CheckM	Cálculo de parámetros de contaminación	Software independente	http://ecogenomics.github.io/CheckM/
ContEst16S	Cálculo de parámetros de contaminación	Servicio web	https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s
BBMap	Cálculo de cobertura da secuenciación	Software independente	https://sourceforge.net/projects/bbmap/
Amphora2	Árbore filoxenómica	Software independente	http://wolbachia.biology.virginia.edu/WuLab/Software.html
BIGSdb	Árbore filoxenómica	Software independente	https://pubmlst.org/software/database/bigsdb/
bcgTree	Árbore filoxenómica	Software independente	https://github.com/iimog/bcgTree
PhyloPhlan	Árbore filoxenómica	Software independente	https://huttenhower.sph.harvard.edu/phyloPhlan
UBCG	Árbore filoxenómica	Software independente	https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg

1.6.2 Caracterización fenotípica: Morfoloxía, fisioloxía e bioquímica

O estudo das propiedades morfolóxicas, fisiolóxicas e bioquímicas son as ferramentas máis antigas empregadas no estudo de caracterización e clasificación de procariotas, e deben ser listadas na descrición dun novo taxón (Busse et al., 2010).

As características fenotípicas que se estudan para a caracterización dun microorganismo son parámetros como o tamaño e morfoloxía das células e as colonias, test bioquímicos (exemplo, API test (bioMérieux)), pH, temperatura, tinción Gram, condición extremas nas que pode crecer, motilidade e formación de esporas, entre outros (Murray & Schleifer, 1994). A aportación de imaxes da visualización ó microscopio de contraste de fases a 1000 x das células vexetativas e no caso de bacterias formadoras de esporas, das esporas tinguidas é moi recomendable. Imaxes ó microscopio electrónico revelan información adicional tanto das esporas (aparencia do esporanxio) como da existencia de flaxelos. Existen tests bioquímicos comerciais estandarizados e específicos, empregados para cada taxón. Por exemplo, para a identificación e caracterización de especies do xénero *Bacillus* empréganse comunmente nos laboratorios os tests bioquímicos API 20E e 50CHB (bioMérieux), o sistema VITEK (bioMérieux) e placas Biolog. Tódolos test realizados a maiores no laboratorio debe ser especificada a súa metodoloxía, debido a que dependendo da metodoloxía e as condicións empregadas, os resultados poden ser variables (Logan et al., 2019).

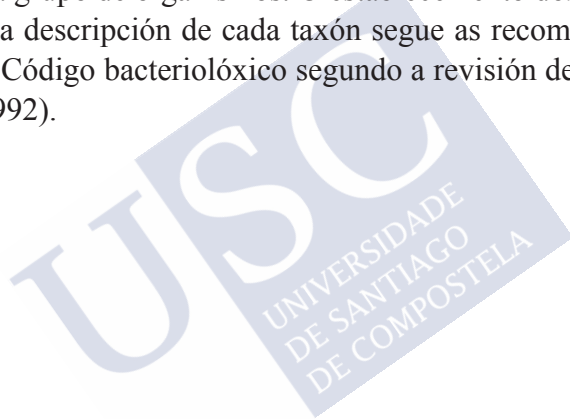
A caracterización quimiotaxonómica dun microorganismo estuda a composición de varios elementos estruturais nos que se inclúe a determinación de elementos das capas externas da célula coma os péptidosglicanos da parede celular en Gram positivas e a presenza de ácidos micólicos. Estúdanse tamén os elementos de membrana coma os ácidos graxos, lípidos polares e a composición de lipoquinonas respiratorias, e tamén constituintes citoplasmáticos coma as poliaminas. A análise do perfil dos ácidos graxos aporta información útil na descripción dun taxón. Ademais a composición de diaminoácidos e a estrutura da mureína é esencial sobre todo en Gram positivas para a descrición dun novo xénero ou especie. A análise de lípidos polares é outra metodoloxía empregada para comparar diferentes taxóns. Aínda que moitos lípidos son descoñecidos xa que non foron caracterizados, isto non reduce o valor da técnica que foi empregada para caracterizar moitos novos xéneros de, por exemplo, *Bacillaceae*. Finalmente, o estudo das menaquinonas

Introdución

MK-7, MK-8 e MK-9, en moitos casos é esencial para a descrición de novos xéneros e é recomendado para a descrición de novas especies (Busse et al., 2010).

1.6.3 Mínimos estándares

Existen documentos cos mínimos estándares para a descrición dun novo taxón, publicados por expertos do ICSB (*International Committee on Systematic Bacteriology*) e ICSP (*International Committee on Systematic of Prokaryotes*) (Lapage et al., 1992), con información detallada para cada grupo de organismos. O establecemento dos mínimos estándares para a descrición de cada taxón segue as recomendacións da regra 30b do Código bacteriolóxico segundo a revisión de 1990 por Lapage et al. (1992).









OBXECTIVOS



2. OBXECTIVOS

2.1 Obxectivos xerais da tese

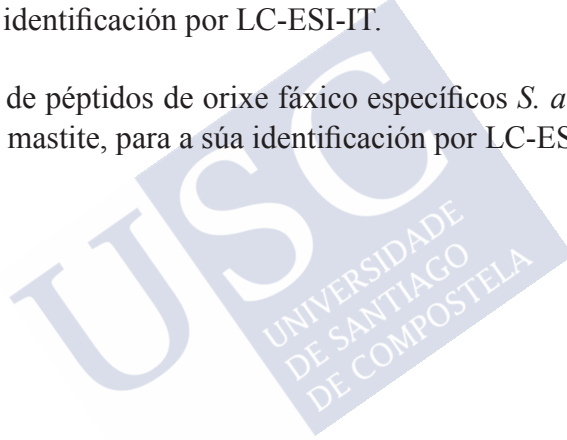
- Identificación e descrición de novos microorganismos illados de produtos lácteos.
- Obtención de patróns “*fingerprint*” de microorganismos contaminantes recollidos nas coleccións de cepas cultivo tipo e de microorganismos contaminantes illados no laboratorio, para a rápida identificación de patóxenos alimentarios mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Obtención de péptidos biomarcadores de detección rápida, para a identificación de contaminacións de produtos lácteos mediante espectrometría de masas- ionización-electrospray (LC-ESI-IT).

2.2 Obxectivos do capítulo I

- Identificación e busca de novos illados, contaminantes de leite condensado.
- Descrición de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov. e *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov.
- Obtención dos patróns “*fingerprint*” de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. e as súas especies máis próximas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

2.3 Obxectivos do capítulo II

- Detección de péptidos específicos de especies de *Streptococcus* e *S. aureus* illados de produtos lácteos, para a súa identificación por espectrometría de masas- ionización-electrospray (LC-ESI-IT).
- Determinación de péptidos de orixe fásico e de factores de virulencia, específicos de *Streptococcus* spp. produtores de mastite, para a súa identificación por LC-ESI-IT.
- Detección de péptidos de orixe fásico específicos *S. aureus* produtores de mastite, para a súa identificación por LC-ESI-IT.









MATERIAIS E MÉTODOS



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microorganismos, medios de cultivo, plásmidos e oligonucleótidos empregados.

3.1.1 Microorganismos

3.1.1.1 Microorganismos illados de leite condensado contaminado

BC09^T (=LMG^T 30124, = CECT^T 9344). Os números de acceso ó GenBank/EMBL/DDBJ para as secuencias do xene 16S rRNA e *gyrB* da cepa tipo BC09^T son KY990920 e MF140243 respectivamente. O número de acceso ó DDBJ/ENA/GenBank para o xenoma da cepa tipo BC09^T é QBHN000000000 e as lecturas en bruto do xenoma subíronse á base de datos SRA con número de acceso SRP139983.

- BC03 Levadura illada no laboratorio.
- BC05 Bacteria illada no laboratorio.
- BC08 Bacteria illada no laboratorio.

3.1.1.2 Microorganismos tipo de *Bacillus* spp. empregados

Táboa 4. Cepas tipo de *Bacillus* spp. empregadas como referencia neste estudo.

Especie	Cepa	Número de acceso do NCBI
<i>Bacillus safensis</i>	FO-36b ^T	NR_041794
<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787 ^T	JX680098
<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b ^T	NR_042337
<i>Bacillus xiamenensis</i>	HYC-10 ^T	NZ AMSH01000114
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061 ^T	NR_043242
<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372 ^T	JX680133

3.1.1.3 Microorganismos de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* produtores de mastite

As cepas de *Streptococcus* spp. e *S. aureus* foron previamente identificadas por MALDI TOF e a secuenciación do 16S rRNA (Böhme et al., 2012; Quintela-Baluja et al., 2014) no laboratorio LHICA da facultade de Veterinaria da USC.

Táboa 5. Cepas de *Streptococcus* spp. empregadas neste estudo. ATCC, Colección de cultivos tipo Americana; CECT, Colección de cultivos tipo española; DSM, Colección de cultivos tipo alemana. LHICA, cepa illada no laboratorio LHICA da USC ; USC, cepa illada na Universidade de Santiago de Compostela.

Mostra	Especie	Cepa	Orixe	Número de acceso do NCBI
ST1	<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 19436/ CECT 994		JN630842.1
ST2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CECT 183	Leite	KC510212.1
ST3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	CECT 926/ ATCC 9542		
ST4	<i>Streptococcus parauberis</i>	DSM 6631	Leite con mastite	NR_043001.1
ST5	<i>Streptococcus parauberis</i>	DSM 6632	Leite crú	JN630844.1
ST6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	USC1-LHICA	Leite con mastite	KP001323.1
ST7	<i>Streptococcus agalactiae</i>	USC3-LHICA	Leite con mastite	KC510215.1
ST8	<i>Streptococcus uberis</i>	USC5-LHICA	Leite con mastite	KC510216.1
ST9	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	USC13-LHICA	Leite con mastite	KC510218.1
ST10	<i>Streptococcus canis</i>	USC52-LHICA	Leite con mastite	KC510222.1
ST11	<i>Streptococcus uberis</i>	USC69-LHICA	Leite con mastite	KC510224.1
ST12	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	USC83-LHICA	Leite con mastite	KC510227.1

Táboa 5. (Continuación)

Mostra	Especie	Cepa	Orixe	Número de acceso do NCBI
ST13	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	USC 84	Leite con mastite	KC51022.8
ST14	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	CECT 758	Leite con mastite	KC51021.3

Táboa 6. Cepas de *S. aureus* empregadas neste estudo. ATCC, Colección de cultivos tipo Americana; CECT, Colección de cultivos tipo española; CNR-ISPA, Instituto de Ciencia de produción de alimentos do Consello Nacional de Investigación de Italia.

Mostra	Especie	Cepa	Orixe	Número de acceso do NCBI
S1	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 41	Queixo de cabra	
S2	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 92	Queixo de vaca	
S3	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 280	Leite crú de vaca	
S4	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 286	Leite crú de vaca	
S5	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 507	Leite crú de vaca	
S6	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 587	Leite crú de vaca	
S7	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 617	Leite crú de vaca	
S8	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 640	Leite crú de vaca	
S9	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 700	Leite crú de vaca	
S10	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 844	Leite crú de vaca	
S11	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA 894	Leite crú de vaca	
S12	<i>S. aureus</i>	CECT 59/ ATCC9144		AY920400

Materials e Métodos

Táboa 6. (Continuación)

Mostra	Especie	Cepa	Orixe	Número de acceso do NCBI
S13	<i>S. aureus</i>	CECT 794/ ATCC29213		LHUS00000000
S14	<i>S. aureus</i>	CECT 4521/ ATCC35845		
S15	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA CA19	Queixo de cabra	
S16	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA GP2	Leite crú de vaca	
S17	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA GP17	Leite crú de vaca	
S18	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA OV8	Leite crú de ovella	
S19	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA PE1	Leite crú de ovella	
S20	<i>S. aureus</i>	CNR-ISPA U17	Humano	

3.1.1.4 Outras cepas bacterianas

Táboa 7. Cepas de *E. coli* utilizadas neste estudo.

Cepa	Xenotipo	Orixe
TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrrhsdRMSmcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74recA1araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galUgalK</i> <i>rpsL(StrR)endA1nupG</i>	INVITROGEN

A cepa *TOP10* presenta unha elevada eficiencia de transformación e as mutacións que porta favorecen a estabilidade do DNA clonado. A delección Φ80*lacZ*ΔM15 permítelle a dita cepa a α-complementación co extremo N-terminal da β-galactosidasa que é codificada en plásmidos coma ocorre nos plásmidos tipo pUC.

3.1.2 Medios de cultivo

Para os medios sólidos engadiuse agar bacteriolóxico 20 g/L. Os medios de cultivo foron esterilizados mediante autoclave a 121 °C durante 15 min.

- **Luria-Bertani** (LB, Sigma Co.)
Tryptona10g/L
Extracto de levadura 5g/L
NaCl10g/L
- **Nutrient Agar** (NA, Sigma Co.)
- **Nutrient Broth** (NB, Sigma Co.)
- **Tryptic Soy Broth** (TSB, Becton Dickinson, BBL)
- **Tryptic Soy Agar** (TSA, Difco, BBL)
- **Medio de tetrionato** (Sigma, USA)
- **Medio *Yeast Extract Peptone Dextrose*** (YPD)
Peptona20g/L
Glucosa20g/L
Extracto de Levadura 10g/L
- **Medio *OGYE (Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract)***
Dextrosa20g/L
Extracto de Levadura 5g/L

Materiais e Métodos

- **Medio *Yeast nitrogen base*** (YNB,Fluka-Biochemika)
- **Medio *Methyl-red VOGES-PROSKAUER*** (MR-VP, Sigma-Aldich)
- **Medio *Plate Count Agar*** (PCA)
 - Peptona5g/L
 - Extracto de levadura 2.5 g/L
 - Glucosa1g/L

Cando foi necesario o medio suplementouse cos seguintes antibióticos e/ou compostos:

- Ampicilina (50µg/mL) cando as células *TOP10* foron transformadas co vector pUC19 e na selección das transformantes.
- X-Gal (4µL dun stock de 200 mg/mL) para a detección de transformantes no medio sólido para que se produza a α -complementación do plásmido pUC19.
- Cloranfenicol (100g/mL) na busca de novas cepas de levaduras do sobre de leite condensado contaminado, para evitar o crecemento de bacterias.

Os antibióticos foron esterilizados mediante filtración con filtros Millipore de 0.22 µm antes de engadirse ó medio de cultivo estéril.

3.1.3 Oligonucleótidos

Os oligonucleótidos empregados neste traballo recóllense na seguinte Táboa (Táboa 8). Os oligonucleótidos deseñáronse a partir de secuencias depositadas no Genbank das cepas filoxénicamente máis próximas á cepa a estudo ou redeseñando oligonucleótidos publicados, co fin de obter unha amplificación máis específica tras coñecer previamente parte da súa taxonomía. Para elo, empregouse o programa

informático *Vector NTI Advanced™ 11* (Invitrogen,USA). A síntese dos oligonucleótidos encargouse á empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

Táboa 8. Oligonucleótidos empregados neste estudo. (*) fosforilados ; Y=C,T; R=A,G; V=A, G, C; M=A, C; N=A, G, C, T ; TA: temperatura de hibridación en °C.

Nome	Secuencia (5'→3')	TA (C°)	Aplicación/Referencia
M13F	5'-GTAAAACGACGGC CAG-3'	45°C	Oligonucleotidos universais para a secuenciación dun vector que codifica a secuencia N-terminal do xene LacZ.
M13R	5'-AGCTAACTCACATTA AT-3'		
U515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCG GTAA-3'	57°C	Oligonucleotidos universais para a secuenciación do 16S rRNA / Wang & Qian, 2009
U1052R	5'-GARCTGRCGRRC CATGCA-3'		
p8FPL-2	5'-AGAGTTTGATCCTG GCTC-3'	40°C	Secuenciación do 16S rRNA / Neste estudo modificado de Relman <i>et al.</i> , 1992
p1492R+G	5'-GGTTACCTTGTTACGAC TTC-3'		
ScrBaci1pbF	5'-TACGAAGGCCGAAT- TAAAAGCTATGTAG-3'	54°C	Secuenciación do xene <i>gyrB</i> / Neste estudo
ScrBaci311pbR	5'-AGCTTTGTTTTCGTCTG- GCCTTCGAATTG-3'		
Gyrb1pF	5'-ATGCAACAGCAAAATA- ATTACGATGAAAATCAG-3'	57°C	Secuenciación do xene <i>gyrB</i> / Neste estudo
GyrbR	5'-TGAAGTCTTCTCCGA TTCCGGTGCC-3'		
tufGPF	5'-ACGTTGACTGCCAG GACAC-3'	55°C	Secuenciación do xene <i>tuf</i> /S. Caamaño-Antelo <i>et al.</i> , 2015
tufGPR	5'-GATACCAGTTACGTCA GTTGTACGGA-3'		
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3'	53°C	Secuenciación do ITS /White <i>et al.</i> , 1990
ITS2R	5'-GCTGCGTTCTTCATC GATGC-3'		

Materiais e Métodos

Táboa 8. (Continuación)

Nome	Secuencia (5' → 3')	TA (C°)	Aplicación/Referencia
Zigo1R*	5'-CATTTCACAGGACAA ATCACCGATTTTTCTC-3'	60°C	Secuenciación do xene <i>HIS3</i> /Neste estudo
Zigo1F*	5'-GGTGATTGACATC GATGATCACCATACC-3'		

3.1.4 Plásmidos

3.1.4.1 pUC19

O plásmido pUC19 (Invitrogen) (Figura 9) utilizouse neste traballo para clonar secuencias xénicas dos microorganismos a estudo. Este plásmido contén 2686 pb e presenta un xene de resistencia a ampicilina (AP^R) o que permítelle seleccionar os transformantes. Os insertos clonados na rexión do *poli-linker* interrompen o xene *lacZ*, o que permite seleccionar por cor as colonias recombinantes no medio con X-GAL (Yanisch-Perron et al., 1985).

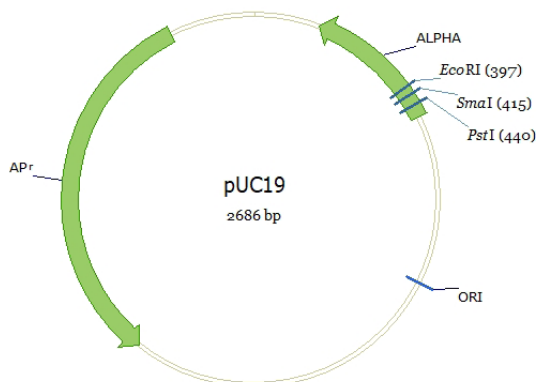


Figura 9. Esquema do vector pUC19. Enzimas de restrición en vermello (EcoRI, SmaI e PstI). Oligonucleótidos en azul (M13 Forward e M13 Reverse). Orixe de replicación (Ori), resistencia a ampicilina (AP^R) e LacZ alfa-complementación (ALPHA).

3.2 Técnicas de manipulación de DNA

3.2.1 Extracción de DNA

3.2.1.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

A obtención de DNA plasmídico realizouse mediante o *kit* comercial *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), segundo as instrucións do fabricante.

3.2.1.2 Extracción de DNA xenómico para Gram positivas

Centrifugáronse 15 mL de medio dun cultivo crecido toda a noite, durante 15 minutos a 10.000 rpm e seguidamente refugouse o sobrenadante. Resuspendeuse o precipitado en 5mL de solución 25Mm Tris-HCL pH8, 25Mm EDTA, 2mg/mL de lisozima e perlas de vidro de 0.1 mm a un volume equivalente de células. As células incubáronse durante 30-45 minutos a 30°C e posteriormente sometéronse a pulsos de axitación nun vortex. Engadíronse 2 mL de SDS ó 5% repetindo a axitación no vortex e a mestura se deixou incubando 10 minutos a 60°C. Deixouse repousar 5 minutos a temperatura ambiente e tras a adición de 2 mL de fenol- cloroformo a pH neutro, axitouse nun vortex. A mostra centrifugouse durante 10 minutos a 4°C a 14000 rpm. O sobrenadante traspasouse a un novo tubo *ependorff* ó cal engadiuse 1/10 (v/v) acetato sódico 2.5M e 1/1 (v/v) isopropanol. O tubo axitouse no vortex ata verse o DNA. Recuperouse o DNA cunha punta e resuspendeuse en 0,5mL de auga destilada estéril. Centrifugouse de novo a mostra durante 5 minutos a 4°C a 14.000 rpm e refugouse o sobrenadante. O precipitado resuspendeuse en etanol frío ó 70%. A mostra centrifugouse durante 5 minutos a 4°C e 14.000rpm, descartouse o sobrenadante, aspiráronse os restos de etanol e deixouse a temperatura ambiente. Engadíronse 200µL de auga Milli-Q estéril e deixouse hidratar e resuspender 16 horas a 4°C. Axitouse suavemente e conxelouse a mostra ata o seu posterior uso.

3.2.2 Amplificación do DNA

O DNA amplificouse mediante a técnica da Reacción en Cadea da Polimerasa (PCR). Para realizar as reaccións de PCR utilizouse un Termociclador “*MyCycler™ Thermal Cycler System*” (BioRad).

A amplificación do DNA por PCR realizouse sobre 25µL de mestura de reacción de “*PrimeSTAR® HS DNA Polymerase*” de Takara Bio. Esta enzima é unha DNA polimerasa de alta fidelidade e ofrece unha gran eficiencia de amplificación en PCR por posuír unha alta actividade 3'→5' exonucleasa o que resulta nunha baixa taxa de error. Unha amplificación con baixa taxa de error é imprescindible para poder interpretar diferencias en secuencias de DNA moi similares de especies filoxenéticamente moi próximas. A mestura de reacción contén 5 µL de 5X Primer STAR buffer, 150ng de DNA, 2µL de nucleótidos (dNTP Mixture 2.5 Mm) e 0,25 µL de Primer STAR DNA Polimerasa, 1 µL de cada oligonucleótido (5 µM) e auga Milli-Q ata chegar a 25 µL.

3.2.2.1 Amplificación da rexión 16S rRNA

A secuenciación parcial do 16S rRNA levouse a cabo tras a amplificación do fragmento con oligonucleótidos (U515F y U1052R) seleccionados para esa zona en bacterias (Wang & Qian, 2009). As condicións de amplificación foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98°C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 57 °C durante 5 segundos cunha extensión final de 72 °C durante 40 segundos.

Para a secuenciación completa do xene modificáronse oligonucleótidos descritos por Relman et al. (1992) e Rossi et al. (2009), baseándose nas secuencias de especies próximas a cepa a estudo (p8FPL-2 y p1492R+G). As condicións de amplificación neste caso para o 16S rRNA foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C du-

rante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 40 °C durante 5 segundos cunha extensión final de 72 °C durante 80 segundos.

3.2.2.2 Amplificación do xene *gyrB*

Para o deseño dos oligonucleotidos estudáronse os xenes recollidos para as especies do xénero *Bacillus* na base de datos GenBank. Seleccionouse o xene *gyrB* por presentar na súa secuencia diferencias entre as distintas especies de *Bacillus* e ser un dos poucos xenes secuenciados para todas elas a excepción do 16S rRNA. Este fragmento tamén é utilizado para distinguir entre especies noutros traballos (Satomi et al., 2006; Caamaño-Antelo et al., 2015). Os oligonucleótidos deseñados para levar a cabo a amplificación dun fragmento do xene *gyrB* foron ScrBaci1pbF e ScrBaci311pbR, e posteriormente deseñáronse os oligonucleótidos Gyrb1pF e GyrbR para amplificar o xene completo.

As condicións de amplificación para o xene *gyrB* cos oligonucleótidos ScrBaci1pbF e ScrBaci311pbR foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98° C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 98 ° C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 54° C durante 10 segundos cunha extensión final de 72 ° C durante 40 segundos.

As condicións de amplificación para o xene *gyrB* cos oligonucleótidos Gyrb1pF e GyrbR foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98° C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 ° C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 57° C durante 10 segundos cunha extensión final de 72 ° C durante 60 segundos.

3.2.2.3 Amplificación dun fragmento do xene *tuf*

Levou a cabo a amplificación do xene *tuf* (TU factor de elongación) cos oligonucleótidos tufGPF e tufGPR deseñados por Caamaño-Antelo et al. (2015), e as condicións de amplificación para o xene *tuf*

foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 95° C durante 32 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 ° C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 55° C durante 10 segundos cunha extensión de 72 ° C durante 20 segundos. Despois dos 35 ciclos, realizouse un ciclo de extensión final durante 1 minuto.

3.2.2.4 Amplificación da rexión hipervariable ITS1 e ITS2 de levaduras

A secuenciación das rexións interxénicas ITS1 e ITS2 e o xene do DNA ribosómico 5.8S levouse a cabo tras a amplificación do fragmento cos oligonucleótidos seleccionados para esa zona en levaduras. O deseño dos oligonucleótidos baseouse na elección de secuencias conservadas do final do xene rDNA 18S e do inicio do xene rDNA 28S en especies de levaduras (White et al., 1990). As condicións de amplificación para o xene do DNA ribosómico 5.8S cos oligonucleótidos ITS1F e ITS2R foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98° C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 98 ° C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 53° C durante 5 segundos cunha extensión final de 72 ° C durante 40 segundos.

3.2.2.5 Amplificación parcial do xene *HIS3*

O xene *HIS3* codifica para a proteína imidazol- glicerolfosfato dehidratasa. Este xene é un *housekeeping* que presenta diferenzas entre especies moi próximas de levaduras, suficientes como para deseñar oligonucleótidos específicos para cada especie dun mesmo xénero. Os oligonucleótidos deseñáronse a partir de secuencias de especies do xénero *Zygosaccharomyces* para o xene *HIS3* da base de datos GenBank. Os oligonucleótidos deseñados foron Zigo1R e Zigo1F os cales codifican para un fragmento do xene *HIS3* e permite distinguir entre especies de *Zygosaccharomyces*.

As condicións de amplificación para o xene *HIS3* cos oligonucleótidos Zigo1R e Zigo1F foron as seguintes: un paso de desnaturalización inicial 98° C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, a hibridación tivo lugar a 60 °C durante 10 segundos cunha extensión final de 72 °C durante 40 segundos.

3.2.3 Electroforese de DNA

3.2.3.1 Electroforese en xel de agarosa

A separación e identificación dos fragmentos de DNA realizouse mediante electroforese en xeles de agarosa. Os xeles de agarosa preparáronse a unha concentración de agarosa que variou entre 0,6-1,5% (p/v) segundo o tamaño dos fragmentos de DNA que se desexaba separar. A preparación dos xeles e o desenvolvemento da electroforeses realizáronse en tampón TAE 1 M (Tris- acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M). Nos xeles incorporouse bromuro de etidio a unha concentración final de 1 mg/ mL ou a “*Nucleacid Staining Solution*” *RedSafe™* de “*iNtRON Biotechnology*” e iluminándoo con luz ultravioleta nun transiluminador. As mostras de DNA a analizar mesturáronse nunha proporción 4:1 (v/v) cunha solución marcadora que contiña EDTA 25 mm, glicerol ó 50 % e azul de bromofenol ó 0.25 %. As electroforeses levaron cabo en cubetas horizontais (BioRad) a 5V/cm, 400 Ma durante polo menos 60 min. A estimación do tamaño das bandas obtidas tras a electroforese realizouse mediante o programa “*Image Lab 4.0.1 de Bio- Rad Laboratories*” empregando como un marcador de pesos moleculares o marcador comercial “*2- long DNA Ladder*” (New England Biolabs).

3.2.4 Captura de imaxes e visualización de xeles

A visualización dos xeles tras a electroforese e o cálculo do tamaño das bandas realizouse mediante o programa “*Image Lab 4.0.1 de Bio-Rad Laboratories*”. A captura de imaxes levouse a cabo nun sistema de documentación de xeles *ChemiDoc™ XRS* de BioRad.

3.2.5 Purificación do DNA

3.2.5.1 Purificación do DNA a partir de xeles de agarosa

O DNA correspondente a unha banda dun determinado tamaño foi recortado do xel empregando unha coitela estéril e introducida nun *ependorf* estéril. O DNA purificouse dende os anacos do xel empregando o kit comercial “*Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GEL Healthcare), segundo as instrucións do fabricante.

3.2.5.2 Purificación dende unha reacción enzimática

Para purificar o DNA desde a mestura de PCR ou dende a mestura de dixestión enzimática utilizouse o kit “*Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GEL Healthcare) seguindo as instrucións proporcionadas polo fabricante.

3.2.6 Cuantificación do DNA

A concentración do DNA estableceuse por métodos espectrofotométricos utilizando o espectrofotómetro “*Nano Drop 1000 Spectrophotometer*” (Thermo Scientific), a lonxitude de onda 260 nm. As relacións A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} tivéronse en conta para valorar a pureza dos ácidos nucleicos.

3.2.7 Dixestión enzimática do DNA

3.2.7.1 Enzimas de restrición

A dixestión do DNA realizouse mediante o emprego de enzimas de restrición comerciais (Takara) segundo as recomendación do fabricante.

Táboa 9. Enzimas de restrición empregadas na dixestión de DNA. T^a, temperatura.

Enzima	μL Enzima	Buffer 10X	0,1% BSA	DNA	Volumen final	T ^a	Temperatura inactivación
SmaI	1 μL	2μL TBuffer	6 μL	1000ng	20 μL	37°C	65 °C
EcoRI	1 μL	2μL HBuffer	-	1000ng	20 μL	37°C	65 °C
PstI	1 μL	2μL HBuffer	-	1000ng	20 μL	37°C	80 °C

3.2.7.2 Defosforilación do DNA

Co fin de evitar que os plásmidos linealizados con extremos romos reliquen procedeuse á defosforilación dos mesmos tras o corte con SmaI. Para iso utilizáronse 3U da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Takara), 1~10 pmol de DNA, 5 μL de 10X SAP buffer, completando o volume con auga Milli-Q ata 50 μL.

3.2.7.3 Fosforilación

Cando foi necesario o DNA fosforilouse coa enzima T4 polinucleotido quinasa de Takara, segundo o protocolo subministrado polo fabricante.

3.2.7.4 Ligación de DNA

A ligación realizouse entre o plásmido linealizado pUC19 (Invitrogen) e fragmentos de DNA obtidos por PCR. Para levar a cabo a ligación os fragmentos de DNA e o plásmido débense mesturar nunha relación molar vector/inserto determinada. Así, a partir de 50 ng de plásmido, engadiuse unha cantidade determinada de inserto para ter unha relación molar 1:3. Por cada reacción de ligación empregouse 1 μL de T4 DNA

Materiais e Métodos

ligasa (Takara) e 2 μL de 10X T4 DNA ligasa para obter un volume final de 10 μL . A ligación realizouse mantendo a mestura a 16° C durante toda a noite e se desnaturalizó a 65° C 10 minutos. Finalmente a mestura de ligación empregouse para transformar as células competentes.

3.2.8 Transformación de microorganismos

3.2.8.1 Transformación de *E. coli*

3.2.8.1.1 Preparación de células competentes

En primeiro lugar, preparouse un preinóculo de 5 mL de LB inoculando unha colonia da estirpe de *E. coli TOP 10* que se ía a utilizar, e se incubou toda a noite en axitación a 37°C ata que alcanzou a fase estacionaria. Posteriormente, transferíronse 2 mL do preinóculo a un matraz con 100 mL de LB (Sigma Co.) e se incubou de 2- 3 h ata que alcanzou unha DO 550 nm de 0,3-0,4. O cultivo arrefriouse durante 5 minutos en xeo e se centrifugou a 5000 rpm a 4° C durante 8 minutos. Descartouse o sobrenadante e as células se resuspenderon en 15 mL de TfBI por cada 50 mL de cultivo empregados. Novamente arrefriouse en xeo e se centrifugou 8 min a 5000 rpm a 4 °C. Descartouse o sobrenadante e se resuspenderon as células en 2 mL de TfBII por cada 50 mL de cultivo empregados. Finalmente repartiéronse en alícuotas de 100 μL en viarios fríos e mergulláronse en nitróxeno líquido. As células competentes conserváronse para o seu uso a -80°C.

Solucións:

- 1. Solución TfBI (500 ml):** 1.47 g de CH_3COOK , 4.95 g de MnCl_2 , 6.05 de RbCl_2 , 0.74 g de $\text{CaCl}^*_6\text{H}_2\text{O}$, 75 mL de glicerol; axustar a pH 5.8 con ácido acético glacial 0.2M. Almacenar a 4°C.
- 1. Solución TfBII (500ml):** 10 mL de un stock de MOPS 100 mM pH 7, 1.6 g de $\text{CaCl}^*_6\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g de RbCl_2 , 18 mL de glicerol. Filtrar a través de membranas de 0.22 μm e almacenar en oscuridade a 4°C.

- 1. Stock de MOPS (100mM, pH 7):** 2.09 g de MOPS, 0.34 g de CH_3COONa , 0.18 g de EDTA. Axustar a pH 7, enrasar ata 100 mL con auga destilada e filtrar a través de membranas de 0.22 μm .

3.2.8.1.2 Transformación de células competentes

As células competentes desconxelaróense en xeo. Unha vez desconxeladas engadiuse a mestura de ligación. O vial mantívose en xeo durante 30 min e transcorrido este tempo aplicouse un choque térmico mantendo as células mergulladas nun baño a 42°C durante 30 segundos. Rapidamente puxéronse en xeo durante 2 minutos e engadiuse 250 μL de medio LB (Sigma Co.). Esta mestura incubouse nun axitador orbital a 200 rpm durante 1 h a 37°C para permitir a expresión xénica da resistencia empregada como marcador. Finalmente sementáronse 20, 100 e 200 μL en placas de LB (Sigma Co.) suplementado con ampicilina e X- GAL (40mg/ mL), incubándose 16 h a 37 °C.

3.2.8.1.3 *Screening* por PCR e corte con PstI e EcoRI das colonias transformadas

Co fin de seleccionar as colonias transformadas correctamente realizouse un *screening* por PCR para verificar que o inserto atópase dentro do plásmido. Para levar a cabo o *screening* picouse unha colonia e se levou a cabo a PCR do fragmento do xene cos oligonucleotidos M13 e posteriormente visualizouse por electroforese en xel de agarosa o tamaño do inserto. Outro método empregado no *screening* por restrición dos plásmidos baseouse en cultivar unha colonia transformada en LB (Sigma Co.), extraer o DNA plasmídico e cortar con PstI e EcoRI esperando obter 2 bandas tras electroforese, unha banda co tamaño do inserto e outra de 2640 pb correspondente ó vector pUC19.

3.2.9 Secuenciación do DNA

A secuenciación de DNA levouse a cabo nun servizo externo; *Secugen* (España) e *StabVida* (Portugal) polo método Sanger co *Applied Biosystems® 3730 xl DNA Analyzer* e os oligonucleótidos universais M13. As secuencias obtidas comparáronse coas secuencias do GenBank usando BLASTn (Altschul et al., 1990) e EzTaxon-e server (Kim et al., 2012). Para realizar aliñamentos usáronse os programas *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.0* e *Clustal_X software* (Thompson et al., 1997).

3.2.10 Secuenciación e análise do xenoma da cepa BC09^T

3.2.10.1 Extracción e secuenciación

A extracción e a secuenciación do DNA xenómico foi levado a cabo polo Servizo Central de Apoio á Investigación Experimental (SCSIE) da universidade de Valencia (Valencia, España) usando a plataforma *IlluminaMiSeq* con lecturas de 2×300 “*paired-end*”.

3.2.10.2 Ensamblaxe e anotación do xenoma

As lecturas obtidas do xenoma foron ensambladas con *SPAdes Genome Assembler* (Bankevich et al., 2016). A anotación dos *contigs* realizouse con *Prokka* (Seemann, 2014) dentro do *Galaxy Orión Server* (Cuccuru et al., 2014). Os parámetros de calidade do xenoma calculáronse mediante o programa *CheckM v1.0.9* (Parks et. al, 2014). As lecturas curtas foron subidas a *Sequence Read Archive* (SRA), e as ensamblaxes de ditas lecturas ó NCBI GenBank.

3.2.10.3 Análise bioinformática do xenoma da cepa BC09^T e as cepas tipo máis próximas

3.2.10.3.1 Identidade media en nucleótidos (ANI)

A identidade media en nucleótidos (ANI) entre as cepas a estudo calculouse mediante o servizo web de *JSpecies* (<http://jspecies.ribo-host.com/jspeciesws/>) (Richter & Rosselló-Móra, 2009).

3.2.10.3.2 Hibridación del DNA-DNA *in silico* (dDDH)

O valor de hibridación do DNA-DNA *in silico* (dDDH) entre as cepas a estudo, calculáronse empregando o servizo web *genome-to genome distance calculator* (GGDC 2.1) (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) usando a formula dous na web do GGDC (Meier-Kolthoff et al., 2013; Auch et al., 2010) xa que é a única función axeitada para analizar as ensamblaxes en bruto dun xenoma (Dunlap et al., 2017).

GGDC Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1

The image shows the submission form for the GGDC Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1. The form is titled "Submission Form" and includes a "How to cite" link for "1200+ citations". It asks the user to choose between analyzing "viral genomes" or "single genes". The form contains several input fields: "Local alignment tool" (set to "BLAST+ (recommended)"), "Query accession(s)", "Query genome" (with a "Seleccionar archivo" button), "Reference accessions" (with a note "one row per organism (see FAQ for valid formats)"), "Reference genomes" (with an "Elegir archivos" button), and "Contact details" (with a placeholder "mail@example.com"). A "Submit" button is located at the bottom. A "Current slot usage" bar shows 15% usage. The footer includes the DSMZ logo, copyright information "© 2012-2019 Leibniz Institute DSMZ - Privacy - Terms", and a "Back to top" link.

Figura 10. Imaxe do servizo web GGDC. “Genome-to genome distance calculator” (GGDC 2.1) (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>).

3.2.11 Construción de árbores

3.2.11.1 Árbore filoxenética dos xenes 16S rRNA e *gyrB*

As distancias entre as secuencias a estudo foron calculadas de acordo ó modelo do parámetro 2 de Kimura (Kimura, 1980) usando o software Clustal_X software (Thompson et al., 1997). Para as árbores filoxenéticas se usaron os modelos *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) e *Maximum-Likelihood* (ML) (Rogers & Swofford, 1998). O programa *MEGA 7.09 software* (Kumar et al., 2016) usouse para todas as análises e construción das árbores.

3.2.11.2 Árbore filoxenómica da cepa BC09^T e as súas cepas tipo máis próximas

A comparación do xenoma e dos aliñamentos para a árbore filoxenética se realizaron mediante o *software* UBCG (Na et al., 2018; Chun et al., 2018). Este programa utiliza a comparación dun *set* de 92 xenes bacterianos de copia única, para a construción dunha árbore filoxenética.

3.2.11.3 Árbore filoxenómica dos bacteriófagos de *Streptococcus*

Os xenomas dos bacteriófagos a estudo descargáronse da base de datos GenBank, e analizáronse mediante o *Web server VICTOR* (*Virus Classification and Tree Building Online Resource*, <http://ggdc.dsmz.de/victor.php>) (Meier-Kolthoff & Göker, 2017). Dito servidor constrúe unha árbore filoxenómica a partir dos cálculos das distancias interxenómicas.

VICTOR Virus Classification and Tree Building Online Resource

Submission Form VICTOR paper Cited by

Want to analyze **microbial genomes** or **single genes** instead?

Data type amino acid nucleotide ⓘ

Accessions one row per virus (see FAQ for valid formats) ⓘ

Max. accessions/genome files: **100**

Genome files Elegir archivos Ningún archivo seleccionado ⓘ

Contact details mail@example.com ⓘ

Submit

Current slot usage 0%

DSMZ © 2012-2019 Leibniz Institute DSMZ · Privacy · Terms Back to top

Figura 11. Imaxe do servizo Web server VICTOR. (*Virus Classification and Tree Building Online Resource*, <http://ggdc.dsmz.de/victor.php>).

3.2.11.4 Árbore filoxenética do xene holin dos bacteriófagos de *Streptococcus*

Os xenes da proteína holina dos fagos a estudo descargáronse da base de datos GenBank e foron aliñados de acordo ó modelo do parámetro 2 de Kimura (Kimura, 1980) usando o software Clustal_X software (Thompson et al., 1997). Para as árbores filoxenéticas se usaron os modelos *Neighbour-Joining* (NJ) e *Maximum-Likelihood* (ML) (Saitou & Nei, 1987; Rogers & Swofford., 1998). O programa *MEGA 7.09 software* (Kumar et al., 2016) empregouse para tódalas análises e construción das árbores.

3.3 Técnicas microbiolóxicas de identificación de microorganismos

Neste estudo realizáronse tanto técnicas moleculares coma microbiolóxicas para a identificación das cepas a estudo.

3.3.1 Obtención de cultivos puros

Os microorganismos empregados neste estudo foron illados nun ambiente estéril dende sobres (inchados) de leite condensado contaminado. O leite condensado do interior do sobre sementouse por extensión en placas cos medios YPD e OGYE con e sen cloranfenicol (0,1 g/L). Se incubaron a 35 °C as placas sen antibiótico e a 30 °C as que teñen antibiótico durante 48 horas. A partir das primeiras placas, illáronse e reilláronse colonias varias veces por estriado para a obtención e conservación de cultivos puros.

3.3.2 Stock de los cultivos puros illados

Os distintos microorganismos illados mantivéronse en stock despois de ser cultivados no medio líquido LB e YPD con glicerol (10%) e conxeláronse a -80° C. Tras uns días conxelados volvéronse a cultivar para comprobar que crecían e eran viables.

3.3.3 Caracterización fenotípica

Levou a cabo a caracterización fenotípica recomendada nos estándares mínimos para as bacterias formadoras de endoesporas (Logan, et al.,2009) seguindo a metodoloxía descrita por Claus & Berkeley (1986) no “*Bergeys manual of Systematic Bacteriology*” e usando os sistemas API 50 CH, 20 NE e API ZYM (BioMerieux, Francia) segundo as instrucións do fabricante.

A morfoloxía microscópica das células vexetativas observouse ó microscopio óptico de contraste de fases coas lentes de 60X e 100X tras incubar 24 h en caldo LB (Sigma Co.). A morfoloxía das colonias estudouse tras o seu cultivo en placas de TSA.

3.3.3.1 Estudo da motilidade

A cepa foi crecida en medio NA durante 48 h a 22°C para determinar a motilidade en microscopio de contraste de fases empregando o método de pinga suspendida. O tipo de flaxelo foi determinado por microscopía electrónica despois de 48 h de incubación en medio NA a 22 °C. As células resuspendéronse en auga destilada con 2% de acetato de uranilo e examinadas a 80 kV cun microscopio electrónico de transmisión *Tecnai Spirit Twin*.

3.3.3.2 Estudo das esporas

As esporas da cepa illada estudáronse mediante microscopía electrónica de varrido de emisión de campo (FESEM) en mostras desecadas a temperatura ambiente e visualizadas a unha voltaxe de 3 kV. As esporas tamén visualizáronse previamente a microscopía óptica de contraste de fases tras realizar a tinción con verde malaquita.

3.3.3.3 Probas fenotípicas

- **Proba de anaerobiosis:** a cepa illada cultivouse en medio de tetrionato (Sigma,USA) (Claus & Berkeley, 1986).
- **Tinción de Gram:** levouse a cabo despois de 24 horas de incubación a 28 °C en caldo LB (Doetsch, 1981).
- **Producción de fenilalanina deaminasa:** a cepa illada cultivouse en medio NA suplementado con felilalanina e tras a incubación engadiuse unha solución de cloruro ferrico para o seu revelado (Claus & Berkeley, 1986).
- **Producción de catalasa:** tomouse unha colonia da cepa illada nun portaobxetos e engadiuse unha gota de H₂O₂ para observar a presenza ou ausencia de burbullas de O₂ (Claus & Berkeley, 1986).

Materiais e Métodos

- **Producción de caseinasa:** a cepa illada cultivouse en NA suplementado con 0.3% de caseína (Sigma) e tras a incubación revisouse a produción de caseinasa por aparición dun halo tras engadir ácido tricloroacético (30%) (Claus & Berkeley, 1986).
- **Producción de amilasa:** a cepa illada cultivouse en medio NA suplementado con almidón e tras a incubación revelouose a presenza de amilasas mediante a adición de lugol (Claus & Berkeley, 1986).
- **Producción de oxidasa:** Tomouse unha colonia da cepa illada sobre un disco de papel impregnado con reactivo de oxidasa de Kovacs.
- **Crecedemento en altas concentracións de sacarosa:** tras obter o cultivo puro da cepa illada, tomouse unha colonia para sementar en matraces de medio YNB suplementado con sacarosa ó 15 % e ó 30%. Seguidamente, cultivouse durante 24 horas a 35°C (Claus & Berkeley, 1986).
- **Crecedemento a 4, 15, 25, 28, 37, 40 e 45°C:** o cultivo levouse a cabo en medio TSA durante 24-48 horas (Claus & Berkeley, 1986).
- **Crecedemento a pH 7 – 8:** a cepa illada cultivouse en medio NB tampado con 200Mm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na H}_2\text{PO}_4$ durante 24 horas a 35°C (Claus & Berkeley, 1986).
- **Crecedemento a pH 8 – 9:** a cepa illada cultivouse en medio NB tamponado con 200Mm $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ durante 24 horas a 35°C (Claus & Berkeley, 1986).
- **Crecedemento en 2, 5 e 7% de NaCl:** a cepa illada cultivouse en medio NB suplementado con NaCl ata a porcentaxe indicada a 35°C (Claus & Berkeley, 1986).
- **Proba de redución de nitratos:** a cepa illada cultivouse en medio NA suplementado con KNO_3 durante 24 horas a 35°C . Para o seu revelado tras 24 horas engadíronse as solucións ácido acético de alfa-naftilamina e ácido sulfanílico (Claus & Berkeley, 1986).

- **Proba de Voges Proskauer** (Voges & Proskauer, 1898). Para verificar a produción de acetoina, a cepa illada cultivouse en medio MV-RP a 37°C durante 72 horas e posteriormente engadíronse os reactivos de alfa naftol e KOH para o revelado.
- **Proba de produción de gas dende glucosa:** a cepa illada cultivouse durante 24 horas a 35°C en tubos con campá Durham en medio YNB ó que se lle engadou glucosa ó 2% (Claus & Berkeley, 1986).

3.3.3.4 Contido G+C do DNA

Para a análise do contido de G+ C, o DNA preparouse segundo Chun & Goodfellow, (1995). O contido mol% G+ C de DNA foi determinado usando o método de desnaturalización térmica (Mandel & Mamur, 1968).

3.3.3.5 Hibridación DNA-DNA

Para a hibridación DNA-DNA usouse o método desenrolado por Eza-ki et al., (1989); segundo as recomendacións de Willems et al., (2001).

3.3.3.6 Análise dos ácidos graxos

A análise de ácidos graxos celulares levouse a cabo polo servizo identificación e caracterización da Colección Española de cultivos tipo (CECT) (Valencia, España) seguindo o protocolo recomendado por MIDI (*Microbial Identification System*) (Sasser, 1990). A separación do contido celular de ácidos graxos realizouse nun cromatógrafo de gases “Agilent 6850”, e a análise posterior tivo lugar no sistema MIDI (*Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, versión 6.1 Newark, MIDI Inc.*) empregando os métodos TSBA6 ou CLIN6 MIDI (2008).

3.3.3.7 Outros estudos quimiotaxonómicos

Outras análises quimitaxonómicas foron levadas a cabo polo servizo de Identificación de DSMZ (Braunschweig, Germany). A cepa foi cultivada durante 48 horas en TSB (Becton Dickinson, BBL) a 28°C e 180 rpm. As quinonas respiratorias e os lípidos polares foron analizados como describiu Tindall (1990). Para as análises dos peptidoglicanos, as células hidrolizaronse con HCl a 100 °C durante 15 h. Seguidamente os hidrolizados sometéronse a cromatografía en capa fina en placas de celulosa usando o sistema de solvente de Rhuland et al. (1995).

3.4 Técnicas de análise de proteínas

3.4.1 Estudo do patrón proteico *fingerprint* das cepas bacterianas mediante MALDI-TOF MS

3.4.1.1 Extracción de proteínas para espectrometría de masas por MALDI-TOF MS

A extracción de proteínas baseouse no procedemento de extracción con etanol e ácido fórmico segundo as recomendacións de Bruker (Bruker Daltonics, Inc.).

A mostra biolóxica resuspendeuse en 300 µL de auga ultrapura para HPLC (Sigma-Aldrich GmbH). A mostra pode variar entre unha colonia e 10 mg. Seguidamente engadironse 900 µL de etanol absoluto e resuspendeuse para a inactivación dos microorganismos. Centrifugouse a 13.000 rpm durante 2 minutos e decantouse o sobrenádante. Volveuse centrifugar e retirouse do pellet o alcohol residual cunha pipeta. Deixouse secar ó aire ata que a mostra quedou libre de alcohol. Seguidamente engadiuse entre 1-80 µL de ácido fórmico ó 70% (Sigma-Aldrich GmbH) dependendo da cantidade de material biolóxico inicial, e resuspendeuse. Engadiuse o mesmo volume de ácido fórmico ó 70%, que anteriormen-

te de acetonitrilo (Sigma-Aldrich GmbH) e mestrouse. Centrifugouse a 13.000 rpm durante 2 minutos e recolleuse o sobrenádante.

3.4.1.2 Análise en espectrometría de masas MALDI-TOF MS

O análise por espectrometría de masas MALDI-TOF MS levouse a cabo no CETAL (Centro Tecnolóxico Agroalimentario). Tomouse 1 μL da extracción de proteínas nos spots da placa de aceiro pulido e tras o seu secado en temperatura ambiente, cubríronse con 1 μL da solución da matriz, unha solución saturada en ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

Os espectros foron xerados no MALDI-TOF Microflex LT/SH e levouse a cabo no modo automático, cun mínimo de 240 disparos láser para cada mostra. Os parámetros utilizados foron: Fonte de ion 1 (IS1) 20 kV Fonte de ion 2 (IS2) 18.4 kV; voltaxe da lente: 6 kV; Pulso de extracción do ion: 150 ns. Para o calibrado e o control de calidade do espectrometro de masas empregouse o *Bacterial test standard* (BTS) (Bruker Daltonics, Inc.). O perfil proteico xerado para cada mostra abarca uns m/z dende 2,000 ata 20,000, e a plataforma empregada para o seu análise foi MALDI *Biotyper* de Bruker.

3.4.1.3 Procesado de datos analizados por MALDI-TOF MS

Os espectros foron importados no *software ClinProTools* (Boelke et al., 2005) de Bruker para o post-procesado e a xeración dos patrons *fingerprint* de cada cepa con picos mais relevantes e reproducibles. A definición dos picos e a comparación entre espectros de distintas cepas levouse a cabo con este software. Realizáronse os test estatísticos dos datos e obtívose ó PCA (*principal components model*) (Bishop, 1999) entre as cepas analizadas, estes resultados foron representados nun diagrama tridimensional e outro bidimensional coa distribución dos picos, xerados polo *software*. Obtívose tamén un dendograma MSP (*Mean spectra projection*) onde se representan e comparan as distancias dos espectros proteicos de tódalas cepas analizadas.

3.4.2 Busca de péptidos biomarcadores mediante LC-MS/MS

3.4.2.1 Extracción de proteínas para espectrometría de masas por LC-MS/MS

As cepas recuperáronse dos medios en stock conxelados e seméntáronse en céspede en medio PCA 24 horas 31 °C, temperatura estandarizada para este protocolo. Coa asa de sementa tomouse unha cantidade considerable de biomasa e mesturouse con 100 μ L dunha solución de acetonitrilo ó 50% (50% ACN) (Merck, Darmstadt, Germany) e 1% de ácido trifluoroacético (1% TFA) (Acros Organics, NJ, USA). Despois de vortear, centrifugouse e tomouse o sobrenadante ó cal engadiuse a solución de lise (60 mm Tris- HCl pH 7.5, 1% lauril maltosido, 5 mm fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 1% ditiotriol (DTT), realizando un novo proceso de vorteadado. Tódalas análises foron realizados por triplicado.

3.4.2.2 Cuantificación da proteína soluble

As mostras foron cuantificadas empregando o métodos do ácido bicinconínico (Sigma Chemical Co., US).

Soluciones:

- **BCA:** Engadiuse 1 mL de sulfato de cobre en 50 mL de ácido bicinconínico. A solución debe prepararse no momento do seu uso.

Para a cuantificación da proteína soluble levouse a cabo un recta patrón en base a BSA (albumina de soro bovino). Para a cuantificación de cada mostra tomáronse por duplicado 50 μ L. Posteriormente, engadiuse 1 mL de BCA. As cubetas se incubaron durante 30 minutos a 37° C, matuvieronse 5 minutos a temperatura ambiente. Medíronse as absorbancias a 562 nm e a partir da ecuación da recta patrón calculáronse as concentracións de cada mostra (μ g/ μ L). Calculáronse os μ L de mostra necesaria para obter 100 μ g de mostra. Evaporouse o líquido dos 100 μ g de mostra mediante evaporación en vacío nun speed- vac (Hetovac

VR-1 e trampa de frío CT60E, Heto Lab), deixando o extracto seco. Finalmente, as mostras gardaronse para a súa conservación a -20°C .

3.4.2.3 Dixestión das proteínas con tripsina

A dixestión enzimática das proteínas inclúe os pasos de desnaturalización, redución, alquilación e como último paso a dixestión (Abril et al., 2018). Engadíronse $25\ \mu\text{L}$ de Urea 8M e $8.3\ \mu\text{L}$ de bicarbonato de amonio $25\ \text{mM}$ ($\text{pH} = 8$) en cada mostra. Seguidamente sonicouse durante 5 minutos e engadiuse $2.5\ \mu\text{L}$ de DTT ($100\ \text{mM}$), incubouse 1 hora a 37°C e engadiuse $40\ \mu\text{L}$ IAA (Iodoacetamida) ($500\ \text{mM}$) e $40\ \mu\text{L}$ de H_2O HPLC para alcadar unha concentración final de $50\ \text{mM}$ e que produzase a alquilación das proteínas. Incubouse 1 h a temperatura ambiente en escuridade e posteriormente engadíronse $400\ \mu\text{L}$ de bicarbonato de amonio ($25\ \text{mM}$; $\text{pH} = 8$). Para preparar a tripsina *sequence grade modified* (Promega), resuspendeuse ($20\ \mu\text{g}$) en $20\ \mu\text{L}$ de bicarbonato de amonio ($25\ \text{mM}$; $\text{pH} = 8$). Engadíronse $2\ \mu\text{L}$ de tripsina (Promega, WI, US) a cada mostra e incubáronse a 37°C toda a noite. Para acidificar a mostra ata un $\text{pH}=2$ engadiuse pequenas cantidades de ácido fórmico ó 5% comprobando con papel indicador.

3.4.2.4 Desalación e purificación dos péptidos

A resina das columnas MicrospinTM C18 (Hardvard Apparatus) laváronse engadindo $200\ \mu\text{L}$ de MeOH e tras esperar 10 minutos centrifugaronse 2 minutos a $1000\ \text{rpm}$. Seguidamente equilibrouse a resina engadindo $200\ \mu\text{L}$ dunha disolución 80% Acetonitrino/ 0.1% ácido fórmico. Centrifugouse durante 2 minutos a $1000\ \text{rpm}$. Este paso realizouse dúas veces. Engadíronse $200\ \mu\text{L}$ dunha disolución 2% ACN/0.1% FA, centrifugouse durante 2 minutos a $1000\ \text{rpm}$, este paso volveuse repetir unha vez máis. Tras equilibrar a resina, cargáronse $200\ \mu\text{L}$ de mostra e se centrifugou 2 minutos a $1000\ \text{rpm}$. Este paso repetiuse en volúmenes de $200\ \mu\text{L}$ ata que toda a mostra cargouse na columna. Para lavar

a columna engadíronse 200 μL dunha disolución 2% ACN/0.1% FA. Centrifugouse durante 2 minutos a 1400 rpm e repetiuse este paso dúas veces máis. Para eluir a mostra engadíronse á columna 200 μL dunha disolución 50% ACN/0.1% FA e se centrifugaron 2 minutos a 1400 rpm. Volveronse engadir 200 μL dunha disolución 50% ACN/0.1% FA, obtendo un volume final de 400 μL , o cal se secou mediante evaporación en vacío no speed- vac (Hetovac VR-1 e trampa de frío CT60E, Heto Lab), deixando o extracto seco. Gardouse para a súa conservación a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ata a súa análise en LC- MS/ MS.

3.4.2.5 Análise en espectrometría de masas LC-MS/MS

A análise levouse a cabo mediante un LC-ESI-IT MS/MS empregando un cromatografo *Proxeon EASY-nLC II Nanoflow system* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) acoplado ó espectrometro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) (Calo-Mata, Carrera, Böhme, Jm, & Cañas, 2016; Carrera et al., 2017; Carrera, Cañas, & Gallardo, 2013). A separación dos péptidos (2 μg) tivo lugar nunha columna de fase reversa (columna EASY-Spray, 50 cm \times 75 μm ID, PepMap C18, 2 μm partículas, 100 Å de tamaño de poro, Thermo Fisher Scientific) cunha precolumna de 10 mm (Accucore XL C18, Thermo Fisher Scientific), empregando un gradiente linear de 120 minutos dende 5 ata 35 % de solvente B (solvente A: 98% auga, 2% ACN, 0.1% FA; solvente B: 98% ACN, 2% auga, 0.1% FA) cunha taxa de fluxo de 300 nL/min. Para a ionización o voltaxe do espray foi de 1.95 kV e a $230\text{ }^\circ\text{C}$. Os péptidos foron analizados no modo positivo dende 400 a 1,600 amu (1 μscan), seguido da disociación inducida por colisión (CID) nun MS/MS (1 μscan) empregando un ancho de illamento de 3 amu e unha enerxía de colisión normalizada del 35%. As masas fragmentadas se estableceron en exclusión dinámica durante 30 s despois do segundo evento de fragmentación, e os ións cargados sen asignar excluíronse da análise de MS/MS.

3.4.2.6 Procesado de datos analizados por LC-MS/MS

Os resultados dos espectros obtidos por LC-ESI-IT MS/MS analizaronse fronte a base de datos UniProt/TrEMBL, tomando as entradas específicas para cada especie ou xénero a estudo (entradas revisadas e non revisadas) e empregando o SEQUEST-HT (Proteome Discoverer 2.1, Thermo Fisher Scientific). Tivéronse en conta as seguintes restricións para a busca: cortes semi-trípticos de ata 2 lugares “*missed cleavage*” e unha ventá de tolerancia de 1.2 Da para ións precursores e 0.6 Da para ions fragmentados do MS/MS. As modificacións variables permitidas foron as seguintes: oxidación da metionina (+15.99 Da), carbamidometilación da cisteína (+57.02 Da) e acetilación do N-terminal da proteína (+42.0106 Da). Finalmente, os resultados obtidos foron analizados estatisticamente co *Percolator algorithm* (Käll, Canterbury, Weston, Noble, & MacCoss, 2007). para validar os asinamentos dos péptidos, a taxa de falsa detección (FDR, false discovery rate) mantívose no 1%.

3.4.2.7 Selección de potenciais biomarcadores peptídicos.

Para o estudo da especificidade dos péptidos identificados por LC-MS/MS, utilizouse o algoritmo BLASTp (Altschul et al., 1990) para determinar as homoloxías que presentan ditos péptidos coas secuencias de proteínas rexistradas na base de datos NCBI. Para a análise de cada péptido modificáronse os parámetros do algoritmo BLASTp para incluír e excluír na busca o xénero e/ou a familia ao que pertence o microorganismo de cada péptido. Isto permíte determinar a especificidade dentro do xénero, especie ou cepa do péptido a estudo.





RESULTADOS E DISCUSIÓN



4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

4.1 Capítulo I: Busca de novos illados, identificación de contaminantes de leite condensado e, descrición de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov. e *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov.

A identificación dos microorganismos con alta tolerancia osmótica, illados dun sobre contaminado de leite condensado proveniente dunha fabrica de procesado de produtos lácteos e a descrición, e caracterización dunha cepa bacteriana coma unha nova subespecie de *Bacillus safensis*, constitúe a base deste capítulo. Seleccionáronse por morfoloxía de colonia e observación ó microscopio 1 cepa de levaduras das placas de YPD con cloranfenicol e 3 cepas de bacterias das placas de LB (Sigma Co.).

Tódalas cepas bacterianas (BC05, BC08 e BC09^T) e a levadura (BC03) illáronse dun cultivo en medio LB e YPD respectivamente, con sacarosa ó 30% como fonte de carbono para reproducir a alta osmolaridade presente no leite condensado. A cepa de levadura creceu tamén o cultivala en YPD ó 70% de sacarosa. Tódalas cepas illadas bacterianas son Gram positivas. Ó microscopio, a cepa BC03 presenta una morfoloxía típica de levaduras, mentres que as demais cepas bacterianas presentan unha morfoloxía bacilar.

4.1.1 Identificación das cepas de levaduras

4.1.1.1 Amplificación e secuenciación da rexión ITS

Realizouse unha extracción do DNA xenómico da cepa BC03 e posteriormente levouse a cabo a PCR para a amplificación do ITS, empregando os oligonucleótidos ITS1F e ITS1R (White et al., 1990). A banda resultante tras a electroforese cun tamaño aproximado de 250pb, ligouse co plásmido pUC19 e transformouse en *E. coli* TOP10. Realizouse

Resultados e Discusión

zouse a extracción plasmídica das colonias que presentaron o plásmido co inserto, e seguidamente mandouse a secuenciar cos oligonucleótidos M13F e M13R a *Secugen S.L.* ou *STAB vida*. As secuencias obtidas comparáronse coas secuencias da base de datos GenBank mediante a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990).

As secuencias cun 100% de similitude coa secuencia do ITS da cepa BC03 son as das especies *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ABT301^T, *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 12631^T e *Zygosaccharomyces mellis* CBS 736^T. Este fragmento do ITS non está completo para a especie *Zygosaccharomyces mellis* (Figura 12). A secuencia do ITS permitiunos establecer o xénero ó que pertence a cepa BC03 sendo este *Zygosaccharomyces*. Co fin de chegar a determinación da especie da cepa BC03 procedeuse a secuenciación de outro xene que permita distinguir entre especies.

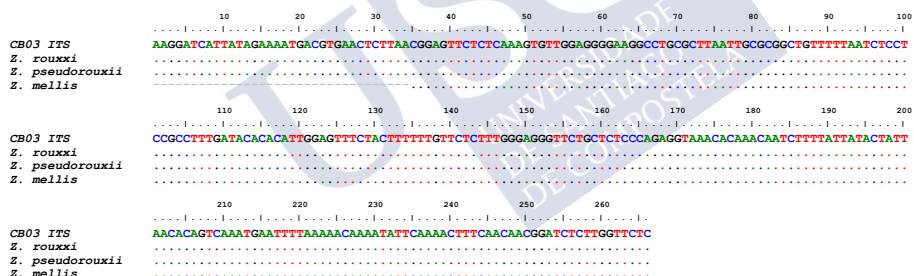


Figura 12. Alinhamento das secuencias do ITS da cepa BC03 e as das especies *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ABT301^T, *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 12631^T e *Zygosaccharomyces mellis* CBS 736^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspondelle unha cor diferente.

4.1.1.2 Deseño dos oligonucleótidos e a secuenciación da rexión *HIS3*:

O xene *HIS3* é un xene *housekeeping* que codifica para a proteína imidazol-glicerolfosfato desidratasa e presenta diferencias entre as especies próximas do xénero *Zygosaccharomyces*. Outros oligonucleóti-

dos do xene *HIS3* xa foron deseñados por Harrison et al. (2011) para especies do xénero *Zygosaccharomyces*.

Para o deseño dos oligonucleótidos Zigo1R e Zigo1F obtivéronse as secuencias das especies do xénero *Zygosaccharomyces* para o xéne *HIS3* da base de datos GenBank. A banda obtida tras electroforese cun tamaño aproximado de 200 pb, ligouse ó plásmido pUC19 e transformouse en *E. coli TOP10*. Realizouse a extracción plasmídica das colonias que presentaron o plásmido co inserto, e seguidamente mandouse a secuenciar cos oligonucleótidos M13F e M13R a *Secugen S.L.* ou *STAB vida*. As secuencias obtidas comparáronse coas secuencias da base de datos GenBank mediante a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990).

O fragmento do xene *HIS3* da cepa BC03 presenta una similitude do 100% coa especie *Z. rouxii* sendo está a especie máis próxima filoxenéticamente segundo os resultados obtidos (Figura 13).

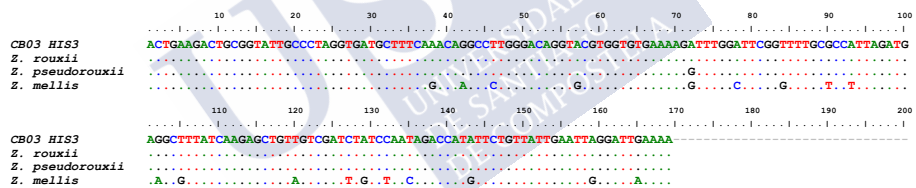


Figura 13. Secuencias do xene *HIS3* da cepa BC03 fronte as secuencias das especies *Zygosaccharomyces pseudorouxii* ABT301^T, *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 12631^T e *Zygosaccharomyces mellis* CBS 736^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferenzas, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

Os resultados da secuenciación do ITS onde as secuencias das especies máis próximas cun 100 % de similitude son las pertencentes as especies *Z. pseudorouxii* ABT301^T, *Z. rouxii* CBS 12631^T e *Z. mellis* CBS 736^T; e tras a análise do fragmento do xene *HIS3* a especie coa única secuencia idéntica a cepa BC03 é *Z. rouxii*. Ditos resultados suxiren que a cepa BC03 identificouse como a especie *Z. rouxii*.

4.1.2 Identificación das cepas bacterianas

4.1.2.1 Amplificación e secuenciación do 16S rRNA

Levou-se a cabo a extracción do DNA xenómico das 3 cepas bacterianas e realizouse primeiramente unha PCR para amplificar parcialmente a secuencia do xene 16S rRNA das cepas cos oligonucleótidos U515F e U1052R (Wang & Qian, 2009). Segundo os resultados obtidos, a PCR para amplificar a secuencia completa do 16S rRNA das cepas de maior interese, BC08 e BC09^T, levouse a cabo cos oligonucleótidos p8FPL-2 e p1492R+G (Figura 14A). As bandas resultantes obtidas tras electroforese cun tamaño aproximado de 600 pb e 1450 pb respectivamente como corresponde con cada par de cebadores, ligáronse co plásmido pUC19 e transformáronse en *E. coli TOP10*. Os transformantes testáronse directamente dende colonia por PCR empregando os oligonucleótidos M13F e M13R, esperando unha banda de tamaño 690 pb (Figura 14B) ou 1500 pb segundo corresponda en cada caso para os transformantes que integraran o produto de PCR no vector pUC19. Outro método empregado no *screening* foi o corte do plásmido extraído coas enzimas PstI e EcoRI, co cal obtivéronse 2 bandas tras electroforese. Unha banda co tamaño do inserto e outra de 2640 pb correspondente ó vector pUC19.

As colonias que presentan o plásmido co inserto cultiváronse en medio líquido para a extracción do DNA plasmídico o cal mandouse a secuenciar cos oligonucleótidos M13F e M13R a *Secugen S.L.* o *STAB vida*. As secuencias obtidas comparáronse contra a base de datos das secuencias do 16S rRNA de EzTaxon (*EzBioCloud Identify Service*) (Yoon et al., 2017; Kim et al., 2012) para realizar a identificación das diferentes especies.

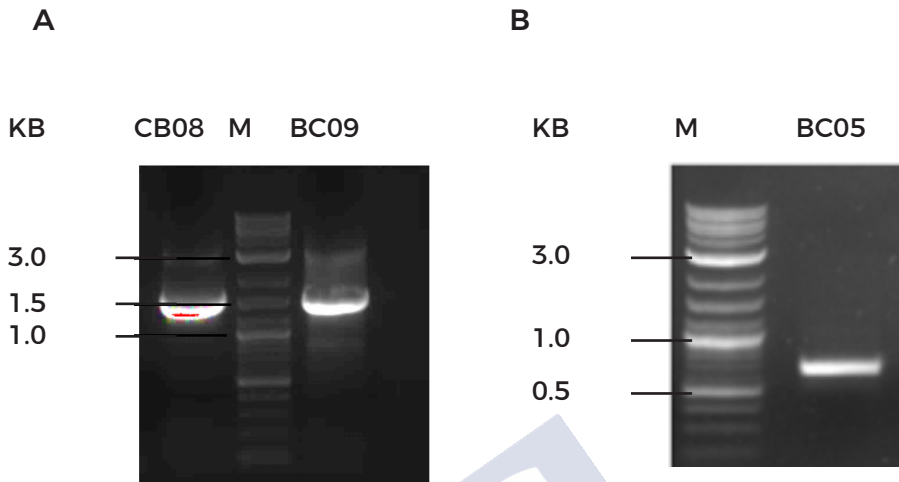


Figura 14. Electroforese en xel de agarosa dos fragmentos do xen 16S rRNA. A; Electroforese en xel de agarosa das PCRs do xene 16S rRNA completo cos cebadores p8FPL-2 e p1492R+G sobre o xenómico das cepas BC08 e BC09^T. As bandas presentan o tamaño esperado de 1450 pb. B; Electroforese en xel de agarosa do fragmento parcial de 16S rRNA da cepa BC05 empregando os oligonucleótidos M13 sobre a extracción plasmídica de *E. coli* transformada, tamaño esperando da banda 690 pb. M; marcador.

Na figura 15 representase o aliñamento das secuencias parciais do 16S rRNA con maior homoloxía á secuencia do xene da cepa BC05. A secuencia parcial da cepa BC05 presenta unha gran similitude (99%) coas secuencias do 16S rRNA das cepas tipo *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T, *Paenibacillus brasilensis* PB172^T, *Paenibacillus peoriae* DSM 8320^T, *Paenibacillus jamilae* CECT 5266^T, *Paenibacillus terrae* AM141^T e *Paenibacillus kribbensis* AM49^T, coa súa máxima homoloxía para *P. polymyxa* ATCC 842^T cun 99.8% de homoloxía.

Resultados e Discusión

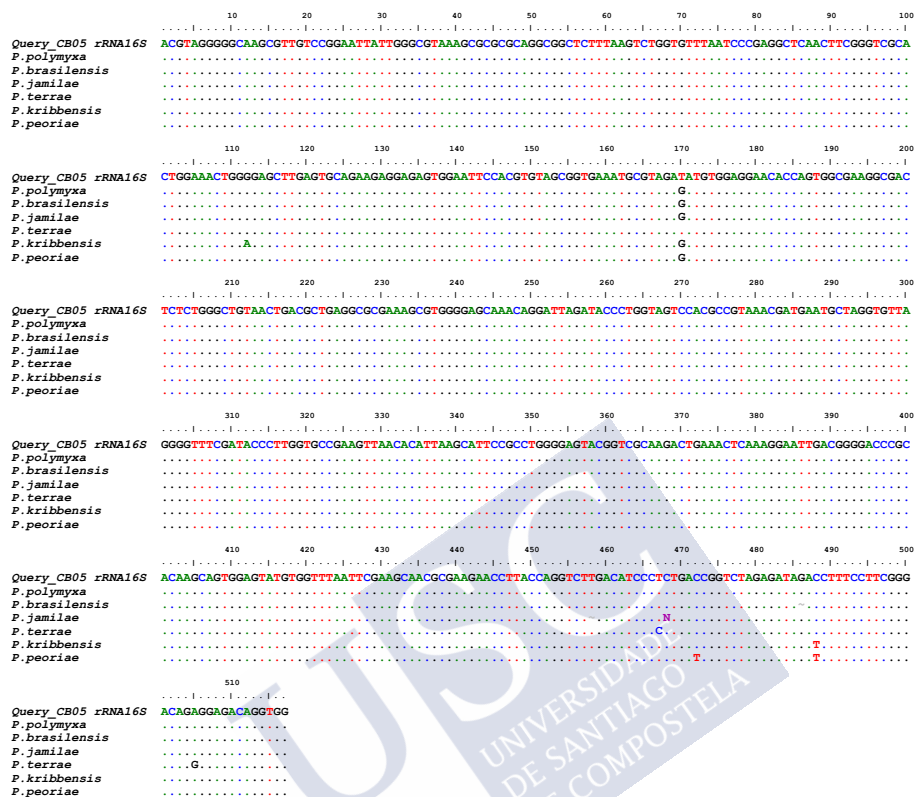


Figura 15. Secuencias parciais do 16S rRNA da cepa BC05, *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T, *Paenibacillus brasilensis* PB172^T, *Paenibacillus peoriae* DSM 8320^T, *Paenibacillus jamilae* CECT 5266^T, *Paenibacillus terrae* AM141^T e *Paenibacillus kribbensis* AM49^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

As secuencias do 16S rRNA presentes na base de datos EzTaxon (Yoon et al., 2017) con maior similitude á secuencia do 16S rRNA da cepa BC08 son *Bacillus sonorensis* NBRC 101234^T, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T, *Bacillus glycinifermentans* GO-13^T, e *Bacillus haynesii* NRRL B-41327^T, con unha similitude del 99%, e *B. paralicheniformis* KJ-16^T con 100% de homoloxía (Figura 16).



Figura 16. (Continua)

Resultados e Discusión

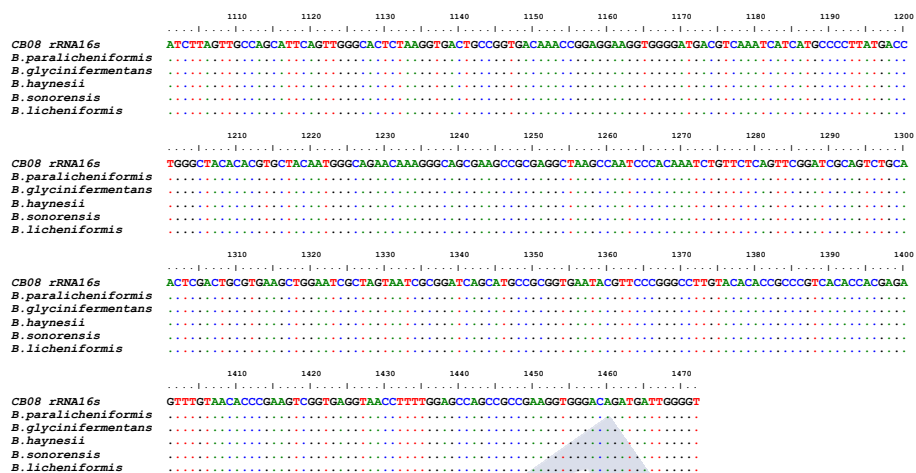


Figura 16. Aliñamento das secuencias do 16S rRNA da cepa BC08 fronte as cepas tipo *B. sonorensis* NBRC 101234^T, *B. licheniformis* ATCC 14580^T, *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. glycinifermentans* GO-13^T e *B. haynesii* NRRL B-41327^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

As especies máis próximas a BC09^T son *Bacillus safensis* FO-36b^T e *Bacillus australimaris* MCCC 1A05787^T cun 100% e 99.9% de similitude respectivamente coas secuencias das cepas tipo do 16S rRNA obtidas da base de datos EzTaxon (Yoon et al., 2017) (Figura 17).

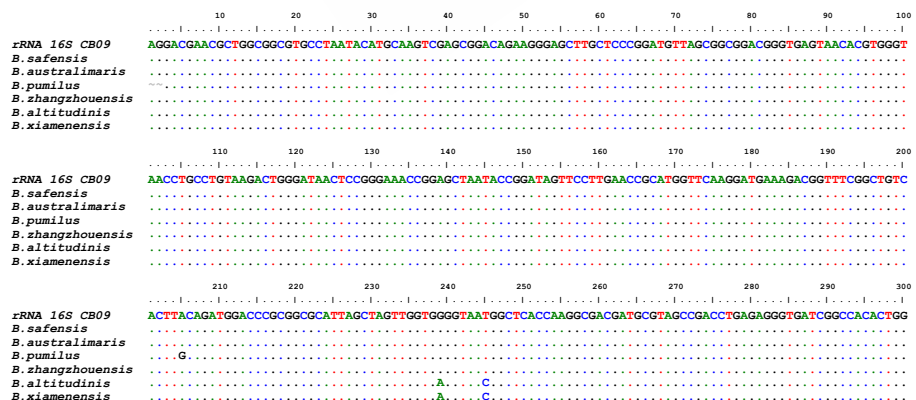


Figura 17. (Continua)



Figura 17. (Continua)

Resultados e Discusión

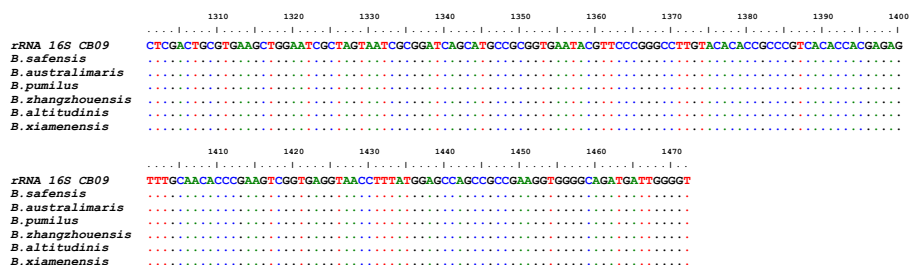


Figura 17. Alíñamento das secuencias do xene 16S rRNA da cepa BC09^T, e as cepas tipo de *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* NH71_1^T, *B. zhangzhouensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferenzas, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

A secuenciación do xene 16S rRNA permitiunos identificar o xénero ó que pertencen as cepas illadas así como coñecer as especies máis próximas a elas. Das cepas bacterianas illadas, 2 pertencen ó xénero *Bacillus* (BC08 e BC09^T), mentres que BC05 pertence ó xénero *Paenibacillus*. Co fin de chegar a determinación da especie correspondente a cada cepa procedeuse a secuenciación doutros xenes que permiten distinguir entre especies.

4.1.2.2 Deseño dos oligonucleótidos e secuenciación de *gyrB*

Segundo as secuencias do 16S rRNA, dous das bacterias illadas pertencen a especies do xénero *Bacillus* e outra a *Paenibacillus*. Para o deseño de novos oligonucleótidos estudáronse os xenes recollidos para as especies dos xéneros *Bacillus* e *Paenibacillus* na base de datos GenBank.

Seleccionouse o xene *gyrB* por presentar na súa secuencia diferenzas entre as distintas especies de *Bacillus* e por ser un dos poucos xenes secuenciados para todas elas a excepción do 16S rRNA. Tamén foi reportado que *gyrB* é un bo xene empregado para a discriminación entre especies de *Bacillus* contaminantes de alimentos (Caamaño- Antelo et al., 2015).

Primeiramente deseñáronse os oligonucleótidos ScrBaci1pbF e ScrBaci311pbR (Figura 18) para levar a cabo a amplificación dun fragmento do xene *gyrB* das cepas. Este fragmento tamén é empregado para distinguir entre especies noutros traballos (Satomi et. al, 2006). O longo do estudo, deseñáronse os oligonucleótidos Gyrb1pF e GyrbR para a secuenciación (1169 nucleótidos) completa do xene *gyrB* das cepas BC08 e BC09^T co fin de obter máis información destas cepas.

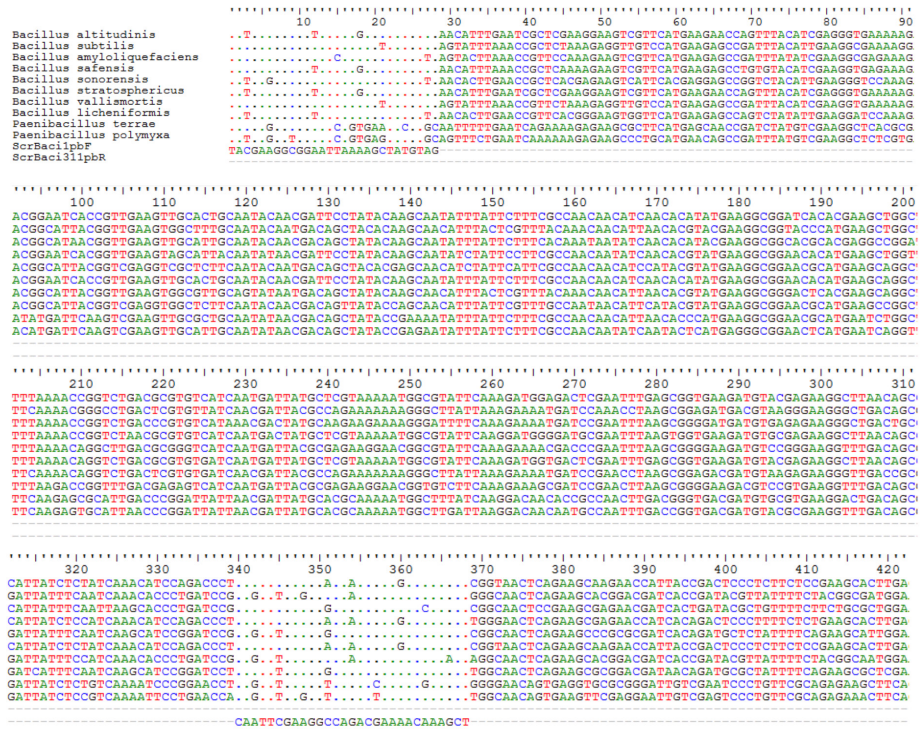


Figura 18. Alineamento dos oligonucleótidos deseñados dos xenes de *gyrB* (ScrBaci1pbF e ScrBaci311pbR) coas secuencias das especies do xénero *Bacillus* e *Paenibacillus* obtidas do GenBank. Os puntos corresponden a coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

Resultados e Discusión

As bandas resultantes da PCR obtidas tras electroforese cun tamaño aproximado de 360pb ou 1400 pb segundo corresponde con cada par de oligonucleótidos, ligáronse co plásmido pUC19 e transformáronse en *E. coli TOP10*. Os transformantes testáronse directamente dende colonia por PCR empregando os oligonucleótidos M13F e M13R, ou por restrición tras a extracción do DNA plasmídico das colonias seleccionadas, o cal foi cortado con PstI e EcoRI. As colonias que presentan o plásmido co inserto cultiváronse en medio líquido para a extracción do DNA plasmídico, o cal mandouse a secuenciar cos oligonucleótidos M13F e M13R a *Secugen S.L.* ou *STAB vida*. Empregouse a ferramenta bioinformática BLASTn (Altschul et al., 1990) coas secuencias obtidas comparándoas coas secuencias do xene *gyrB* da base de datos GenBank das especies de *Bacillus* e *Paenibacillus* analizadas anteriormente para o estudo do xene 16S rRNA.

Tras a secuenciación dos resultados da cepa BC05, estes non coincidiron co fragmento do xene *gyrB* para o cal deseñáronse os oligonucleótidos. Sen embargo, obtívose unha secuencia de 160pb correspondente a unha proteína GNAT da familia acetiltransferasa. Dita proteína corresponde a unha superfamilia moi grande de enzimas que distribúense universalmente na natureza e empregan acil-CoAs para acetilar os sustratos (Vetting et al., 2005). A secuencia de 160 pb é idéntica a secuencia do mesmo xene para a especie *P. polymyxa* mentres que presenta similitudes mas baixas coas outras especies próximas estudadas para o xene 16S rRNA.

As secuencias do xene *gyrB*, da base de datos do GenBank con maior similitude á secuencia da cepa BC08, son aquelas pertencentes as especies *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. haynesii* NRRL B-41327^T e *B. licheniformis* ATCC 14580^T con unhas similitudes do 96.6%, 96.0% e 95.9%, respectivamente (Figura 19).

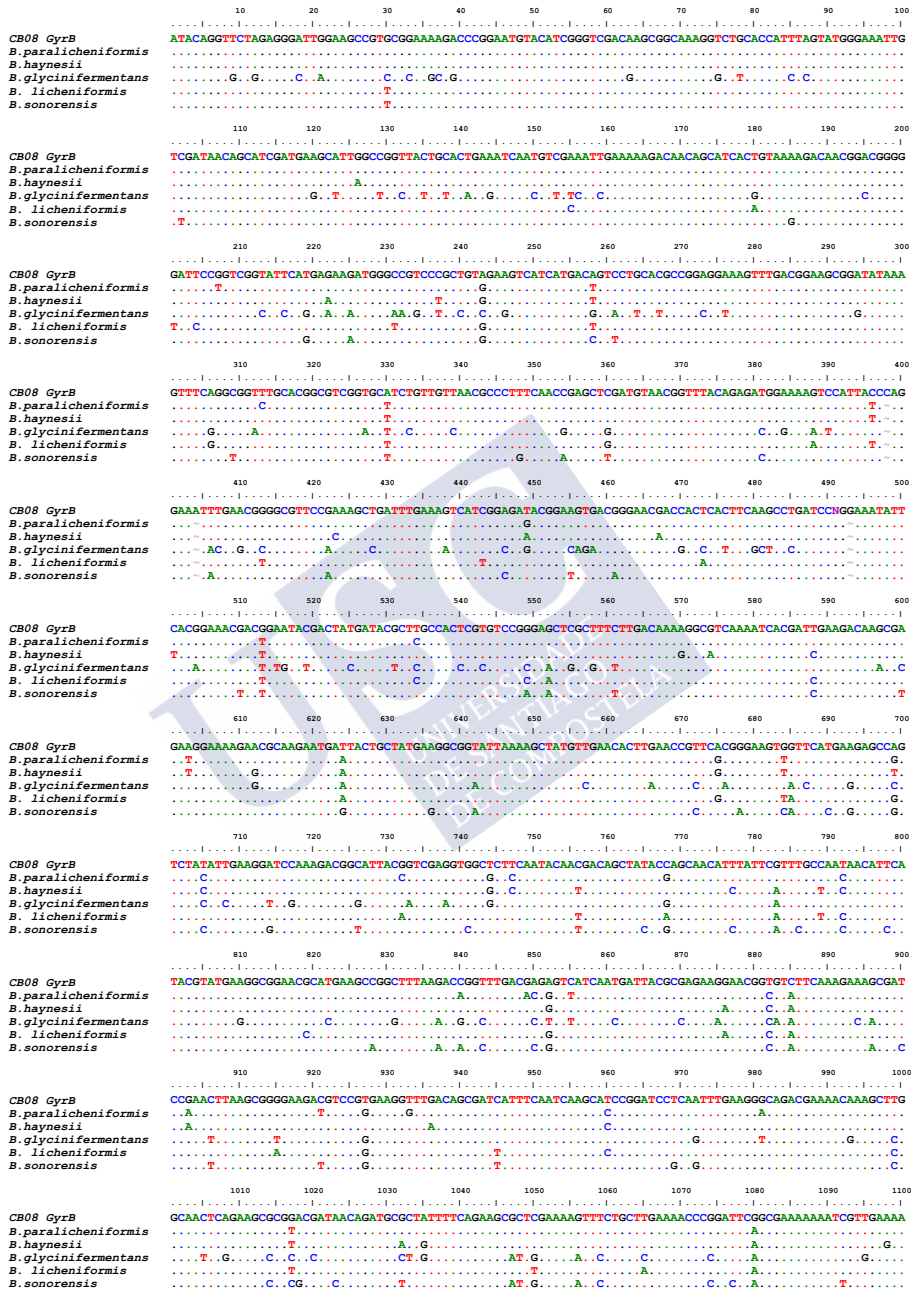


Figura 19. (Continua)

Resultados e Discusión

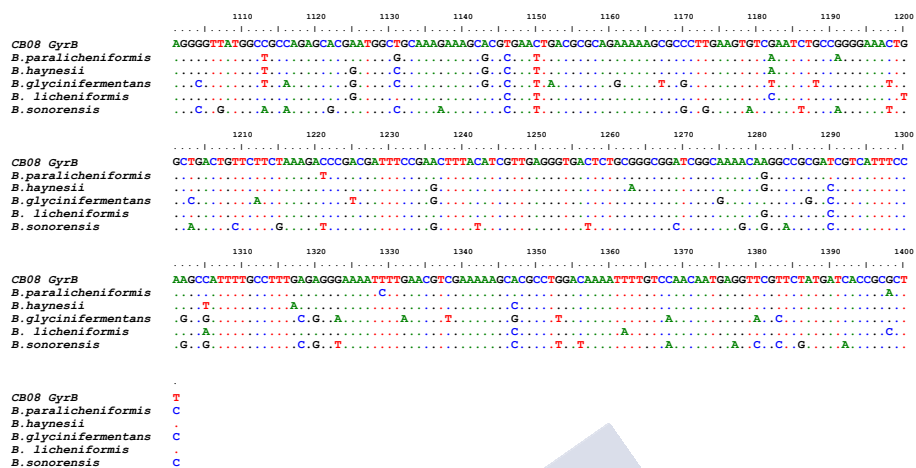


Figura 19. Secuencias do xene *gyrB* da cepa BC08 fronte as cepas tipo *Bacillus sonorensis* NBRC 101234^T, *B. licheniformis* ATCC 14580^T, *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. glycinifermentans* GO-13^T e *B. haynesii* NRRL B-41327^T. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspondelle unha cor diferente.

As secuencias do xene *gyrB* con maior similitude a cepa BC09^T da base de datos do GenBank, son aquelas pertencentes as especies *B. safensis* FO-36^T e *B. australimaris* NH71_1^T cunhas similitudes do 97.8% e 95.2%, respectivamente (Figura 20).

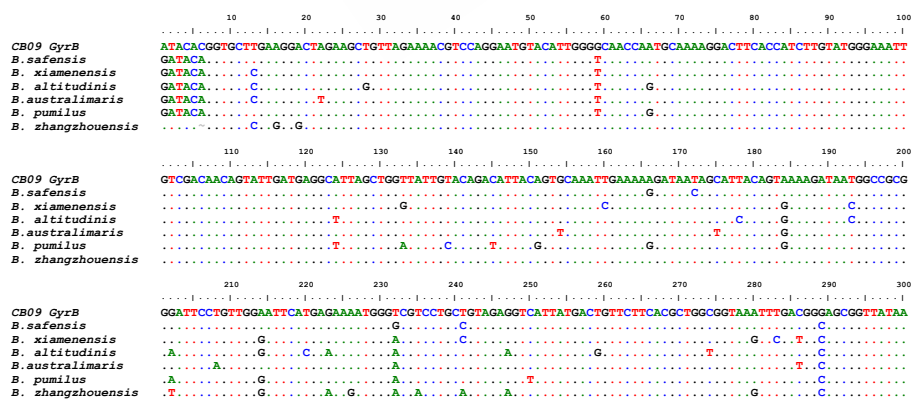


Figura 20. (Continua)

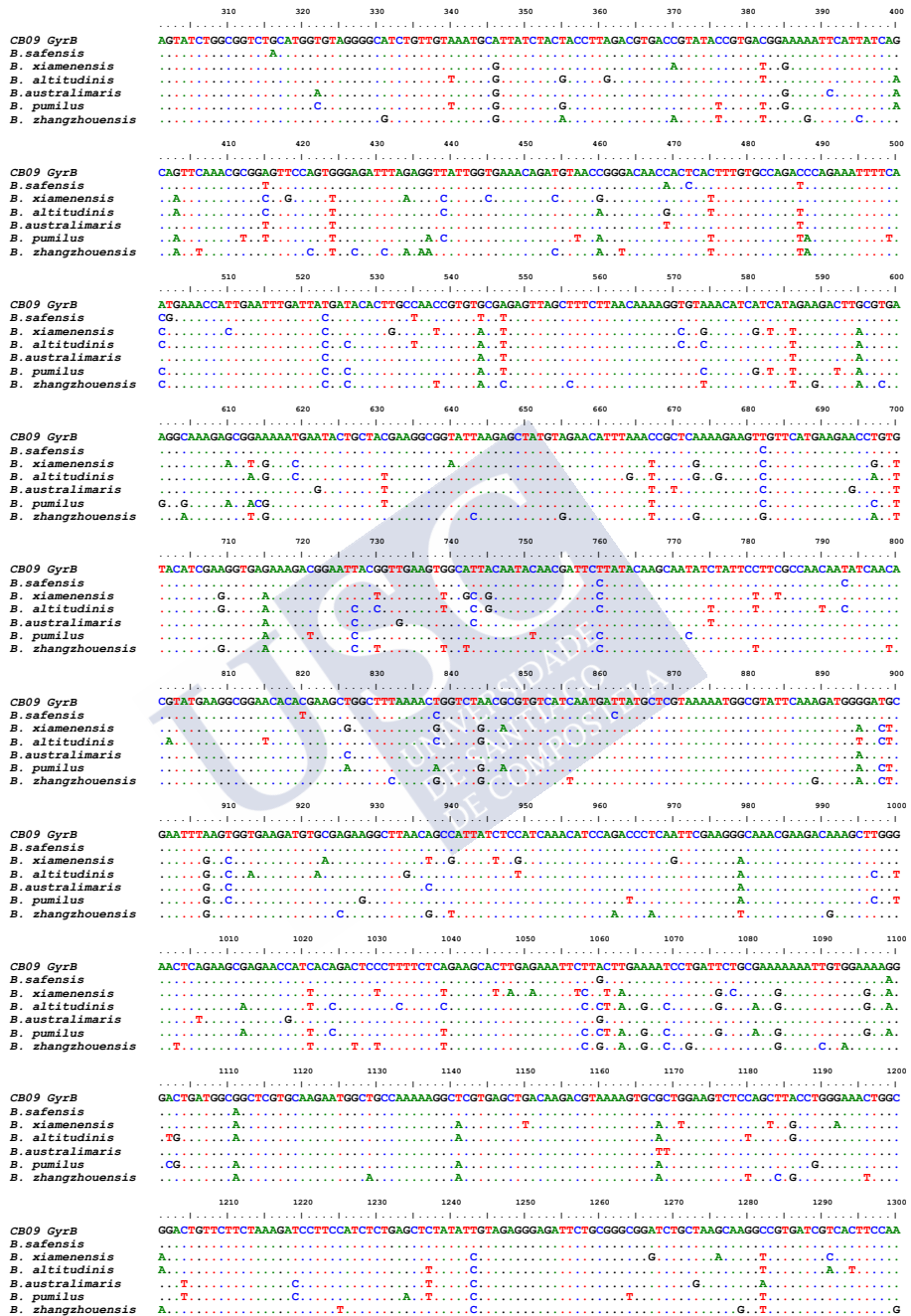


Figura 20. (Continua)

Resultados e Discusión

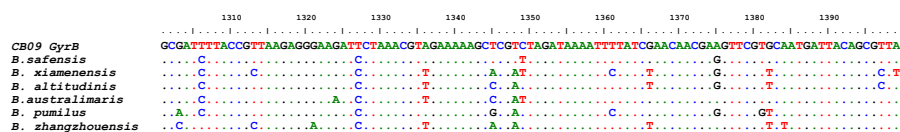


Figura 20. Alinamento das secuencias do xene *gyrB* de las cepa BC09^T, e as cepas tipo de *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* NH71_1^T, *B. zhagzhoensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T. Os puntos corresponden a coincidencias e as letras as diferenzas, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspondelle unha cor diferente.

4.1.2.3 Secuenciación do xene *tuf*

O estudo do xene *tuf* considerouse unha boa opción para a distinción entre especies de *Bacillus* próximas taxonómicamente, contaminantes de alimentos (Caamaño-Antelo et al., 2015), e para aportar máis información á obtida pola secuenciación dos xenes 16S rRNA e *gyrB* das cepas BC08 e BC09^T.

A PCR do xene *tuf* levouse a cabo cos oligonucleótidos *tufGPF* e *tufGPR* (Caamaño-Antelo et al., 2015). As bandas resultantes da PCR obtidas tras electroforese cun tamaño aproximado de 750 pb, ligáronse co plásmido pUC19 e transformáronse en *E. coli* TOP10. Os transformantes testáronse do mesmo xeito que para a secuenciación dos xenes descritos en apartados anteriores. As colonias que presentan o plásmido co inserto cultiváronse en medio líquido para a extracción do DNA plasmídico, e mandouse a secuenciar cos primers M13F e M13R. Empregouse a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990) coas secuencias obtidas e comparáronse coas secuencias do xene *tuf* da base de datos GenBank das especies de *Bacillus* analizadas anteriormente para o estudo do 16S rRNA e *gyrB*.

As secuencias do xene *tuf* con maior similitude á cepa BC08 da base de datos do GenBank son aquelas pertencentes as especies *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. haynesii* NRRL B-41327^T e *B. licheniformis* ATCC 14580^T con unhas similitudes do 100%, 96.4% e 96.3%, respectivamente (Figura 21).

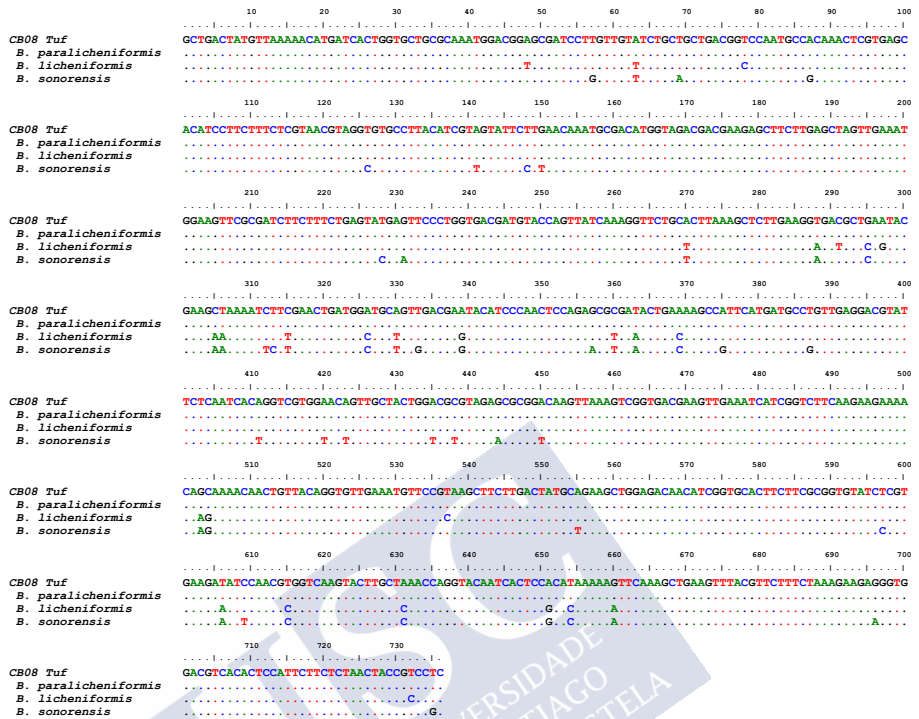


Figura 21. Secuencias parciais do xene *tuf* da cepa BC08 fronte as cepas tipo *B. sonorensis* NBRC 101234^T, *B. licheniformis* ATCC 14580^T, *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. glycinifermentans* GO-13^T e *B. haynesii* NRRL B-4132^T. Os puntos corresponden a coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

As secuencias do xene *tuf* con maior similitude a cepa BC09^T da base de datos do GenBank son aquelas pertencentes as especies *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* NH7I_1^T e *B. zhagzhoensis* DW5-4 con unhas similitudes de 99.5%, 99.1% e 99.3% respectivamente (Figura 22).

Resultados e Discusión

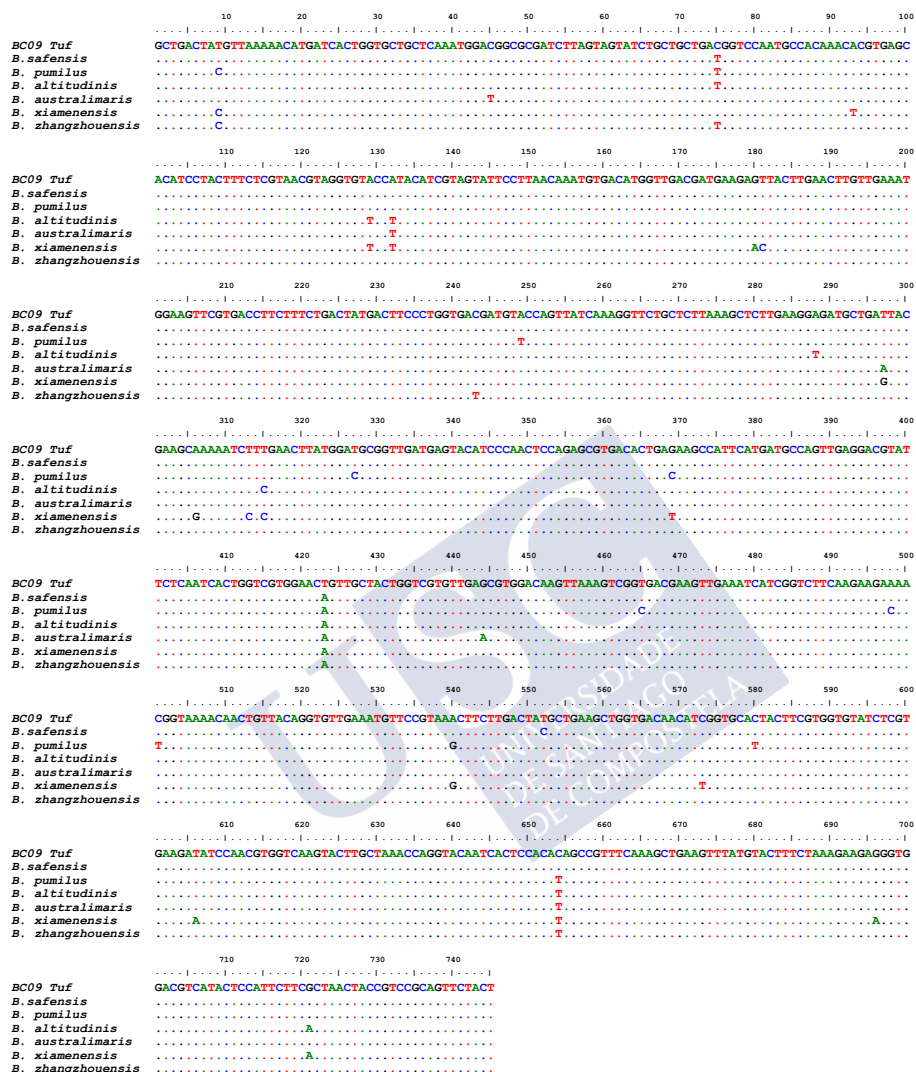


Figura 22. Aliñamento das secuencias do xene *tuf* da cepa BC09^T, e as cepas tipo de *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* NH71_1^T, *B. zhagzhoensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b. Os puntos corresponden as coincidencias e as letras as diferencias, entre os nucleótidos das distintas secuencias con respecto a primeira. A cada nucleótido correspóndelle unha cor diferente.

Segundo os resultados obtidos para a cepa BC05, nos que a secuencia parcial do 16S rRNA presenta unha similitude arredor do 99% coas secuencias do 16S rRNA das cepas tipo *P. brasiliensis* PB172^T, *P. peoriae* DSM 8320^T, *P. jamilae* CECT 5266^T, *P. terrae* AM141^T e *P. kribbensis* AM49^T, coa súa máxima homoloxía para *P. polymyxa* ATCC 842^T cun 99.8% de homoloxía, e tendo en conta que o fragmento da proteína GNAT secuenciado fortuitamente de 160 pb é idéntico a da especie *P. polymyxa* e presenta diferencias coas demais especies próximas; podemos determinar que a cepa BC05 é moi próxima filoxenéticamente a *P. polymyxa* e que con moita probabilidade pertence a dita especie.

Aínda que nos últimos anos, a secuenciación do 16S rRNA é o método máis común para a rápida identificación de bacterias e para establecer relacións filoxenéticas, o xénero *Bacillus* é un xénero moi heteroxéneo, que inclúe especies moi relacionadas e son difíciles de discriminar, especialmente cando empréganse xenes moi conservados coma o 16S rRNA. Para unha mellor discriminación, o uso de outros xenes ben conservados coma son o TU factor de elongación (*tuf*) e a subunidade β da DNA girasa (*gyrB*) entre outros, considéranse unha boa opción para discriminar entre especies do xénero *Bacillus* contaminantes de alimentos (Caamaño-Antelo et al., 2015); coma neste caso empregáronse para o estudo de identificación das cepas BC08 e BC09^T.

Segundo os resultados obtidos para a cepa BC08 as secuencias do 16S rRNA presentes na base de datos EzTaxon (Yoon et al., 2017) con maior similitude a secuencia del 16S rRNA da cepa BC08 son *B. sonorensis* NBRC 101234^T, *B. licheniformis* ATCC 14580^T, *B. glycinifermentans* GO-13^T e *B. haynesii* NRRL B-41327^T, con unha similitude do 99%, e *B. paralicheniformis* KJ-16^T con 100% de homoloxía. Por outro lado, as secuencias do xene *gyrB* con maior similitude a da cepa BC08 da base de datos do GenBank son aquelas pertencentes as especies *B. paralicheniformis* KJ-16^T, *B. haynesii* NRRL B-41327^T e *B. licheniformis* ATCC 14580^T con unhas similitudes do 96.6%, 96.0% y 95.9%, respectivamente. Mentres que para

o xene *tuf* a secuencia da cepa BC08 presenta un 100% de similitude coa especie *B. paralicheniformis* KJ-16^T. Deste xeito, a comparación entre secuencias do xene *tuf*, o cal estableceuse previamente como un bo método para distinguir entre especies de *Bacillus* contaminantes de alimentos segundo Caamaño-Antelo et al. (2015), e tendo en conta as secuencias do xene *gyB* e do 16S rRNA estableceuse que a cepa BC08 encontrase estreitamente relacionada coa especie *B. paralicheniformis*. Estes datos indican a posibilidade de que a cepa BC08 pertenza con probabilidade a unha nova subespecie de *B. paralicheniformis*.

Segundo os resultados obtidos para a cepa BC09^T as secuencias do 16S rRNA presentes na base de datos EzTaxon (Yoon et al., 2017) con maior similitude a secuencia do 16S rRNA da cepa BC09^T son *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T cun 100% e 99.9 % de similitude respectivamente coas secuencias das cepas tipo do 16S rRNA obtidas da base de datos Eztaxon. Ademais, as secuencias do xene *gyrB* con maior similitude a dita cepa na base de datos do GenBank son *B. safensis* FO-36^T e *B. australimaris* NH7I_1^T cunhas similitudes do 97.8% e 95.2%, respectivamente. As secuencias do xene *tuf* con maior similitude a cepa BC09^T da base de datos do GenBank son aquelas pertencentes as especies *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* NH7I_1^T e *B. zhagzhoensis* DW5-4 cunhas similitudes de 99.5%, 99.1% e 99.3% respectivamente, pero ningunha é idéntica a ela. Os resultados anteriores, e os de certas probas fenotípicas (hibridación DNA-DNA) realizadas nun primer momento, corroboran certas diferenzas entre a cepa BC09^T e as especies máis próximas segundo a información recollida na literatura (Satomi et al., 2006; Liu et al., 2016). Tendo en conta tódolos resultados da cepa BC09^T, decidiuse realizar un traballo máis en profundidade co fin de caracterizar esta cepa illada dun sobre contaminado de leite condensado.

No caso da cepa BC08, a especie *B. paralicheniformis* (Dunlap et al., 2015) non fora descrita no momento da secuenciación comple-

ta do xene 16S rRNA e do xene *gyrB*. A intencionalidade fora a caracterización e estudo máis en profundidade de dita cepa para a súa descrición como nova especie. Deste xeito, no momento da publicación de *B. paralicheniformis* como nova especie e debido a posibilidade de descrición de novas subespecies de forma inminente tras a descrición da especie, decidiuse pospor o estudo máis en profundidade. Por outro lado, pretendese estudar no futuro a posibilidade de describir BC08 como nova especie ou subespecie de *B. paralicheniformis*.

4.1.3 Caracterización da cepa BC09^T

Debido ós resultados das secuenciación dos xenes 16S rRNA, *gyrB* e *tuf* da cepa BC09^T os cales suxiren a posibilidade de establecer dita cepa como unha nova especie ou subespecie, levouse a cabo un estudo xenotípico, quimiotaxonómico e fenotípico máis minucioso e completo. En base a estes resultados expostos nos seguintes apartados a cepa BC09^T propónse como unha nova subespecie co nome de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov. (Abril et al., 2019). A cepa tipo da nova subespecie é BC09^T (=LMG 30124^T, = CECT 9344^T) a cal atopase nas coleccións de cultivo tipo española e belga.

4.1.3.1 Caracterización morfolóxica, macroscópica e microscópica

A cepa BC09^T illada do sobre de leite condensado presenta unhas colonias redondeadas, de cor branco crema, opacas, non luminescentes e con marxes irregulares cultivadas en medio TSA (Figura 23). As células de BC09^T son Gram positivas, presentan unha morfoloxía bacilar, mobilidade mediante un flaxelo polar (0.6–0.8 µm de ancho e 1.3–2.5 µm de largo) (Figura 24) e produce esporas centrais ovaladas (Figura 25).

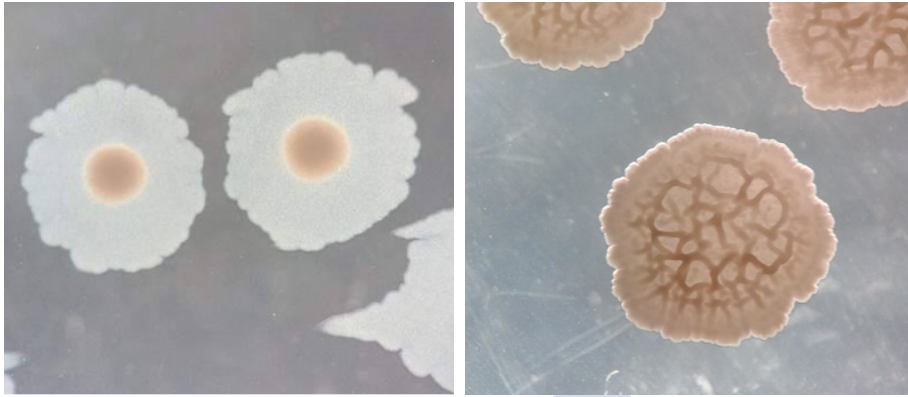


Figura 23. Colonias das cepas BC09^T (esquerda) e *Bacillus safensis* FO-36b^T (dereita) tras 10 días cultivadas en TSA nas mesmas condicións.

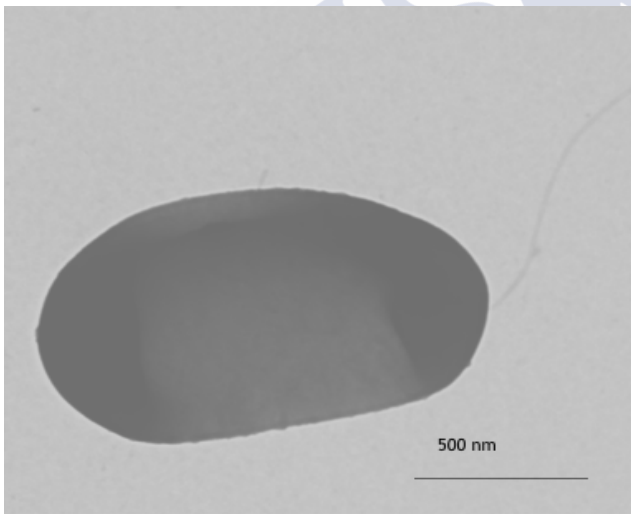


Figura 24. Imaxe ó microscopio electrónico (TEM) onde se amosa o flaxelo polar da cepa BC09^T.

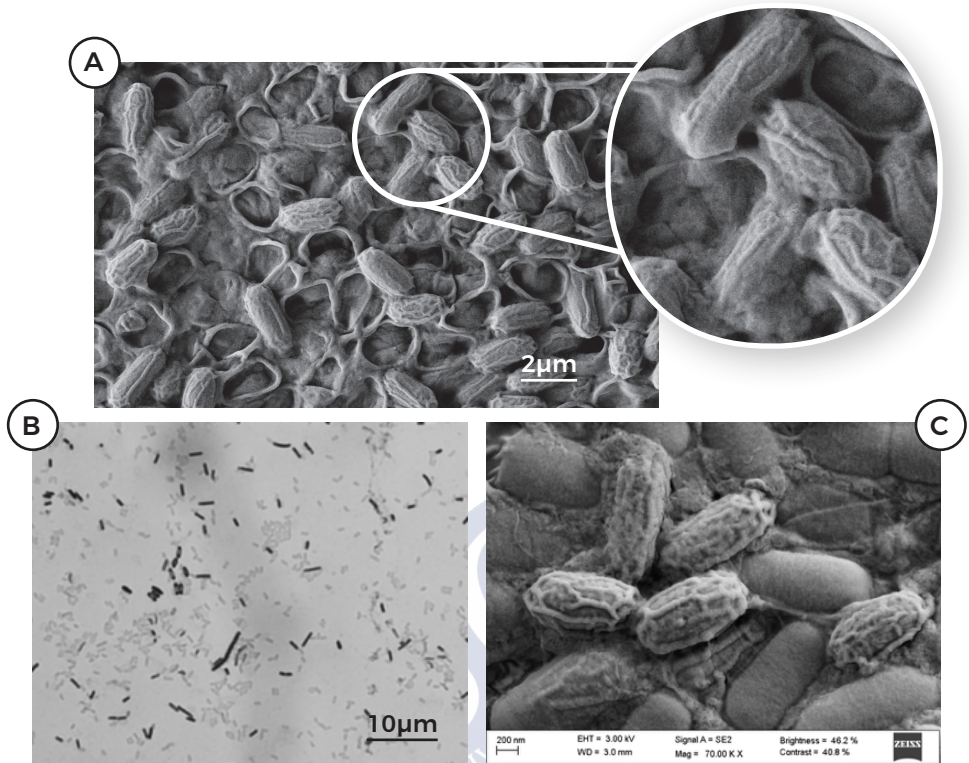


Figure 25. Imaxes ó microscopio óptico (A) e microscopio de barrido de emisión de campo (FESEM) (B) onde se amosan as esporas ovales producidas pola cepa BC09^T e (C) pola cepa *Bacillus safensis* FO-36b^T.

As esporas da cepa BC09^T son practicamente idénticas (Figura 25) ás esporas de *Bacillus safensis* FO-36b^T, a cepa máis próxima filoxenéticamente como se explica nos seguintes apartados. Obsérvanse as mesmas irregularidades no seus exosporios para as dúas cepas. Por outro lado pódese apreciar na figura 23 como as colonias das dúas cepas, crecidas nas mesmas condicións durante 10 días en TSA, presentan diferente morfotipo. Ambas colonias presentan marxes irregulares, típicos do xénero *Bacillus* (Satomi et. al 2006; Liu et al., 2016; Abril et al., 2019) e son de cor crema. A colonia de BC09^T presenta unha maior concentración de células no centro da colonia o que fai que a colonia

elévase neste punto. A colonia de *Bacillus safensis* FO-36b^T, polo contrario é irregular en todo o seu contorno, formando betas dende o interior ata o exterior a medida que a colonia crece.

4.1.3.2 Estudo xenotípico

Os códigos de acceso do GenBank/EMBL para as secuencias dos xenes 16S rRNA e *gyrB* da cepa BC09^T son KY990920 e MF140243 respectivamente.

4.1.3.2.1 Árbores filoxenéticas dos xenes 16S rRNA e *gyrB*

Como xa se expuxo nos apartados anteriores as especies máis próximas á cepa BC09^T son *Bacillus safensis* FO-36b^T e *Bacillus australimaris* MCCC 1A05787^T cun 100% e 99.9% de similitude para as secuencias de 16S rRNA, respectivamente. Para a comparación das secuencias do xene 16S rRNA (1473 nucleotidos) xerouse a árbore filoxenética coas secuencias das especies máis próximas, para establecer as distancias filoxenéticas entre elas. Tomáronse as secuencias do 16S rRNA das cepas *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. zhagzhoensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T con maior similitude a secuencia de BC09^T da base de datos de EnzTaxon (Táboa 10) e construíuse a árbore, mediante o programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) baseándose nos modelos de análise NJ (*Neighbour-Joining*) (Saitou & Nei, 1987) e ML (*Maximum-Likelihood*) (Rogers & Swofford, 1998) (Figura 26). Nesta árbore pódese apreciar a presenza dun *cluster* coas especies *Bacillus safensis* FO-36b^T, *Bacillus australimaris* MCCC 1A05787^T e a cepa BC09^T, dentro de outro *cluster* máis amplo coas especies con similitudes por debaixo do 99%.

Táboa 10. Códigos de acceso do 16S rRNA das cepas tipo e BC09^T.

Especie/Cepa	Código de acceso 16s rRNA
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	KY643639
<i>Bacillus velezensis</i> BCRC 17467 ^T	EF433407
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T	NR_112685
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T	KU836854
<i>Bacillus mojavensis</i> NBRC 15718 ^T	NR_112725
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T	NR_027552
<i>Bacillus vallismortis</i> BCRC 17183 ^T	EF433404
<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070 ^T	AB021181
BC09 ^T	KY990920
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	NR_041794
<i>Bacillus australimaris</i> MCCC 1A05787 ^T	JX680098
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	NR_043242
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	NR_042337
<i>Bacillus xiamenensis</i> HYC-10 ^T	NZ AMSH01000114
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 ^T	JX680133
<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 ^T	NR_115063
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp lactis</i> DSM 20072 ^T	AY050173

Resultados e Discusión

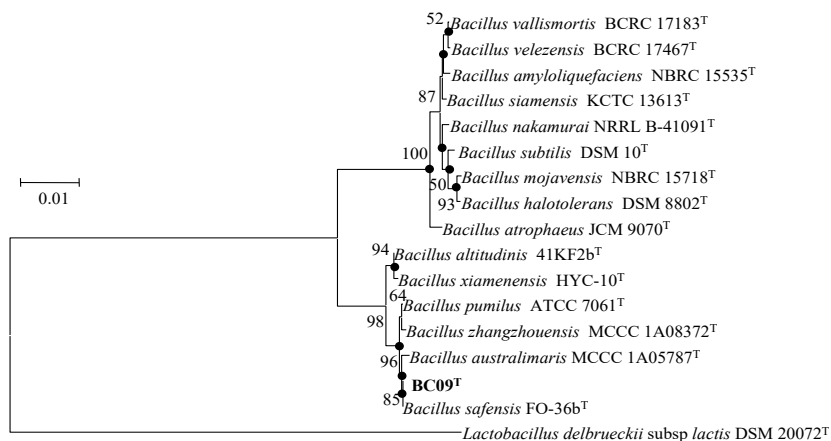


Figura 26. Arbore filoxenética baseada no modelo *Neighbour-Joining* kimura-2 (Kimura, 1980) das secuencias máis próximas do xene 16S rRNA (1473 nucleótidos) de BC09^T e os taxóns máis próximos do xénero *Bacillus*. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072^T tomouse como *outgroup*. A significancia de cada rama indicase polo valor do *bootstrap* que foi calculado en porcentaxe de 1000 subconxuntos. Bar, 2 nt substitucións por 100 nt. Os nodos marcados con círculos foron obtidos tamén con algoritmo *Maximum-Likelihood* a parte do modelo NJ. Extraído e modificado de Abril et al. (2019). Co permiso de Microbiology society.

As similitudes para a cepa BC09^T e as cepas próximas *Bacillus safensis* FO-36b^T e *Bacillus australimaris* MCCC 1A05787^T son de 97.8% e 95.2% respectivamente para o xene *gyrB* como xa nomeouse previamente. Para a comparación do xene *gyrB* xerouse a árbore filoxenética coas secuencias das especies máis próximas. Tomáronse as secuencias do xene *gyrB* da base de datos GenBank (Táboa 11), das cepas *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. zhagzhoensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T con maior similitude a BC09^T e construíuse a árbore mediante o programa MEGA 7 baseándose nos modelos de análises NJ (*Neighbour-Joining*) (Saitou & Nei, 1987) e ML (*Maximum-Likelihood*) (Rogers & Swofford, 1998) (Figura 27). Na árbore filoxenética pode apreciarse como estas especies forman *clusters* similares o da arbore filoxenética do xene 16S rRNA (Figura 26). *B. safensis* FO-36b^T (DSM 19292^T), *B. australimaris* MCCC 1A05787^T e a cepa BC09^T seguen formando un *cluster* ben marcado.

Táboa 11. Códigos de acceso do xene *gyB* das cepas tipo e BC09^T. Base de datos GenBank.

Especie/Cepa	Código de acceso <i>gyB</i>
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	KC608573
<i>Bacillus velezensis</i> BCRC 17467 ^T	DQ903176
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IFO 15535 ^T	AB014097
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T	LSAZ01000005
<i>Bacillus mojavenensis</i> BCRC 17124 ^T	DQ309297
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 13719 ^T	AB014103
<i>Bacillus vallismortis</i> BCRC 17183 ^T	DQ309298
<i>Bacillus atropheus</i> NRRL NRS 213 ^T	NZ LSBB01000001
BC09 ^T	MF140243
<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T	ASJD01000009
<i>Bacillus australimaris</i> NH71 ^T	LGYN01000023
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	ABRX01000004
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	ASJC01000015
<i>Bacillus xiamenensis</i> HYC-10 ^T	AMSH01000062
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> DW5-4 ^T	JOTP01000022
<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 ^T	LPVF01000008

Resultados e Discusión

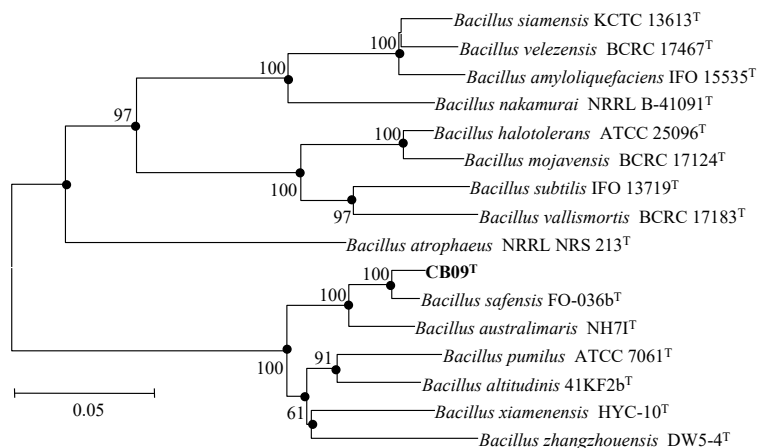


Figura 27. Arbore filoxenética baseada no modelo *Neighbour-Joining* (Saitou & Nei, 1987) co parámetro de kimura-2 (Kimura,1980) das secuencias máis próximas do xene *gyrB* (1069 nucleótidos) de BC09^T e os taxóns máis próximos do xénero *Bacillus*. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072^T usouse coma *outgroup*. A significancia de cada rama indicase polo valor do bootstrap que foi calculado en porcentaxe de 1000 subconxuntos. Bar, 5 nt substitucións por 100 nt. Os nodos marcados con círculos foron obtidos tamén con algoritmo *Maximum-Likelihood* a parte do modelo NJ. Extraído e modificado de Abril et al. (2019). Co permiso de Microbiology society.

4.1.3.3 Estudo xenómico

Os códigos de acceso ó GenBank e ó SRA do xenoma da cepa BC09^T son QBHN00000000 e SRP139983 respectivamente (Abril et al., 2019).

Os valores de hibridación DNA-DNA segundo o método Ezaki et al. (1989), seguindo as recomendacións de Willems et al. (2001), entre a cepa BC09^T e as máis próximas *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T foron 67% ($\pm 2\%$) e 56% ($\pm 2\%$ SD) respectivamente. O valor da hibridación DNA-DNA establecido para designar una cepa como unha nova especie é 70% (Wayne et al., 1987).

Os parámetros de calidade do xenoma, o contido en G+C (mol%) calculado a partir do xenoma, así como o tamaño e a cobertura da secuenciación xénica expóñense na Táboa 12.

O valor do contido G+C da cepa BC09^T polo método de desnaturalización térmica é de 41.9% e o valor deste parámetro obtido a partir da análise do xenoma é de 40,9%, existindo una diferenca de 1.0% entre ambos valores obtidos mediante diferentes técnicas. Os valores do contido G+C de *B. safensis* (Satomi et al., 2006) e *B. australimaris* (Liu et al., 2016) determinados polo método de HPLC, son 41.0–41.4 mol% e 41.3 mol%, respectivamente; similares ó valor obtido para a cepa BC09^T a partir da análise do xenoma.

Táboa 12. Características da secuencia xenómica da cepa BC09^T. Clasificación da contaminación: >5% baixa, 5% ata <10% media, 10% to <15% alta.

Tamaño do xenoma (nucleótidos)	3,982,198
Contido en G+C (mol%)	40,9%
Número de contigs	72
Cobertura do xenoma	87X
Contig N50	108,699
Integridade	99585%
Contaminación	0,207%
Heteroxeneidade	0
SRA número de acceso	SRP139983
GenBank número de acceso	QBHN00000000
BioSample número de acceso	SAMN08905838

4.1.3.3.1 ANIb (Identidade nucleotídica media) e dDDH (Hibridación DNA-DNA *in silico*)

Os valores da media de identidade dos nucleótidos segundo o algoritmo Blast (ANIb) e a hibridación DNA-DNA *in silico* entre o xenoma da cepa BC09^T e os das especies máis próximas observase na Táboa 13. Os valores do ANIb entre a cepa BC09^T e *B. safensis* DSM 19292^T e *B. australimaris* KCTC 33532^T foron 95.7% e 93.1% respec-

Resultados e Discusión

tivamente. Establecese como nova ou especie diferente as cepas que presenten un ANIb por debaixo do 94-96% (Chun et al., 2018) e a cepa BC09^T encontrase no límite. Os valores do dDDH entre a cepa BC09^T e *B. safensis* DSM 19292^T, e *B. australimaris* KCTC 33532^T foron 67.6% e 51.9% respectivamente. Establecese como unha nova especie ás cepas que presenten un dDDH por debaixo do 70% (Chun et al., 2018).

Táboa 13. Valores de dDDH e ANIb entre BC09^T e as cepas máis próximas a ela. Cepas: 1, *B. safensis* subsp. *osmophilus* BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T; 4, *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T; 5, *B. pumilus* ATCC 7061^T; 6, *B. xiamenensis* HYC-10^T; 7, *B. altitudinis* 41KF2b^T. Os valores de dDDH encóntranse abaixo a esquerda e os valores de ANIb arriba a dereita. Todos os valores son en porcentaxes. Extraído de Abril et al. (2019). Co permiso de Microbiology society.

	1	2	3	4	5	6	7
1		95.7	93.1	90.4	91.1	88.9	88.5
2	67.6		93.1	90.5	91.3	89	88.6
3	51.9	52		90.4	91	88.9	88.4
4	42	42.2	41.6		90.3	90.5	89.7
5	44.1	44.6	43.4	41.7		88.7	88.4
6	37.4	37.4	37.2	42.2	36.6		91.2
7	36.4	36.3	35.8	39.2	36.1	44	

4.1.3.3.2 Árbore filoxenómica

O termo filoxenómica comezase a empregar en publicacións recentes, referíndose ó estudo e comparativa de xenomas completos entre diferentes taxóns (Meier-Kolthoff & Göker, 2017).

A partir das secuencias xenómicas tomadas da base de datos GenBank (Táboa 14), das cepas *B. pumilus* ATCC 7061^T, *B. safensis* FO-36^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. zhagzhoensis* DW5-4^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T, construíuse a árbore filoxenómica mediante o programa bioinformático UBCGs (Figura

28). Este programa alia as secuencias de 92 xenes bacterianos de copia única provenientes dos xenomas. Posteriormente, a partir de dita análise, mediante o programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) baseándose nos modelos de análises NJ (*Neighbour-Joining*) (Saitou & Nei, 1987) e ML (*Maximum-Likelihood*) (Rogers & Swofford, 1998) xerouse unha árbore onde como nas árbores do 16S rRNA e a *gyrB*, a cepa BC09^T, *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T encóntranse dentro dun mesmo *cluster*.

Táboa 14. Códigos de acceso do xenoma das cepas tipo e BC09^T. Base de datos GenBank.

Especie/Cepa	Código de acceso ó xenoma
<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1 ^T	GCA 000245335.1
<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC 25096 ^T	GCA 001517105.1
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> NCIB 3610 ^T	GCA 002055965.1
<i>Bacillus vallismortis</i> DV-1-F3 ^T	GCA 000245315.1
<i>Bacillus atropheus</i> NRRL NRS 213 ^T	GCA 001584335.1
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T	GCA 001584325.1
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-41580 ^T	GCA 001461825.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	GCA 000196735.1
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	GCA 000262045.1
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	GCA 000691145.1
<i>Bacillus xiamenensis</i> HYC-10 ^T	GCA 000300535.1
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 ^T	GCA 000715205.1
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	GCA 000172815.1
<i>Bacillus australimaris</i> MCCC 1A05787 ^T	GCA 001307105.1
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	GCA 000691165.1
BC09 ^T	QBHN00000000

Resultados e Discusión

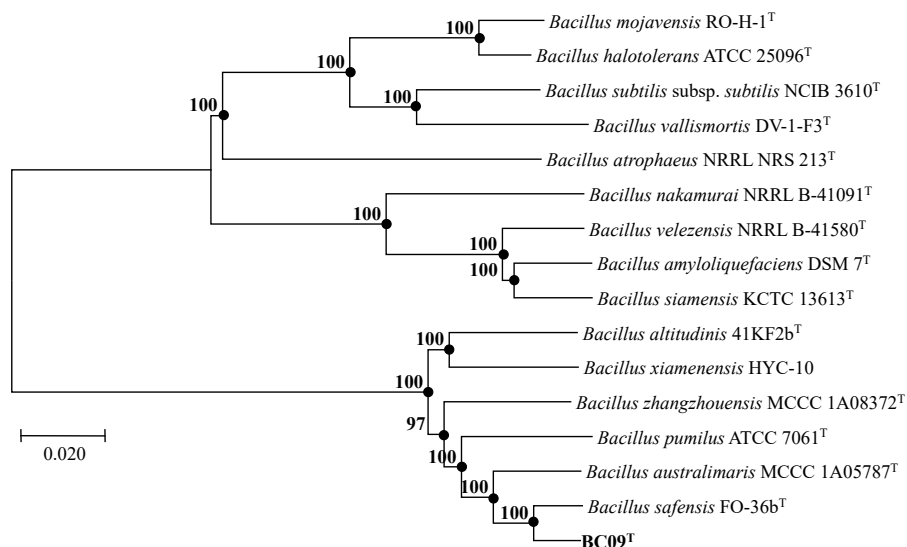


Figura 28. Arbore filoxenómica baseada no modelo *Neighbour-Joining* kimura-2 (Kimura,1980) construído a partir do xenoma de BC09^T e dos das especies máis próximas empregando o programa bioinformático UBCGs. (aliñamentos concatenados de 92 xenes). A importancia de cada rama indicase polo valor do *bootstrap* que foi calculado en porcentaxe de 1500 subconxuntos. Bar, 0.02 nt substitucións por posición. Os nodos marcados con círculos foron obtidos tamén con algoritmo *Maximum-Likelihood* a parte do modelo NJ. Extraído e modificado de Abril et al. (2019). Co permiso de Microbiology society.

4.1.3.4 Estudo proteómico mediante MALDI-TOF

Para levar a cabo o estudo proteómico mediante MALDI-TOF MS, realizouse a extracción proteica da cepa BC09^T e das cepas tipo máis próximas a ela, *B. safensis* FO-36b^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T, *B. pumilus* ATCC 7061^T e *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T. Seguidamente, levouse a cabo a análise por MALDI-TOF MS por triplicado para cada cepa. A maioría dos espectros obtidos presentan entre 150 e 170 picos e as súas masas encóntranse nun rango de 2 a 10 KDa. A partir dos 3 espectros da mesma cepa, obtivéronse os picos máis relevantes e reproducibles para establecer o patrón *fingerprint* de cada

cepa (Figura 29). Posteriormente, levouse a cabo a análise estatística dos datos mediante o *software ClinProTools* (Boelke et al., 2005) de Bruker. Na Táboa 15 amósanse os picos característicos de cada cepa analizada. Os picos m/z comúns para tódalas especies estudadas de *Bacillus* son 2150, 3203, 3276, 3396, 3754, 3865, 3879, 4306, 4914, 4928, 7725, 8038, 9192, e 9823 Da. A principal diferenza que distingue a cepa BC09^T e *B. safensis* FO-36b^T do resto de cepas é a ausencia do pico 2679 Da. Por outro lado, segundo Starostin (2015) o pico 6096 Da é característico de *B. altitudinis*. Sen embargo, nos datos analizados neste traballo, dito pico está presente en *B. altitudinis* 41KF2b^T e na cepa BC09^T. Pódese apreciar no xel virtual (Figura 30) o aliñamento dos códigos de barras dos espectros de masas de cada cepa analizada coas diferentes intensidades de cada pico.

Segundo a análise do compoñente principal (PCA) (Figura 31) fórmanse catro grupos ben definidos. Por un lado, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T e *B. xiamenensis* HYC-10^T nun mesmo grupo (A). No centro *B. altitudinis* 41KF2b^T, a cepa BC09^T e *B. safensis* FO-36b^T forman outro grupo (B) ben definido. *B. pumilus* ATCC 7061^T e *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T preséntanse moi separadas das demais especies estudadas (C e D). Segundo o dendrograma (Figura 32) xerado a partir das análises dos datos das diferentes especies, catro *clusters* obsérvanse ben diferenciados (A, B, C e D), os cales corresponden con grupos xerados na PCA (Figura 31). Ó comparar o dendrograma (Figura 32) xerado a partir da análise do perfil proteico fronte as árbores filoxenéticas, encóntranse certas diferenzas e similitudes nos resultados. Observase como *B. australimaris* MCCC 1A05787^T encontrase moi próxima a cepa BC09^T segundo os estudos xenéticos (Figuras 26, 27 e 28), mentres que non ocorre o mesmo segundo a análise proteómica. Por outro lado a especie máis próxima a cepa BC09^T segundo as dúas metodoloxías é *B. safensis* FO-36b^T.

Resultados e Discusión

Táboa 15. Picos característicos de BC09^T e as cepas máis próximas a ela. Cepas: 1, *B. safensis* subsp. *osmophilus* BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T; 4, *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T; 5, *B. pumilus* ATCC 7061^T; 6, *B. xiamenensis* HYC-10^T; 7, *B. altitudinis* 41KF2b^T. As masas dos picos preséntanse en Da.

1	2	3	4	5	6	7
2150	2150	2150	2150	2150	2150	2150
	2277					2277
2290±2	2290±2	2290±2	2290±2	2290±2	2290±2	
		2679±4	2679±4	2679±4	2679±4	2679±4
2967±4	2967±4	2967±4	2967±4	2967±4		2967±4
2972±4	2972±4	2972±4	2972±4		2972±4	2972±4
3119	3126±4	3126±4	3126±4	3126±4		3117
3203±4	3203±4	3203±4	3203±4	3203±4	3203±4	3203±4
3276±4	3276±4	3276±4	3276±4	3276±4	3276±4	3276±4
3310±4	3310±4	3310±4	3310±4	3310±4	3310±4	3310±4
3396±4	3396±4	3396±4	3396±4	3396±4	3396±4	3396±4
3702±4	3702±4	3702±4	3702±4	3702±4	3702±4	3702±4
3710±2	3710±2	3710±2		3710±2	3710±2	3710±2
3754±4	3754±4	3754±4	3754±4	3754±4	3754±4	3754±4
3865±4	3865±4	3865±4	3865±4	3865±4	3865±4	3865±4
3879±4	3879±4	3879±4	3879±4	3879±4	3879±4	3879±4
4306±4	4306±4	4306±4	4306±4	4306±4	4306±4	4306±4
4598±4	4598±4	4598±4	4598±4	4598±4	4598±4	4598±4
		4691±4	4691±4	4691±4		4691±4
4680±4	4680±4			4680±4		4680±4
4914±4	4914±4	4914±4	4914±4	4914±4	4914±4	4914±4

Táboa 15. (Continuación)

1	2	3	4	5	6	7
4928 ±4	4928 ±4	4928 ±4	4928 ±4	4928 ±4	4928 ±4	4928 ±4
			4933 ±4		4933 ±4	
5003±3	5003±3				5003±3	5003±3
5031±3		5022	5031±3	5031±3	5031±3	
5226±4	5226±4	5226±4		5226±4		5226±4
			5534			
		5361		5348		
5566±2	5566±2	5566±2	5553	5566±2	5553	5566±2
	5932			5932		
5944±2	5944±2	5944±2	5944±2		5944±2	5944±2
6096±2						6096±2
6621±4	6621±4	6621±4	6621±4	6621±4	6621±4	6621±4
6792±4	6792±4	6792±4	6792±4	6792±4	6792±4	6792±4
			7297			
	7369±4	7369±4		7369±4	7369±4	7369±4
7501±2	7501±2	7515	7515	7501±2	7501±2	7501±2
7725±4	7725±4	7725±4	7725±4	7725±4	7725±4	7725±4
8038±4	8038±4	8038±4	8038±4	8038±4	8038±4	8038±4
9192±4	9192±4	9192±4	9192±4	9192±4	9192±4	9192±4
9357	9363	9378	9378	9378		9351
9823±4	9823±4	9823±4	9823±4	9823±4	9839	9823±4
10450±2	10450±2	10450±2	10431	10450±2	10450±2	10450±2
11125	11131±1	11131±1	11165	11104	11131±1	11131±1

Resultados e Discussión

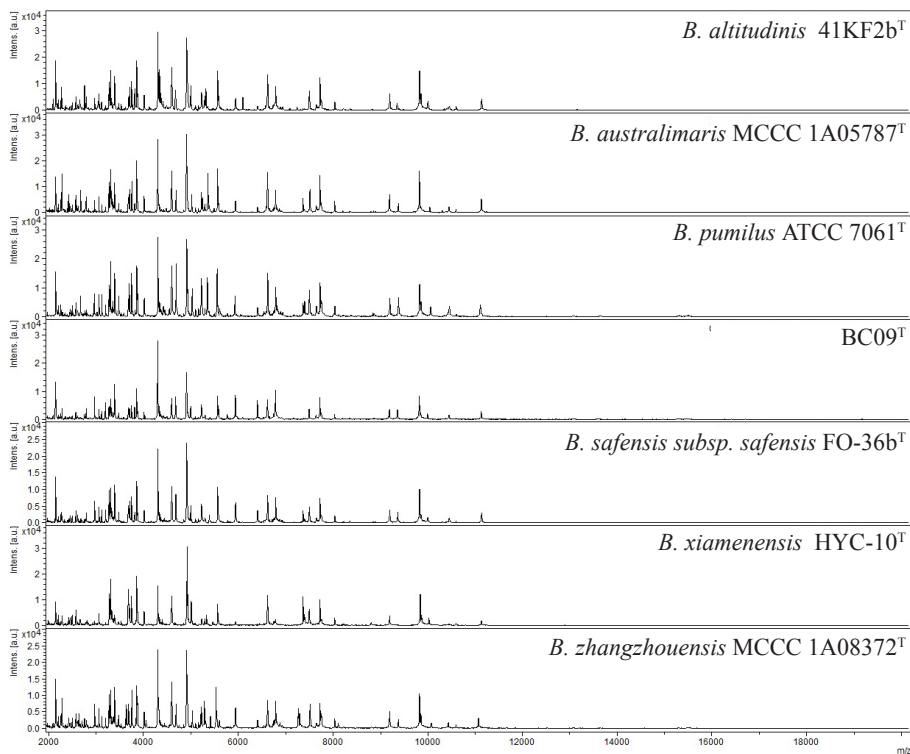


Figura 29. Espectros “fingerprint” obtidos da análise das cepas BC09^T, *B. safensis* FO-36b^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T, *B. pumilus* ATCC 7061^T e *B. xiamenensis* HYC-10^T e *B. altitudinis* 41KF2b^T por MALDI-TOF MS. m/z, masa/carga; intens, intensidade.

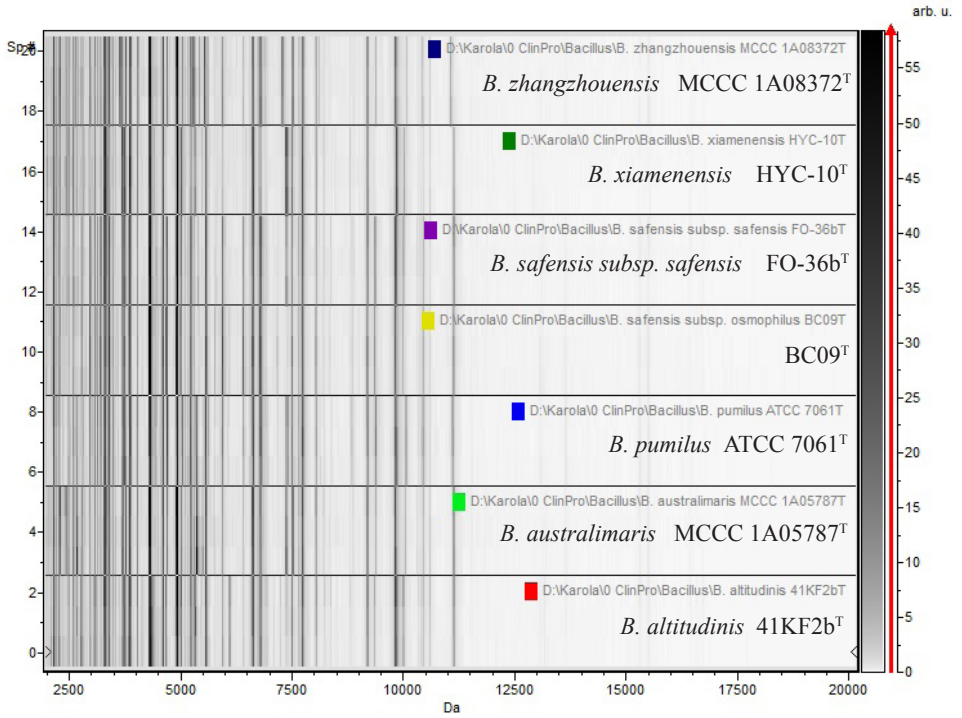


Figura 30. Xel virtual co aliñamento dos espectros de masas da cepa BC09^T e as mais próximas a ela, usando a ferramenta ClinProTools. Cores: vermello: *B. altitudinis* 41KF2b^T, verde claro: *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, verde escuro: *B. xiamenensis* HYC-10^T, azul escuro: *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T, azul claro: *B. pumilus* ATCC 7061^T, amarelo: BC09^T, morado: *B. safensis* FO-36b^T.

Resultados e Discusión

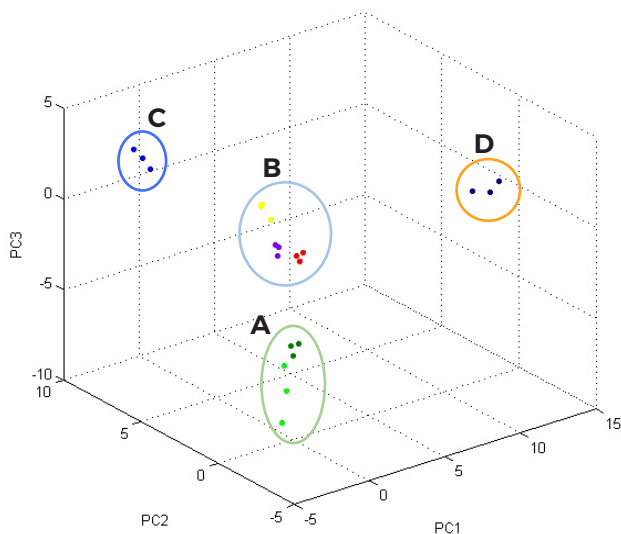


Figura 31. Análise do compoñente principal (PCA) das cepas de *Bacillus* estudadas empregando a ferramenta *ClinProTools*. Cores: vermello: *B. altitudinis* 41KF2b^T, verde claro: *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, verde escuro: *B. xiamenensis* HYC-10^T, azul escuro: *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T, azul claro: *B. pumilus* ATCC 7061^T, amarelo: BC09^T, morado: *B. safensis* FO-36b^T.

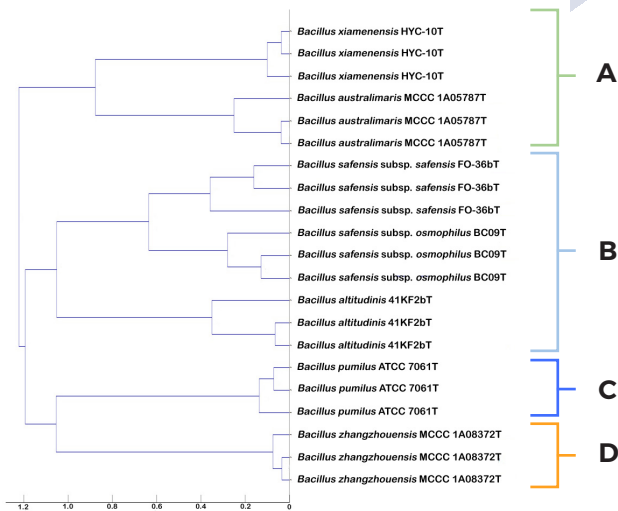


Figura 32. MSP (*Mean spectra Projection*) dendrograma das cepas BC09^T, *B. altitudinis* 41KF2b^T, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T, *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372^T, *B. pumilus* ATCC 7061^T, e *B. safensis* FO-36b^T. 3 replicas foron analizadas para cada cepa.

4.1.3.5 Estudo quimitaxonómico e fenotípico

Para levar a cabo o estudo quimitaxonómico, realizouse a análise dos ácidos graxos das cepas BC09^T, *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. Os ácidos graxos predominantes na cepa BC09^T son o iso-C_{15:0} (56.1%) e anteiso-C_{15:0} (21.0%). O perfil de ácidos graxos da cepa BC09^T é similar os obtidos para *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T con diferenzas na proporción de iso-C_{17:0}. Na Táboa 16 amosase a lista dos ácidos graxos predominantes para as tres cepas de *Bacillus* estudadas. Observouse coma a menaquinona 7 (MK7) foi a única quinona respiratoria detectada na cepa BC09^T, de igual modo que ocorre para *B. australimaris* MCCC 1A05787^T (Liu et al., 2016).

Tres diferentes diaminoácidos encóntranse no peptidoglicano dos membros de *Bacillaceae*, o ácido meso-diaminopimelico, ornitina é lisina (Logan et al., 2019). Mediante a análise dos peptidoglicanos encontrouse a presenza de *meso*-DAP (ácido meso-diaminopimelico) o cal é común no xénero *Bacillus* (Logan et al., 2009, Logan & Bacillus, 2015) e tipicamente presenta peptidoglicanos tipo A1γ (Schumann, 2011).

Táboa 16. Composición dos ácidos graxos da cepa BC09^T e as especies máis próximas. Cepas: 1, BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. Non se amosan os ácidos graxos detectados por debaixo do 1%. Os datos forman parte de este estudo.

Ácido graxo	1	2	3
Saturados de cadea lineal			
C _{16:0}	2.1	1.2	1.3
Saturados iso-ramificados			
C _{14:0}	0.8	0.6	1.0
C _{15:0}	56.1	60.2	61.5
C _{16:0}	1.5	1.6	1.4

Resultados e Discusión

Táboa 16. (Continuación)

Ácido graxo	1	2	3
C _{17:0}	7.4	3.9	4.3
Saturados anteiso-ramificados			
C _{15:0}	21.0	26.7	22.8
C _{17:0}	3.6	3.5	2.6
Insaturados			
C _{17:1 iso ω10c}	1.6	1.0	1.7
C _{18:1 ω9c}	1.4	0.6	0.7

O patrón de lípidos da cepa BC09^T consta de difosfatidilglicerol (DFG), fosfatidilglicerol (FG), dous fosfolípidos non identificados (FL), dous glicolípidos non identificados (GL), tres lípidos non identificados (L) e un fosfoglicolípido non identificado (FGL).

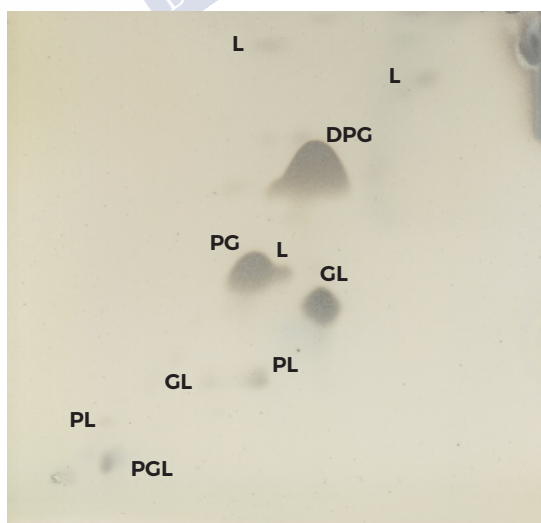


Figura 33. Patrón de lípidos da cepa BC09^T. DPG: difosfatidilglicerol; PG: fosfatidilglicerol; PL: fosfolípido; GL: glicolípido; L: lípido; PGL: fosfoglicolípido.

O patrón de lípidos polares da cepa BC09^T é similar o das cepas máis próximas *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T (Liu et al., 2016). Os péptidos polares determinados para *B. australimaris* MCCC 1A05787^T foron un difosfatidilglicerol, un fosfatidilglicerol, un fosfolípido, un lípido e tres glicolípidos. A cepa *B. safensis* FO-36b^T presenta o mesmo patrón pero observouse un fosfolípido menos e ausencia de fosfatidilglicerol (Liu et al., 2016).

As principais diferenzas no patrón de lípidos polares da cepa BC09^T con *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T é a ausencia de fosfoglicolípidos nestas dous últimas e a do fosfatidilglicerol en *B. safensis* FO-36b^T (Táboa 17). Amósanse os patrón dos lípidos polares de *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T extraídos do artigo científico (Liu et al., 2016) (Figura 34).

Táboa 17. Lípidos polares determinados para a cepa BC09^T e as especies máis próximas. Cepas: 1, BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. Os datos forman parte de este estudo e de Liu et al., (2016).

Lípido polar	1	2	3
Difosfatidilglicerol(DPG)	1	1	1
Fosfatidilglicerol(PG)	1	-	1
Fosfolípido(PL)	2	1	2
Glicolípido(GL)	2	3	3
Lípido(L)	3	1	1
Fosfoglicolípido(PGL)	1	-	-

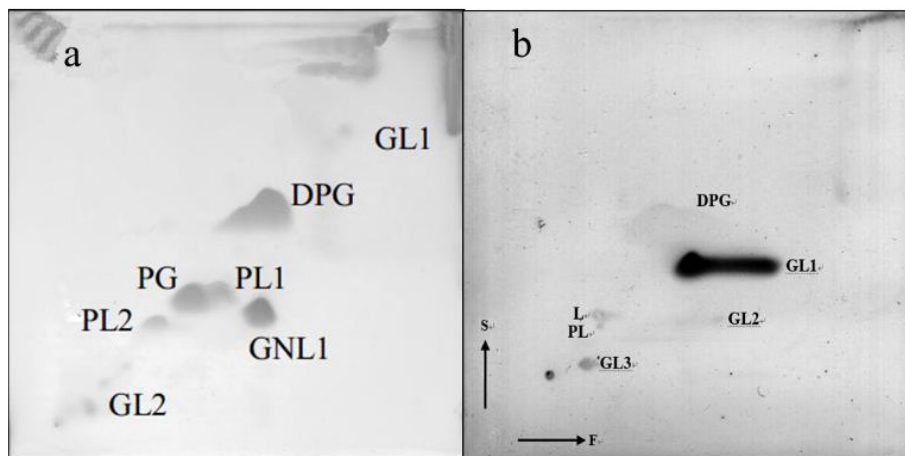


Figura 34. Imaxe do patrón de lípidos das cepas *B. australimaris* MCCC 1A05787^T (a) e *B. safensis* FO-36b^T (b). DPG: difosfatidilglicerol; PG: fosfatidilglicerol; PL: fosfolípido; GL: glicolípido; L: lípido; PGL: fosfoglicolípido. F: primeira dimensión; S: segunda dimensión. Extraída de Liu et al., (2016). Co permiso de Microbiology society.

4.1.3.6 Caracterización fenotípica mediante probas bioquímicas

A caracterización fenotípica recomendada polos mínimos estándar para as bacterias formadoras de endosporas levouse a cabo mediante as probas realizadas cos API 50CH, API ZYM e 20NE ; e coas probas segundo os métodos descritos por Claus e Berkeley (1872). As cepas tipo *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T incluíronse neste estudo como cepas de referencia.

A cepa BC09^T é catalasa negativo, oxidasa positivo e anaerobia facultativa. É capaz de crecer dende pH 5.7 a pH 8, aínda que o seu óptimo é pH 7. Crece en medio con 30% de sacarosa e entre 5 e 55°C, sendo a súa temperatura óptima 30°C. Os demais resultados obtidos para as cepas BC09^T, *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T amósanse na Táboa 18 e as diferencias fenotípicas entre ditas cepas expóñense na Táboa 19.

Táboa 18. As características fenotípicas das cepas BC09^T e as cepas máis próximas. Cepas: 1, BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. +, reacción positiva; -, reacción negativa; w, reacción positiva débil, ND, non determinado.

Características	1	2	3	Características	1	2	3
Gas desde glucosa	-	-	-	Producción de ácido dende (API 50CH):			
Voges Proskauer	+	+	+	Glicerol	w	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	Eritriol	-	-	-
reduccion de nitrato	-	-	-	D-Arabinosa	-	-	-
Producción de:				L-Arabinosa	+	+	+
acetoina	+	ND	ND	D-Ribosa	+	+	+
fenilalanine deaminasa	-	-	ND	L-Xilosa	-	-	-
catalasa	+	+	ND	D-Adonitol	-	-	-
caseinase	+	w	ND	Metil-βD-Xilopiranosida	-	-	-
amilasa	-	-	ND	D-Glucosa	+	+	+
oxidasa	+	+	ND	D-Fructosa	+	+	+
				D-Mamnosa	+	+	+
				D-Sorbosa	-	-	-
D-Maltosa	-	+	-	L-Rhamnosa	+	-	-
Ácido cáprico	-	-	-	Dulcitol	-	-	-
Ácido adípico	-	-	-	Inositol	+	+	+
Ácido fenilacético	-	-	-	D-Manitol	+	+	+
				D-Sorbitol	-	-	-
Producción de (API 20NE):				Metil-αD-Manopiranosida	w	+	-
Indol	-	-	-	Metil-αD-Glucopiranosida	w	+	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	N-AcetilGlucosamina	+	+	-
Ureasa	-	-	-	Amigdalina	+	+	+

Resultados e Discusión

Táboa 18. (Continuación)

Características	1	2	3	Características	1	2	3
Esculina	+	+	+	Arbutina	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	Esculina			+
				Salicina	+	+	+
Produción de (API ZYM):				D-Celobiosa	+	+	+
Fosfatasa alcalina	+	+	+	D-Maltosa	-	+	-
Esterasa (C 4)	+	+	+	D-Lactosa	-	w	-
Esterasa lipasa(C 8)	+	ND	+	D-Sacarosa	+	+	+
Lipasa (C 14)	+	w	w	D-Trehalosa	+	+	+
Leucina arilamidasa	-	-	+	Inulina	-	-	-
Valina arilamidasa	-	-	+	D-Melezitosa	-	-	-
Cistina arilamidasa	-	-	ND	D-Rafinosa	-	-	-
Tripsina	-	-	-	Glicóxeno		-	-
α -quimotripsina	-	w	+	Xilitol	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	ND	+	D-Turanosa	-	+	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	D-Lixosa	-	-	-
α -galactosidasa	+	-	+	D-Tagatosa	+	+	+
β -galactosidasa	+	+	+	D-Fucosa	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	w	L-Fucosa	-	-	-
α -glucuronidasa	-	ND	ND	D-Arabitól	-	-	-
β -glucosidasa	+	ND	+	L-Arabitól	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	Gluconato potásico	-	-	-
α -mannosidasa	+	-	+	2-CetoGluconato potásico	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	5-CetoGluconato potásico	-	-	-

As principais diferenzas fenotípicas entre a cepa BC09^T e as dúas máis próximas *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T son a produción de diferentes enzimas coma leucina e valina arilamidasa, quimiotripsina, α -galactosidasa e α -mannosidasa, así como a produción de ácido dende distintas fontes de carbono e o crecemento a diferentes temperaturas.

Táboa 19. As diferencias das características fenotípicas das cepas BC09^T e as cepas máis próximas. Cepas: 1, BC09^T; 2, *B. safensis* FO-36b^T; 3, *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. +, reacción positiva; -, reacción negativa; w, reacción positiva débil.

Características	1	2	3
Crecemento a:			
5°C	+	-	-
55°C	+	-	-
Producción de (API ZYM):			
Leucina arilamidasa	-	-	+
Valina arilamidasa	-	-	+
α -galactosidasa	+	-	+
α -mannosidasa	+	-	+
Quimiotripsina	-	w	+
Producción de ácido dende (API 50CH):			
L-Rhamnosa	+	-	-
Maltosa	-	+	-
Turanosa	-	+	-

Para a caracterización da cepa BC09^T leváronse a cabo tódolos estudos descritos por Logan et al. (2009) establecidos como os mínimos estándar, propostos para describir novos taxons de bacterias aerobias formadoras de esporas.

Os resultados dos xenos secuenciados 16S rRNA, *gyrB* e *tuf* establecen que as especies máis próximas a cepa a estudo son *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. O posterior estudo do xenoma e a análise do perfil proteico mediante MALDI-TOF MS reafirma o resultado anterior, e establece que a especie máis próxima a BC09^T é *B. safensis*. O valor da hibridación DNA-DNA *in silico* entre estas dúas cepas é 67.6%, onde o establecemento dunha nova especie encontrase por debaixo do 70% (Chun et al. 2018); valores similares de dDDH establécense entre diferentes subespecies de *B. subtilis* (Nakamura et al., 1999; Rooney et al., 2009). O valor do ANIb entre BC09^T e *B. safensis* é 95.7%, onde o establecemento dunha nova especie encontrase por debaixo do 96% (Richter et al., 2009). Segundo reportou Guillermo Jiménez et al. (2013), moitas especies do grupo de *B. cereus* presentan ó comparar os seus xenomas valores de ANIb entre 99.9% e 95.8%, o cal pode indicar a necesidade dunha reclasificación de moitas especies do xénero *Bacillus*. Aínda así, neste caso segundo establecece para distinguir entre especies, ámbolos dous valores DDH e ANIb sitúanse no límite entre a cepa BC09^T e *B. safensis* FO-36b^T. Segundo o perfil dos ácidos graxos, a principal diferenza entre BC09^T e as outras cepas relativas, é a proporción de iso-C_{17:0}. Ademais, co estudo do patrón de lípidos poláres determinouse a presenza de fosfoglicolipidos na cepa BC09^T, mentres que este lípido está ausente en *B. safensis* FO-36b^T e *B. australimaris* MCCC 1A05787^T. Por último, respecto as probas fenotípicas as principais diferenzas entre a cepa BC09^T e as dúas máis próximas son a produción de diferentes enzimas, así como a produción de ácido dende distintas fontes de carbono e o crecemento a diferentes temperaturas.

O conxunto de tódolos resultados indican que a cepa BC09^T encontra-se no límite para ser considerada unha nova especie. Debido a proximidade filoxenetica da cepa BC09^T coa especie *B. safensis* e as seguintes diferenzas fenotípicas entre elas, considerouse que a cepa BC09^T é unha nova subespecie da especie *B. safensis*. O nome proposto para a cepa BC09^T foi *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp

nov. Tal e como descríbese no artigo publicado “*Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov.” (Abril et al., 2019) e de acordo coa regra 46 do *Bacteriological Code* (Lapage et al., 1990): a descrición dunha nova subespecie a cal non inclúe a cepa tipo da especie *Bacillus safensis*, automaticamente crease a subespecie *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. para a cal a cepa tipo é FO-36b^T e a súa descrición segue a descrición orixinal de Satomi et al. (2006). As descricións das dúas subespecies segundo Abril et al. (2019), achéganse a continuación:

4.1.4 Descrición de *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov.

Bacillus safensis subsp. *safensis* [sa.fen´sis. N.L. masc. adj. *safensis* proveniente do SAF (no laboratorio do reactor de propulsión da aeronave espacial, Pasadena, CA, USA), de onde o organismo foi por primeira vez]. A descrición de esta subespecie segue a descrición orixinal de Satomi et al. (2006). As células son mesófilas, aerobias, quimioheterotróficas, Gram positivas, bacilares formadoras de esporas, móbiles por un flaxelo polar. As células teñen un diámetro de 0.5–0.7 µm e 1.0–1.2 µm de longo. O crecemento ocorre entre 0–10% (w/v) de NaCl e un pH de 5.6. O crecemento ocorre entre 10–50 °C (óptimo, 30–37 °C), pero non a 4 ou 55 °C. As colonias son redondas, onduladas, brancas, non luminescentes e teñen marxes irregulares en placas de TSA incubadas a 32 °C durante 24 h. Produce oxidasa, catalasa, β-galactosidasa, β-glucosidasa, alcalina fosfatasa, naftol-AS-BI- fosfatasa e esterasa, pero non produce H₂S, indol, amilasa, agarasa, lecitinasa, DNasa, ureasa, leucina arilamidasa, cistina arilamidasa, valina arilamidasa, tripsina, α-galactosidasa, N-acetil-β-glucosamidasa, α-fucosidasa, triptofano deaminasa, fenilalanina deaminasa, arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa e ornitina decarboxilasa. As células non reducen nitrato, pero hidrolizan gelatina, aesculina e RNA. A hidrólise de caseína varía segundo as cepas. O test de Voges–Proskauer é positivo. O crecemento ocorre en placas suplementadas con 1% de glicina e extracto de carne, pero

non en 0.0001% de lisoзима. É negativo para a produción de gas dende D-glucosa. Produce ácido dende D-glucosa, glicerol, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, galactosa, fructosa, mannososa, inositol, manitol, metil α -D-mannopiranosida, metil α -D-glucopiranosida, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutin, salicina, celobiososa, maltosa, sucrosa, trealosa, turanososa e D-tagatosa, pero non dende eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, metil β -D-xilopiranosida, sorbosa, ramnosa, dulcitol, sorbitol, inulina, melecitosa, rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, D-lixosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-ketogluconato ou 5-ketogluconato. As reaccións para lactosa, melibiososa e gentiobiososa varían segundo as cepas. Citrato, malate, D-glucose, glicerol, L-arabinose, ribose, D-xilosa, galactosa, fructosa, mannososa, inositol, manitol, metil α -D-mannopiranosida, metil α -D-glucopiranosida, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiososa, maltosa, sucrosa, trealosa, gentiobiososa, turanososa, D-tagatosa, gluconato, lactato, L-aspartato e L-glutamato son facilmente usadas como fontes de carbono. Eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, metil β -D-xilopiranosida, sorbosa, dulcitol, sorbitol, inulina, lactosa, melecitosa, almidón, glucógeno, xilitol, D-lixosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-ketogluconato, 5-ketogluconato, ácido capríco, ácido adípico, ácido fenilacético, propionato e glicina non as usa coma fonte de enerxía. A utilización de ramnosa varia segundo as cepas. A composición dos ácidos graxos de toda a célula son principalmente C_{15:0} iso, C_{15:0} anteiso, C_{17:0} iso e C_{17:0} anteiso. A cepa tipo é FO-36b^T (=ATCC BAA-1126^T=NBRC 100820^T), foi illada do reactor de propulsión da aeronave espacial, Pasadena, CA, USA. O contido en G+C do DNA é 41.0–41.4 mol%.

4.1.5 Descrición de *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov.

Bacillus safensis subsp. *osmophilus* (os.mo'phi.lus. Gr. n. *osmos* tendencia; Gr. adj. *philos* amante; N.L. masc. adj. *philus*, amante; N.L. masc. adj. *osmophilus*, referido a habilidade de crecer en medio con alta concentración de azucres) (Abril et al., 2019). As células son Gram positivas, bacilares, móbiles por un flaxelo polar (0.6–0.8 μ m de ancho e

1.3–2.5 μm de lonxitude). Esporas centrais ovales, pero non engrosa o esporanxio. Catalasa e oxidasa positiva. As colonias son redondeadas, brancas crema e opacas. Anaerobia facultativa. Crece a pH 5.7 ata pH 8 (pH 7 óptimo). Pode crecer en presenza de 7% NaCl. Crece dende 5 ata 55°C (a temperatura óptima é 30°C). É capaz de crecer en medio con 30% de glucosa. O nitrato non se reduce a nitrito. A produción de acetoina é positiva. Produción de indol, felinalanina deaminasa, ureasa amilasa, arginina dehidrolasa e H_2S é negativo. Produción de gelatinasa, caseinasa, ácido e alcalina fosfatasa, esterasa, esterasa lipasa, lipasa, fosfohidrolasa e β -galactosidasa, β -glucosidasa e mannosidasa é positiva. A produción de leucina, cisteína e valina arilamidasa, tripsina, quimiotripsina, glucuronidasa, N-acetil-glucosaminidasa, α -glucosidasa, e α -fucosidasa é negativo. A asimilación de glucosa, L-arabinosa, mannososa, manitol, N-acetilglucosamina, gluconato, malato e citrate é positiva. A asimilación de maltosa, ácido cáprico, ácido adípico e ácido fenilacético é negativa. A produción de ácido dende D-glucosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-fructosa, D-mannosa, L-rhamnosa, inositol, D-mannitol, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa e D-tagatosa é positiva. A produción de ácido dende glicerol, metil α -D-manopiranosida e metil α -D-glucopiranosida é débil. A produción de ácido dende eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, metil α -D-xilosida, L-sorbosa, dulcitol, sorbitol, maltosa, lactosa, inulina, melecitosa, raffinosa, almidón, glucogeno, xilitol, gentibiosa, turanosa, L-lixosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 ketogluconato e 5 ketogluconato é negativo. A única quinona detectada foi MK-7 e meso-DAP é detectado no peptidoglucano. O perfil lipídico consiste en difosfatidilglicerol e fosfatidilglicerol, dous fosfolípidos non identificados, dous glicolípidos non identificados, tres lípidos non identificados e un fosfoglicolípidos. Os principais ácidos graxos son iso- $\text{C}_{15:0}$ e anteiso- $\text{C}_{15:0}$, tamén $\text{C}_{17:0}$ iso e $\text{C}_{17:0}$ anteiso foros identificados en pequenas cantidades. O contido en G+C da cepa BC09^T é 40.9 mol%. A cepa tipo BC09^T (=LMG 30124^T=CECT 9344^T) foi illada de leite condensado contaminado en España.

4.2 Capítulo II: Caracterización de péptidos biomarcadores mediante LC-ESI-MS/MS, para a identificación de especies de *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* produtoras de mastite.

As cepas de *Streptococcus* e *S. aureus* empregadas neste traballo, foron previamente identificadas por MALDI TOF e secuenciación do 16S rRNA (Böhme et al., 2012; Quintela-Baluja et al., 2014) no laboratorio LHICA da facultade de Veterinaria da USC. Tódalas cepas proveñen de produtos lácteos excepto *S. aureus* CNR-ISPA U17 que ten orixe clínico.

A dixestión tríptica de 14 cepas de *Streptococcus* (Táboa 5) e 20 de *S. aureus* (Táboa 6) produtoras de mastite, foron analizadas mediante LC-ESI-MS/MS. Os datos foron procesados e os espectros dos péptidos de cada cepa foron asinados a unha secuencia peptídica por SEQUEST (*Proteome Discoverer 1.4 package, Thermo Scientific*) fronte ós datos de Bacteria da base de datos de *UniProt/ TrEMBL*.

4.2.1 Caracterización dos péptidos para a identificación de *Streptococcus* spp. mediante LC-ESI-MS/MS.

4.2.1.1 Repositorio proteómico de *Streptococcus* spp. produtoras de mastite

Para as cepas de *Streptococcus*, 2546 péptidos non redundantes correspondentes a 1890 proteínas foron identificados neste traballo. Tanto proteínas do citoplasma como asociadas a membrana e secretadas, foron extraídas e determinadas mediante o protocolo empregado. Entre tódalas proteínas determinadas encontráronse proteínas conservadas en bacterias, involucradas nas principais funcións e vías metabólicas como por exemplo as proteínas ribosomais 30S e 50S, sistemas de transporte ABC, factor de elongación Tu, DNA girasas e helicasas, proteínas implicadas no metabolismo de carbohidratos como glucosa-6 fosfato, ademais de proteínas non caracterizadas e moitas outras.

Por outro lado, proteínas involucradas en funcións determinadas como os factores de virulencia e as proteínas de orixe fáxico, en xeral presentan homoloxías restrinxidas a especies e cepas específicas (Calo-Mata et al., 2016). Este feito, implica que péptidos de estas proteínas poden ser empregados como biomarcadores para a detección e caracterización de ditas cepas e especies.

4.2.1.2 Caracterización dos péptidos de factores de virulencia para a identificación de *Streptococcus* spp. produtoras de mastite

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* analizadas, encontráronse certos péptidos pertencentes a factores de virulencia. Os factores de virulencia identificáronse empregando a base de datos “*Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database*” (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) e aumentouse a busca de factores descritos en publicación científica (Hynes & Sloan, 2016; Golińsk et al., 2016).

Encontráronse 92 péptidos pertencentes a factores de virulencia como toxinas, proteínas implicadas na evasión inmune e colonización de células eucariotas como a proteína M típica de *Streptococcus* e, proteínas de resistencia e produción de antibióticos. Estes péptidos foron analizados empregando a ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990) para determinar a homoloxía coas proteínas da base de datos NCBI. Realizouse unha primeira análise coa ferramenta BLASTp incluíndo *Streptococcaceae* nos parámetros de busca. Para asegurar a exclusividade dos péptidos analizados coas especies bacterianas de *Streptococcus*, realizouse o BLASTp excluindo a familia *Streptococcaceae* nos parámetros de busca. Dós 92 péptidos pertencentes a factores de virulencia, 58 son específicos de *Streptococcus* spp. Na Táboa 20 amósanse estes péptidos específicos, os factores de virulencia ós que pertencen e as especies de *Streptococcus* con 100% de homoloxía fronte a base de datos de proteínas do NCBI. Os péptidos ordenáronse segundo as principais funcións dos factores de virulencia: toxinas, resistencia a antibióticos, resistencia a telurito, evasión inmune e colonización, produción de lantibióticos e ABC transportadores asociados a factores de virulencia.

Resultados e Discusión

Para as cepas da especie *S. uberis* ST1 e ST11 determináronse 6 e 1 péptidos específicos de *Streptococcus* respectivamente. Para as cepas da especie *S. agalactiae* ST3, ST9 e ST14 determináronse 6, 1 e 2 péptidos, respectivamente. Para as cepas da especie *S. dysgalactiae* ST2, ST6 e ST7 determináronse 9, 3 e 8 péptidos, respectivamente. Para as cepas da especie *S. parauberis* ST4 e ST5 determináronse 6 e 5 péptidos, para cada un deles. Para a cepa ST8 da especie *S. uberis* determináronse 3 péptidos. Para a cepa ST10 da especie *S. canis* determinouse un péptido. Por último para as cepas ST12 e ST13 da especie *S. gallolyticus* determináronse 6 e 1 péptidos, respectivamente.

Ademais, 57 dos 58 péptidos de factores de virulencia estudados, descríbense por primeira vez para as especies analizadas neste traballo (Táboa 20). Isto implica que so un péptido foi previamente descrito para as especies analizadas. Dito péptido DLWCNMIIAAK, é moi específico para a especie *S. dysgalactiae* na base de datos do NCBI e para a cepa ST14 analizada neste estudo tamén pertencente a especie *S. dysgalactiae*.

Táboa 20. Tódolos péptidos específicos de factores de virulencia determinados para as cepas de *Streptococcus* analizadas. Amósanse os 58 péptidos de factores de virulencia, as cepas nas que foron determinados e os *Streptococcus* con 100% de homoloxía fronte a base de datos do NCBI.

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST1	Toxinas	Toxina RelE	LLATISMIQEQ-CVLIAQRMEW-VKK	<i>S. suis</i>
ST2		Antitoxina RelB	VFKENNLNTA-QALNLFKKN-VAETGQLNLK	<i>S. gallolyticus</i>
ST1		Antitoxina YefM	NTYLSQKVLRG-MAK	<i>S. suis</i>
ST2		Toxina YoeB	LIYMDGDNVA-FLSFKDHY	<i>S. mitis</i>

Táboa 20. (Continuación)

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST1	Toxinas	Exotoxina piroxénica SpeK	NIYAPRYDE-DEILDNR	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i>
ST3	Resistencia a antibióticos	Proteína da familia MarR	MDYQRIND-YLTSIFNNVL-VIEEMSLRGSR	<i>Streptococcus</i> spp.
ST14		Proteína da familia MarR	FNRFILAFEQLKK	<i>S. oralis</i>
ST2		Proteína MurM	QSLQRYLSEFR-GFLDK	<i>S. equi</i>
ST3		Peptidasa da familia M56	FSHGQTAHE-TIVNAKDGKLVK	<i>S. sanguinis</i>
ST8		Beta- lactamasa tipo serina hidrolasa	LVPDQPIQITG-FYVNEEEVPI-FKLNKQCFVIA-DK	<i>S. sanguinis</i>
ST13		Beta- lactamasa tipo serina hidrolasa	FSITDVLVNS-KKELVFQIDDK	<i>S. Suis</i>
ST4	Resistencia a telurito	Proteína Teta	DSLQEFYFDS-KSIEQKMDG-MAAAVVK	<i>S. iniae</i>
ST1	Evasión inmune e colonización	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidasa	MKKVILASTVAL-SILGFTQATVQA-QENNAESVR	<i>S. mitis</i>
ST3		CLpX ATPasas	EENDVDLQKS-NILMIGPTGSGK-TFLAQLAR	<i>S. vestibularis</i>
ST5		CLpX ATPasas	SIIETMLDVM-FEVPSQENVKLI-RITK	<i>S. pneumoniae</i>
ST5		CLp ATPasas	WIGDAQKRTK	<i>S. agalactiae</i> <i>S. canis</i> <i>S. equi</i> <i>S. castoreus</i> <i>S. dysgalactiae</i>

Resultados e Discusión

Táboa 20. (Continuación)

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST12	Evasión inmune e colonización	CLp ATPasas	RTIQDHIE-DAITDYYLEHPK	<i>S. cristatus</i> <i>S. gordonii</i>
ST12		CLp ATPasas	ENLLQIVEL-MLADVKNKRLSS-NNIHLDVDTK	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. mitis</i>
ST14		CLpC ATPasas	EDVVKLIGN-RATR	<i>S. sinensis</i> <i>S. anginosus</i>
ST14		CLpX ATPasas	NNPVLVGDAGV-GKTVLALGLAQR	<i>S. suis</i> <i>S. pneumoniae</i>
ST5		Sialidasa A	VPTLQLANGK-TARFMTQYDTK	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. oralis</i>
ST7		Sialidasa A	EDVETNTSN-GQRVDLSSEL-DKLK	<i>S. pneumoniae</i>
ST12		Proteína de unión a colina (Cbp)	TGWVKDKG-TWYYLDK	<i>S. pneumoniae</i>
ST14		Proteína de unión a colina (Cbp)	EGSTWYYLKGS-GAMATGWA-TANGQWSYFEK	<i>S. mitis</i>
ST4		PspA/Glucosiltransferasa	TEQVLLTEAVQ-QVQR	<i>S. gordonii</i> <i>S. cristatus</i>
ST4		PspA	DLDAA-DKALEAA-QAELKAR	<i>S. mitis</i>
ST4		Ig A1 proteasa	GTESEAAKPA-PKEAGTTAG-NEVK	<i>S. pneumoniae</i>
ST11		Ig A1 proteasa	NNDKYYAIYNLK	<i>S. pneumoniae</i>
ST12		C5a peptidasa	YDPKSPAIEI-SELVKALIM-STAKPHINK	<i>S. anginosus</i>
ST8		Proteína M	SVAVAVAVL-GAAFANQTEVK	<i>S. pyogenes</i>
ST9		Proteína M	AEAVSRSN-SEQNNLEKR	<i>S. pyogenes</i>

Táboa 20. (Continuación)

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST9	Evasión inmune e colonización	Proteína M	IVAVALTVVGAG-FANQTEVK	<i>S. pyogenes</i>
ST9		Proteína M	YVEKSYHLLSD-FIDQISSTYNF-KIDNK	<i>S. cristatus</i>
ST10		Proteína Mga	KVLLTFFLDKR	<i>S. pseudoporcinus</i>
ST5		O-acetylase OafA	IVPPLVMMILLII-PFTFLVR	<i>S. henryi</i>
ST6		Peptidoglicano-N-acetilglucosamina deacetilase	DAELYQTYFAQK	<i>S. oralis</i>
ST14		Superoxido dismutase	FGSGWAWL-VVNKDGKLE-VTSTANQDTPL-SEGK	<i>S. infantarius</i> <i>S. equinus</i>
ST14	Producción de lantibióticos	Proteína LanM	RAATKFMINTD-CPSK	<i>S. pneumoniae</i>
ST14		ATP-proteína de unión al ABC transportador de Lantibiótico	STIMKIIFGLE-NADSGAIVFNG-GKNAGK	<i>S. mitis</i>
ST14		MFS transportador de Lantibióticos	DLWCNMIIAAK	<i>S. dysgalactiae</i>
ST2	ABC Transportadores	ABC transportador de Zinc	AVIARMFASDP-NIFVLDEPTTGM-DAGSK	<i>Streptococcus spp.</i>
ST5		ABC transportador de Zinc	TIYKNFMEIG-TAILMSTGLAIS-LIVMSKGGK	<i>S. cristatus</i> <i>Streptococcus sp. HMSC062B01</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. sanguinis</i>
ST1		ABC transportador de Cobre	NNLTLYEN-QYSLPIAFASQ-SIYNNVK	<i>S. mitis</i>

Resultados e Discusión

Táboa 20. (Continuación)

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST2	ABC Transportadores	ABC transportador de Cobre	SMPDAIYLFT-LLKVACMGLTS-FYSLR	<i>S. Infantarius</i> <i>S. equinus</i> <i>S. lutetiensis</i> <i>Streptococcus sp. KCJ4932</i>
ST4		ABC transportador de Metal	DGADYISVMQD-NLKALEK	<i>S. varani</i>
ST2		ABC transportador de Aminoácidos	IVLPQAFRIALP-NLTTALLNLMR	<i>Streptococcus sp. AS14</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. cristatus</i> <i>S. sp. CCH8-C6</i>
ST2		ABC transportador de Aminoácidos	TGVPLLTSPGTQ-DDLTVDAK	<i>S. sp. 449_SSPC</i> <i>S. salivarius</i>
ST3		ABC transportador de Aminoácidos	MVDGKNQVV-GADIGMAQAIA-DELGVK	<i>S. oralis</i>
ST12		ABC transportador de Aminoácidos	NLLLAPVKVQKR	<i>Streptococcus sp. 45</i> <i>S. equinus</i> <i>S. lutetiensis</i> <i>S. infantarius</i> <i>S. sp. KCJ4932</i>
ST2		ABC transportador de Glutamina	DASLAPMFVA-GAIYLIMIGLVT-LISKQVEK	<i>Streptococcus sp. DD13</i>
ST2		ABC transportador de Glutamina	KDEVIKEAEN-LLER	<i>S. sanguinis</i>
ST3		ABC transportador de Glycina/betaina	YDLQVLEDDK-QLFPPYQGAPL-MKEDLLK	<i>S. oralis</i> <i>S. mitis</i>
ST4		ABC transportador de Glycina/betaina	QEITLAY-VEWDSEVASTN-VLAEVLKTK	<i>S. infantarius</i>

Táboa 20. (Continuación)

Cepa	Función	Proteína	Péptido	100% homoloxía con NCBI
ST8	ABC Transportadores	ABC transportador de Glicina/betaina	AKLRTIVAFA- VMVLGLGAS- YAPSMIPSK	<i>S. infantis</i>
ST3		ABC transportador de Oligopeptidos	KNVQMIFQDP- QASLNAR	<i>S. infantarius</i> <i>S. lutetiensis</i>
ST12		ABC transportador de Bacteriocina	VNKGEFIAM- GESGSGK	<i>S. phocae</i>
ST1		BceAB, ABC transportador de Bacitracina	TVLGFGEFVVQL- VVIIIVAYANGY- VMK	<i>Streptococcus sp.</i> <i>HSISM1</i> <i>S. parasanguinis</i>
ST14		BceAB, ABC transportador de Bacitracina	QNIIALIQENGI- KKSVLAK	<i>S. sp. SK643</i> <i>S.</i> <i>pseudopneumoniae</i>

4.2.1.2.1 Péptidos de toxinas determinados para *Streptococcus* spp.

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* estudadas produtoras de mastite, determináronse 5 péptidos específicos para *Streptococcus* spp. dunha exotoxina piroxénica e de toxinas e antitoxinas dos operóns *RelBE* e *yefM-yoeB* (Táboa 20)

- Determinouse un péptido pertencente a toxina RelE na cepa ST1 e un péptido da antitoxina RelB para a cepa ST2. O operón *RelBE* codifica para unha antitoxina e unha toxina, a cal é autoregulada. En condicións de privación de nutrientes a antitoxina RelB que actúa como un represor transcripcional diminúe os seus niveis, e a toxina RelE é liberada paralizándo o crecemento da célula (Li et al., 2008).

Resultados e Discusión

- Outro péptido da antitoxina YefM determinouse para a cepa ST1, e neste caso, o péptido da súa toxina (YoeB) foi determinado para ST2. YefM é a antitoxina do sistema toxina-antitoxina tipo II codificado polo operón *yefM-yoeB*. Estudouse como este operón esta implicado na toxicidade de especies como *E. coli* e *Streptococcus* spp., e na formación de *biofilm* en *S. pneumoniae* (Nieto et al., 2007).
- Determinouse tamén un péptido da exotoxina piroxénica SpeK. As exotoxinas piroxénicas de *Streptococcus* spp. son superantíxenos que contribúen na invasión tisular e na liberación de sustancias proinflamatorias como as citoquinas tras a infección (Commons et al., 2008).

4.2.1.2.2 Péptidos determinados implicados na resistencia a antibióticos e a telurito

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* estudadas produtoras de mastite, determináronse 6 péptidos específicos para *Streptococcus* spp. de proteínas implicadas na resistencia a antibióticos e un péptido dunha proteína implicada na resistencia a telurito (Táboa 20).

- Identificáronse 2 péptidos da proteína MarR para as cepas ST3 e S14, ambas da especie *S. dysgalactiae*. Estes péptidos describíense por primeira vez para dita especie neste estudo. As proteínas da familia MarR actúan na regulación de proteínas que participan na resistencia de múltiples antibióticos (Grove, 2013).
- Determináronse tamén 2 péptidos de β -lactamasas tipo serina para as cepas ST8 e ST13, implicados na resistencia a antibióticos β -lactámicos (Zapun et al., 2008).
- Outro péptido foi determinado para a proteína MurM e a peptidasa da familia M56, ambas implicadas na resistencia a antibióticos. A proteína MurM encargase das modificacións dos muropeptidos da parede celular incrementando a resistencia a penicilina e cefalosporina en *S. pneumoniae* (Zapun et al., 2008). Por outro lado as pep-

tidasas da familia M56 son metalopeptidasas implicadas no sistema de transdución das beta-lactamasas. Esta familia inclúe proteínas como BlaR1 encontrados en *S. aureus* e *B. licheniformis* e, MecR1 de *S. aureus*, todos eles implicados na resistencia a antibióticos beta-lactámicos (López-Pelegrín et al., 2013).

- Ademais, determinouse un péptido da proteína TelA para a cepa ST4 implicada na resistencia a telurito (Suprenant et., 2007).

4.2.1.2.3 Péptidos determinados de proteínas implicadas na evasión inmune e colonización

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* estudadas produtoras de mastite, determináronse 24 péptidos específicos para *Streptococcus* spp. de proteínas implicadas na evasión inmune e na colonización durante a infección bacteriana (Táboa 20).

- Un péptido da proteína N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa foi identificado neste estudo para a cepa ST1. Esta proteína é unha autolisina considerada un factor de virulencia implicada na adherencia das bacterias ás células eucariotas (Carrera et al., 2017).
- Determináronse 7 péptidos pertencentes a CLp ATPasas das cales 3 son de tipo CLpX e unha de tipo CLpC. As proteasas Clp están formadas por ClpATPasas unidas a peptidasas as cales involucranse na degradación de proteínas que modulan a expresión de factores de virulencia. Estudouse como a proteína ClpX regula actividade proteolítica de determinadas enzimas e a formación de *biofilms* en *S. mutans*. Por outro lado ClpC está implicada na autólisis e na virulencia de *S. pneumoniae* (Kajfasz et al., 2009; Kwon et al., 2004).
- As sialidasas ou neuraminidasas de bacterias son enzimas hidrolíticas que eliminan as modificacións de carbohidratos do ácido siálico en glicoproteínas, glucolípidos, gangliosidos e polisacáridos promovendo a colonización por exposición da superficie das células hospedeiras.

Resultados e Discusión

dadoras ás proteínas de adherencia (Manco et al., 2006; Xiao et al., 2019). Determináronse 2 péptidos pertencentes á Sialidasa A para as cepas ST5 e ST7.

- Tamén determináronse péptidos de varias proteínas de unión a colina (Cbp). Estas proteínas presentan un modulo con función biolóxica e outro modulo de unión á residuos de colina da parede celular. Esta familia de proteínas presenta funcións de factor de virulencia e encontráronse en pneumococci e bacterias relativas a el, e tamén encontráronse en fagos asociados. Un dos péptidos determinados pertencentes a Cbp (EGSTWYYLKGSGAMATGWATANGQWSYFEK) (Táboa 20) presenta unha secuencia dunha N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa. Estudouse como as proteínas LytA e LytB que son Cbp presentan no seu módulo da función biolóxica unha N-acetylmuramoyl-L-alanine amidasa involucrada na liberación inflamatoria de ácido teicoico e péptidoglicano da parede celular e na separación das células fillas na colonización, respectivamente (Galán-Bartual et al., 2015). Identificáronse 2 péptidos pertencentes á proteína PspA para as cepas ST4, unha Cbp involucrada na unión a lactoferrina e inhibidora do complemento de inactivación (Galán-Bartual et al., 2015). Certas secuencias da PspA son homologas a glucosiltransferasas como ocorre co péptido TEQVLLTEAVQQVQR.
- Determináronse 2 péptidos para as cepas ST4 e ST11 da péptidasa IgA1, unha proteína da familia das M26, unha metalopeptidasa que únese as IgA de mamíferos (Eckhard et al., 2017).
- Determinouse tamén un péptido da peptidasa C5a para a cepa ST12. Esta proteína é unha peptidasa unida á sortasa A da parede celular e encargase de inactivar o factor de complemento C5a responsable da estimulación dos leucocitos que migran ó lugar da infección (Hynes & Sloan, 2016).

- Identificáronse 4 péptidos da proteína M característica da parede de streptococci para as cepas ST8 (un péptido) e ST9 (3 péptidos). A proteína M cando é liberada ó torrente sanguíneo actúa na coagulación durante o proceso de infección interactuando con as plaquetas formando complexos con monocitos e neutrófilos activando a resposta inflamatoria (Hynes & Sloan, 2016).
- Asociado a proteína M, determinouse un péptido da proteína Mga para a cepa ST10. Mga é unha proteína de unión que activa a expresión de factores de virulencia implicados na evasión inmune e a colonización como a proteína M e a peptidasa C5a (Ribardo et al., 2004).
- Determináronse péptidos das enzimas O-acetyltransferase (OatA) e Peptidoglycan-N-acetylglucosamine deacetylase para ST5 e ST6, respectivamente. Estas enzimas manteñen o peptidoglicano das bacterias desacetilado para impedir o seu recoñecemento polas lisozimas das células eucariotas que infectan. Estas proteínas encóntranse en bacterias como *S. pneumoniae* e *E. faecalis* (Benachour et al., 2012; Vollmer & Tomasz, 2002).
- Tras a infección, os macrófagos e neutrófilos atacan as células exógenas con superóxidos tóxicos para elas. A superóxido dimutasa producida por as bacterias, é unha metaloenzima que descompón as moléculas de superóxido favorecendo a invasión dos microorganismos patóxenos por evasión do sistema inmune (Broxton & Culotta, 2016). Determinouse un péptido da superóxido dimutasa para ST14.

4.2.1.2.4 Péptidos determinados de proteínas implicadas na produción de lantibióticos.

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* estudadas produtoras de mastite, determináronse 3 péptidos específicos para *Streptococcus* spp. de proteínas implicadas na produción de lantibióticos (Táboa 20).

A produción de antibióticos como os lantibióticos en *S. pneumoniae* foi previamente estudada (Cotter et al., 2009). Determináronse péptidos con similitude a proteínas implicadas na síntese e transporte de lantibióticos para a cepa ST14 como é a proteína de síntese de lantibiótico LanM (Cotter et al., 2009) implicada na modificación post-traduccionál dos lantibióticos, un ABC transportador de lantibiótico e un transportador MFS (*major facilitator superfamily*) de lantibióticos.

4.2.1.2.5 Péptidos determinados de transportadores ABC, asociados a factores de virulencia

As bacterias patóxenas empregan estratexias de privatización de nutrientes e liberación de substancias implicadas no estrés e evasión inmune das células hospedeiras. Estudouse como determinados transportadores ABC están implicados nestes procesos de virulencia das bacterias xogando un rol importante na propagación dos patóxenos durante a infección (Price et al., 2008; Tanaka et al., 2018).

Entre o repositorio proteómico das cepas de *Streptococcus* estudadas produtoras de mastite, determináronse 18 péptidos específicos para *Streptococcus* spp. de transportadores ABC asociados a factores de virulencia (Táboa 20) para tódalas cepas excepto ST6, ST7, e ST9. Entre estes, encóntranse péptidos de transportadores ABC de metais como zinc e cobre, e transportadores ABC de aminoácidos como a glutamina. Tamén determináronse péptidos de transportadores ABC implicados no transporte de bacteriocinas e na resistencia a antibióticos como a bacitracina. Ademais, como xa nomeamos no apartado anterior tamén determinouse un péptido de ABC transportador de lantibiótico.

No repositorio proteómico das especies de *Streptococcus* produtoras de mastite analizadas neste estudo, determináronse 58 péptidos específicos de *Streptococcus* de factores de virulencia (Táboa 20). Estes péptidos pertencen a proteínas involucradas na evasión inmune e na colonización como ClpX, Sialidasa A, PspA e a proteína M específica

de *Streptococcus*. Determináronse tamén péptidos de proteínas implicadas na resistencia a antibióticos (MarR, MurM) e telurito (TelA), toxinas (RelE e YoeB) e antitoxinas (RelB e YefM), e proteínas da produción de lantibióticos como a proteína LamN. Os péptidos de factores de virulencia poder ser útiles como biomarcadores para a detección de bacterias patóxenas nunha mostra. Un exemplo, é o caso do péptido DLWCNMIIAAK xa que é moi específico da especie *S. dysgalactiae*.

4.2.1.3 Caracterización dos péptidos de orixe fáxico para a identificación de *Streptococcus* spp. produtoras de mastite

De entre os 2546 péptidos identificados para as cepas de *Streptococcus*, 69 péptidos foron identificados como péptidos de bacteriofagos. Estes péptidos foron analizados empregando a ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990) para determinar a homoloxía coas proteínas da base de datos NCBI. Realizouse unha primeira análise coa ferramenta BLASTp incluíndo *Streptococcaceae* nos parámetros de busca. Para asegurar a exclusividade dos péptidos analizados coas especies bacterianas de *Streptococcus* e cos seus bacteriofagos, realizouse o BLASTp (Altschul et al., 1990) excluindo a familia *Streptococcaceae* nos parámetros de busca. Dós 69 péptidos identificados como péptidos de fagos, 65 son específicos de *Streptococcus* e/ou dos seus bacteriofagos segundo a busca fronte a base de datos do NCBI. Na Táboa 21 amosase a lista dos 65 péptidos e as especies de *Streptococcus* e bacteriofagos con 100% de homoloxía fronte a base de datos de proteínas do NCBI.

Como pode verse na Táboa 21, certos péptidos asignados a proteínas de bacteriofagos non presentan homoloxía con ningún péptido de bacteriofago na base de datos do NCBI. Un exemplo disto é o péptido LIDAELTKAGVRDAEIFGK da cepa ST1, asinado a unha proteína estrutural de fagos (GP20). Por outro lado, 4 péptidos determinados para as cepas de *Streptococcus* analizadas neste estudo non foron descritos previamente para bacterias na literatura e non encontrase homoloxía

Resultados e Discusión

fronte ningunha bacteria na base de datos do NCBI (so bacteriófagos de *Streptococcus*). Ademais, 64 dos 65 péptidos de orixe fájico estudados, describíense por primeira vez para as especies analizadas neste traballo (Táboa 21). Isto implica que so un péptido foi previamente descrito para as especies analizadas. Dito péptido MATNLGQAYVQIMPSAK, é moi específico para a especie *S. agalactiae* na base de datos do NCBI e para a cepa *S. agalactiae* ST2 analizada neste estudo. Por outro lado, distintos péptidos determinados en diferentes cepas analizadas de diferentes especies, están presentes nun mesmo fago.

Táboa 21. Tódelos péptidos de orixe fájico determinados para as cepas de *Streptococcus* analizadas. Amósanse os 65 péptidos de fagos, as cepas nas que foron determinados e, as bacterias e fagos con 100% de homoloxía fronte a base de datos do NCBI. PrCI, *Phage-related chromosomal island protein*; TMP, *tape measure protein*.

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST1	Proteína Gp58	MSSAESAITQNA-TEISK	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phi30c</i>
ST1	Proteína RecT	NSSGNLLSQCT-DESUYISLLDMVAQ-GLSPAkk	<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>LYG09</i>
ST1	TMP	LNSTFRLQESQLGS-NAESEK	<i>S. pyogenes</i> <i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phi1207.3</i>
ST1	Proteína da cáptide	WSGDNYSGRl-WDNTGELAR	<i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i>	
ST1	Proteína da cáptide	LSMAENGFTMFDII-PEPKACDICK	<i>S. pyogenes</i> <i>S. dysgalactiae</i>	
ST1	Proteína da cola	SNDLGLLLERERSIK	<i>S. pyogenes</i> <i>S. equi subsp. equi</i> <i>S. dysgalactiae</i>	
ST1	Proteína de fago non caracterizada	RELVDKEDTQGLAI-DAQFLYDCK	<i>S. suis</i>	

Táboa 21. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST1	Proteína da cola	RVMELSYTLYL-VKPSEEQLLSFLK-FLK	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phi-m46.1</i>
ST1	Endopeptidasa / EbhB	ITGTIISAARIGAEAI-TADKLK	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phi-SsUD.1</i> <i>Streptococcus</i> fago <i>phi-m46.1</i> <i>Streptococcus</i> fago <i>phiSC070807</i>
ST1	Proteína estrutural minoritaria GP20	LIDAELTKAGVR-DAEIFGK	<i>S. mitis</i>	
ST1	Proteína de fago non caracterizada	VKEKIAAIVNDEE-LLAK		<i>Streptococcus</i> fago P4761 <i>Streptococcus</i> fago 73 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34 <i>Streptococcus</i> fago P7952
ST1	Proteína de fago non caracterizada	MEKLIESLDNLI-MIVK	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> fago IPP19
ST2	Proteína de fago non caracterizada	TLITMTEQIKNLT-DDVK	<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus</i> fago 315.2 <i>Streptococcus</i> fago 315.6 <i>Streptococcus</i> fago 315.1
ST2	Proteína da cola	LAFSGAGNAVD-VLKNVFLAWMGI-QDVVKVAK	<i>S. suis</i>	
ST2	Proteína da cápside	AMDGMYEHINA-FNYKAEDVIGV-GKTK	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phiNJ2</i>
ST2	Proteína estrutural minoritaria	ISGITLSDTNVAG-NLISSSEHFVQML-SNIK		<i>Streptococcus</i> fago P7954 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34

Resultados e Discusión

Táboa 21. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST2	Proteína de replicación fásica	TFKGINTNNINTNI-SINNK	<i>S. canis</i>	
ST2	PrCl	TWLDDAVSVDEA-MALPENK	<i>S. pneumoniae</i>	
ST2	PbIA	MATNLGQAYV-QIMPSTAK	<i>S. agalactiae</i>	
ST3	Proteína conector cabeza-cola	TEGGIEVVY-GENGLSTGLLQRIR-MHR	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> fago IPP69
ST3	Proteína maioritaria da cola	MLANGITLSYGES-KETYTKLVGLK	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> fago phiARI0831b <i>Streptococcus</i> fago phiARI0004 <i>Streptococcus</i> fago phiARI0746 <i>Streptococcus</i> fago IPP8
ST3	Chaperona de ensamblaxe	LDDEAYDKLLDLD-NERTQEIAEK	<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus</i> virus 7201
ST3	Integrasa de fago	TKPVTVYNDNK	<i>S. parauberis</i> <i>S. agalactiae</i>	
ST3	Proteína da cápside	DDIKGSVELMLS-VWGVQKK	<i>S. pyogenes</i>	
ST3	Represor Cro/Cl	QASNLSQKDFFE-KIVK	<i>S. suis</i>	
ST3	HicB antitoxina	NEDFEMVYDSS-KSFISMVMVD-VAKYLGSQEPVK	<i>S. suis</i>	
ST4	GDSL-like lipasa de fago	LSDKPKSYTEILNNI-INSQK	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> fago IPP24 <i>Streptococcus</i> fago IPP26
ST4	DUF1372	DVVDGHYYVE-VKPYGKFLVTK	<i>S. suis</i>	

Táboa 21. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST4	Proteína da cola	FQLALLNTTTTFA-QYQCSAYIDFEGQR	<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus</i> fago vB_SthS_VA460 <i>Streptococcus</i> fago P7953 <i>Streptococcus</i> fago P7952 <i>Streptococcus</i> fago P7954 <i>Streptococcus</i> fago P7951 <i>Streptococcus</i> virus phiAbc2 <i>Streptococcus</i> fago P7955 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34 <i>Streptococcus</i> fago P4761
ST4	Proteína de fago non caracterizada	DNVLIETVKMQ-GEQAMQLVK		<i>Streptococcus</i> fago 20617 <i>Streptococcus</i> fago P7152 <i>Streptococcus</i> fago P7134 <i>Streptococcus</i> virus 9871 <i>Streptococcus</i> fago P0091
ST5	Represor Cro/CI	KERNLTQEEMADK	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago phiLP081102
ST5 e ST7	PbIB	DNFAISIKRNR	<i>S. mitis</i> <i>S. pseudopneumoniae</i> <i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> fago SpSL1
ST5	Proteína de fago non caracterizada	TTTELTITHTVGDIQKEMVRMNDNR	<i>S. pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus</i> fago IPP16 <i>Streptococcus</i> fago K13 <i>Streptococcus</i> fago 34117

Resultados e Discusión

Táboa 21. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST6	Proteína de fago non caracterizada	TEQLPFANTNLK	<i>S. pyogenes</i>	
ST7	Proteína principal da cápside	KMVEVGE-LEENPELGK	<i>S. suis</i>	
			<i>S. plurextorum</i>	
ST7	DnaD	IEEVKEEKISTSS-QNSQNIK	<i>S. henryi</i>	
ST7	TMP	VEIVQEKSNEVME-KAIDAMGR	<i>S. lutetiensis</i>	
			<i>S. equinus</i>	
ST7	Integrasa de fago	TLAKGEDNKLIFQ-TPK	<i>S. mitis</i>	
			<i>S. pseudopneumoniae</i>	
			<i>S. infantis</i>	
			<i>S. oralis</i>	
			<i>S. parasanguinis</i>	
ST8	Gp10	MAIKWQGMEKLVA-TISNAHPK	<i>S. suis</i>	
ST8	Gp348 proteína principal da cápside	QLGTKLSYITGASG-QSVALK		<i>Streptococcus</i> fago <i>Sfi11</i>
ST8	Integrasa de fago	QLFSELGSNSPRIV-FSTPTK	<i>S. parauberis</i>	
ST8	Proteína de fago non caracterizada	NKGENQKMALSTR	<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus</i> fago <i>phiZJ20091101-2</i>

Táboa 21. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
ST8	Proteína de fago non caracterizada	YPNSFTAYIMDK-GCK	<i>S. thermophilus</i> .	<i>Streptococcus</i> fago D1811 <i>Streptococcus</i> fago TP-778L <i>Streptococcus</i> fago D5842 <i>Streptococcus</i> fago vB_SthS_VA460 <i>Streptococcus</i> fago P9902 <i>Streptococcus</i> fago P9852 <i>Streptococcus</i> fago P8922 <i>Streptococcus</i> fago P9851 <i>Streptococcus</i> fago P8921 <i>Streptococcus</i> fago P7152 <i>Streptococcus</i> fago P7154 <i>Streptococcus</i> fago P7151 <i>Streptococcus</i> fago P5652 <i>Streptococcus</i> fago P5651 <i>Streptococcus</i> fago P4761 <i>Streptococcus</i> fago P0095 <i>Streptococcus</i> fago P0093 <i>Streptococcus</i> fago P0091 <i>Streptococcus</i> fago P0092 <i>Streptococcus</i> virus 9874 <i>Streptococcus</i> virus DT1 <i>Streptococcus</i> virus 7201 <i>Streptococcus</i> virus phiAbc2.
ST9	Proteína pi2	MDDLFDHSIIFDK-VETIYISTEK	<i>S. oralis</i>	

Resultados e Discusión

A maioría dos fagos de *Streptococcus* cun 100% de homoloxía fronte ós péptidos analizados, pertencen a familia *Siphoviridae*; sobre todo ós xéneros *Sfi21* e *Sfi11*. En menor medida, fagos da familia *Podoviridae* e fagos sen clasificar, determináronse cun 100% de homoloxía fronte a péptidos identificados (Táboa 22).

Táboa 22. Liñaxe, autores e números de acceso dos xenomas no NCBI dos fagos determinados con 100% de homoloxía fronte ós péptidos identificados.

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiAbc2</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus	NC_013645.1	Cuglielmotti et al., 2005
<i>Streptococcus</i> fago315.1	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Podoviridae</i> ; non clasificado <i>Podoviridae</i>	NC_004584.1	Beres et al., 2002
<i>Streptococcus</i> fago 34117	bacteriofago non clasificado	FR671407.1	Croucher et al., 2011
<i>Streptococcus</i> fago 73	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	KT717083.1	Achigar et al. 2017
<i>Streptococcus</i> fagoD5842	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	MH000602.1	Hynes, et al., 2018
<i>Streptococcus</i> fago <i>IPP26</i>	bacteriofago non clasificado	KY065467.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago <i>IPP8</i>	bacteriofago non clasificado	KY065450.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago <i>K13</i>	bacteriofago non clasificado	NC_024357.1	Croucher et al., 2014

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago P0091	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; Sfi21dt1virus; non clasificado Sfi21dt1virus	KY705251.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P0092	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae	KY705252.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P0093	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae	KY705253.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P0095	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae	KY705255.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P4761	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; Sfi21dt1virus; non clasificado Sfi21dt1virus	KY705258.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P5651	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; Sfi21dt1virus; non clasificado Sfi21dt1virus	KY705260.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P5652	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; Sfi21dt1virus; non clasificado Sfi21dt1virus	KY705261.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7134	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; Sfi21dt1virus; non clasificado Sfi21dt1virus	KY705264.1	McDonnell et al., 2017

Resultados e Discusión

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago P7151	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705265.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7152	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705266.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7154	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705267.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7951	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705277.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7952	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705278.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7953	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705279.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P7954	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705280.1	McDonnell et al., 2017

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago P7955	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705281.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P8921	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705282.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P8922	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705283.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P9851	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705284.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P9852	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705285.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago P9902	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	KY705289.1	McDonnell et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago phi7917	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Podoviridae</i> ; non clasificado <i>Podoviridae</i>	KC348601.1	Tang et al., 2012
<i>Streptococcus</i> fago phiARI0004	bacteriofago non clasificado	NC_031920.1	Croucher et al., 2016

Resultados e Discusión

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiARI0746</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_031907.1	Croucher et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi-m46.1</i>	bacteriofago non clasificado	FM864213.1	Brenciani et al., 2010
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiSC070807</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; non clasificado <i>Caudovirales</i>	KT336321.1	Huang e Wang (non publicado)
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiZJ20091101-2</i>	bacteriofago non clasificado	KX077893.1	Huang et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago TP-778L	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_022776.1	Ali et al., 2014
<i>Streptococcus</i> fago TP-J34	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	HE861935.1	Neve et al., 1998
<i>Streptococcus</i> fago 7201	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus	NC_002185.1	Stanley et al., 2000
<i>Streptococcus</i> fago 9871	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_031069.1	McDonnell et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago 9874	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_031023.1	McDonnell et al., 2016
<i>Streptococcus</i> virus DT1	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus	AF085222.2	Tremblay e Moineau, 1999

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago 20617	bacteriofago non clasificado	NC_023503.1	Arioli et al., 2018
<i>Streptococcus</i> fago 315.2	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Podoviridae</i> ; non clasificado <i>Podoviridae</i>	NC_004585.1	Beres et al., 2002
<i>Streptococcus</i> fago 315.6	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Podoviridae</i> ; non clasificado <i>Podoviridae</i>	NC_004589.1	Beres et al., 2002
<i>Streptococcus</i> fago D1811	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1virus</i> ; non clasificado <i>Sfi21dt1virus</i>	MH000604.1	Hynes et al., 2018
<i>Streptococcus</i> fago IPP16	bacteriofago non clasificado	KY065457.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago IPP19	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; non clasificado <i>Caudovirales</i>	Y065460.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago IPP24	bacteriofago non clasificado	KY065465.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago IPP62	bacteriofago non clasificado	KY065498.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago IPP69	bacteriofago non clasificado	KY065505.1	Brueggemann et al., 2017
<i>Streptococcus</i> fago LYGO9	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	JX409894.1	Bai et al. 2016

Resultados e Discusión

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago P9	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; non clasificado Siphoviridae	NC_009819.1	Tiwari e Timoney, 2006
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi1207.3</i>	dsDNA virus; Caudovirales; non clasificado Caudovirales	AY657002.1	Iannelli et al., 2014
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi20c</i>	bacteriofago non clasificado	KC348598.1	Tang et al., 2013
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi30c</i>	dsDNA virus; Caudovirales; Podoviridae; non clasificado Podoviridae	KC348599.1	Tang et al., 2013
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi5218</i>	dsDNA virus; Caudovirales; Podoviridae; non clasificado Podoviridae	KC348600.1	Tang et al., 2014
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiARI0131-1</i>	bacteriofago non clasificado	NC_031901.1	Croucher et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiARI0831b</i>	bacteriofago non clasificado	KT337369.1	Croucher et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiLP081102</i>	dsDNA virus, ;Caudovirales; Podoviridae; non clasificado Podoviridae	KX077890.1	Huang et al., 2016
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiNJ2</i>	dsDNA virus; Caudovirales; Siphoviridae; non clasificado Siphoviridae	NC_019418.1	Tang et al., 2013

Táboa 22. (Continuación)

Bacteriofago	Liñaxe	Nº de acceso	Autores
<i>Streptococcus</i> fago <i>phi-SsUD.1</i>	dsDNA virus, <i>Caudovirales</i> ; non clasificado <i>Caudovirales</i>	FN997652.1	Palmieri et al., 2011
<i>Streptococcus</i> fago <i>SpSL1</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_027396.1	Furi,L et al., (non publicado)
<i>Streptococcus</i> fago <i>vB_SthS_VA460</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi21dt1</i> virus; non clasificado <i>Sfi21dt1</i> virus	MG708275.1	Duarte et al., 2018
<i>Streptococcus</i> virus <i>Sfi11</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Sfi11</i> virus	NC_002214.1	Lucchini et al., 1999
<i>Streptococcus</i> fago <i>phiZJ20091101-2</i>	bacteriofago non clasificado	KX077893.1	Huang et al., 2016

4.2.1.3.1 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus uberis*

As cepas analizadas da especie *S. uberis* son ST1, ST8 e ST11. Entre os péptidos determinados para ST11 non encontrouse ningún péptido de fagos. Para as cepas ST1 e ST8 determináronse 13 péptidos e 5 péptidos de fagos, respectivamente. Mediante a ferramenta BLASTp, 12 fagos diferentes foron asignados por homoloxía ós péptidos da cepa ST1 e 25 ós péptidos da cepa ST8 (Táboa 21). Encontrouse homoloxía cun mesmo fago P4761, para diferentes péptidos das dúas cepas ST1 e ST8.

Resultados e Discusión

A maioría dos péptidos determinados para ST1 pertencen a proteínas estruturais de fagos como proteínas da cápside e da cola, a proteína estrutural minoritaria da familia GP20, a proteína Gp58 e a proteína TMP (*tape measure protein*). A proteína Gp58 foi descrita en bacteriófagos virulentos coma o fago *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LL-H (Mikkonen & Alatossava, 1994). A proteína TMP determina a lonxitude da cola e facilita a entrada do DNA na célula durante a infección. Algunhas proteínas TMP portan dominios similares a lisozimas e peptidasas (Mahony et al., 2016; Rodriguez-Rubio et al., 2012). Un péptido da proteína RecT foi identificado para a cepa ST1. Esta proteína está implicada na reparación do DNA promovendo a hibridación das hebras do DNA no momento da súa recombinación. Estudouse a presenza destas proteínas en bacterias e o seu orixe en bacteriofagos (Iyer et al., 2002; Menouni et al., 2015). Tamén foi determinado un péptido da proteína EhbB para a cepa ST1. EhbB é unha adhesina con múltiples dominios considerada a proteína que codifica a secuencia máis longa de *S. aureus* implicada na aglutinación, produción de *biofilm*, evasión da fagocitosis e unión a matriz extracelular que infecta (Walker et al., 2013). Por último, identificouse un péptido pertencente a unha endopeptidasa para a mesma cepa.

Entre os 5 péptidos de fagos determinados para a cepa ST8, encóntrase un péptido dunha proteína da familia Gp10 que son compoñentes da cola encontrados en *Caudovirales*; unha integrasa, dous péptidos de proteínas non caracterizadas e un péptido da proteína Gp348. Un dos péptidos identificados para ST8 foi asignado a unha proteína non caracterizada e presenta 100% homoloxía con péptidos presentes tamén en 23 fagos diferentes da base de datos do NCBI. A proteína Gp348 é a proteína principal da cápside E (GpE), implicada no mantemento da forma condensada do DNA na cápside (Dokland & Murialdo, 1993).

4.2.1.3.2 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus parauberis*

As cepas analizadas da especie *S. parauberis* son ST4 e ST5. Para as cepas ST4 e ST5 determináronse 4 péptidos e 3 péptidos de fagos, respectivamente. Mediante a ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990), 16 fagos diferentes foron asignados por homoloxía ós péptidos da cepa ST4 e 5 ós péptidos da cepa ST5 (Táboa 21).

Entre os péptidos de fagos identificados para ST4 encontráronse péptidos da proteína da cola, dunha proteína GDSL-*like*, dunha proteína non caracterizada e, un péptido do dominio DUF1372 de función descoñecida. Existe unha gran cantidade de secuencias de proteínas non caracterizadas nas bases de datos e máis do 20% de tódolos dominios proteicos son anotados como dominios de función descoñecida (DUFs) (Bateman et al., 2010; Goodacre et al., 2014). O dominio DUF1372 son secuencias de bacteriofagos de *Streptococcus* e proteínas relacionadas con especies de *Streptococcus*. A proteína da familia GDSL-*like* lipasa/acilhidrolasa, son enzimas hidrolíticas con múltiples funcións (Akoh et al., 2004).

Os péptidos determinados para a cepa ST5 pertencen a unha proteína de superficie PblB, unha proteína non caracterizada e o represor tipo Cro/CI. As proteínas de superficie PblB e PblA, son codificadas en fagos de *Streptococcus* e son incorporadas ás súas partículas involucrándose no ensamblaxe da cola. Isto suxire que estas proteínas en bacterias proveñen no seu orixe de bacteriofagos. Estudouse que *S. mitis* codifica estas proteínas aumentando a súa habilidade de unión a plaquetas (Bensing et al., 2001; Mitchell et al., 2007). PblA encontrouse tamén en *Streptococcus oralis*, *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*.

O represor Cro/CI do que encontrouse tamén un péptido tras a análise da cepa ST5, localízase no modulo de lisoxenia do fago, igual que as integrasas e as demais proteínas de regulación. Se o represor CI predomina o fago permanecerá en estado lisoxénico. No caso contra-

rio, onde predomina a expresión de Cro, o fago tornará á fase lítica. A proteína XRE (elemento de resposta xenobiótica) é unha proteína reguladora moi estendida en bacterias cunha estrutura e lugar de unión ó DNA moi parecido a proteína Cro do fago lambda. Encontramos que os péptidos asinados ó represor Cro/CI de fagos neste estudo, ó ser analizados pola ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990) fronte a base de datos do NCBI, tamén presentan homoloxía con XRE de bacterias; neste caso con *Streptococcus*.

4.2.1.3.3 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus dysgalactiae*

As cepas analizadas da especie *S. dysgalactiae* son ST3, ST9 e ST14. Para as cepas ST3 e ST9 determináronse 7 péptidos e 2 péptidos de fagos, respectivamente. Para a cepa ST14 identificáronse 5 péptidos, e só para un deles obtívose homoloxía con dous fagos diferentes de *Streptococcus* mediante a ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990). No caso de ST3 e ST9, 7 fagos e un fago foron asignados por homoloxía, respectivamente (Táboa 21).

Dos péptidos determinados para ST3, 4 pertencen a proteínas estruturais de fagos como son, a proteína principal da cola, unha proteína da cápside, o conector cabeza-cola e a chaperona de ensamblaxe do fago. Esta chaperona é necesaria para a morfoxénese dos fagos de cola larga (Pell et al., 2013). Un péptido dunha integrase e do represor Cro/CI tamén foron determinados para a cepa ST3. Ademais, outro péptido pertencente a proteína fáxica da familia das antitoxinas HicB foi determinado para esta cepa. Esta proteína provén do loci toxina-antitoxina que codifica para unha toxina e unha antitoxina que únese ó DNA e auto-regula ó operón. Este operón presenta unha filoxénia moi complexa e encóntranse en plásmidos, xenomas bacterianos e fagos debido a HGT (Jørgensen et al., 2009) (Táboa 21).

Os péptidos determinados para a cepa ST9 pertencen a unha proteína non caracterizada e unha proteína pi2 dun profago. Para a cepa ST14 os péptidos determinados pertencen a unha proteína da familia das integrasas, a un represor tipo Cro/ CI, a un TMP e unha proteína non caracterizada (Táboa 21).

4.2.1.3.4 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus agalactiae*.

As cepas analizadas da especie *S. agalactiae* son ST2, ST6 e ST7. Para a cepa ST2 determináronse 7 péptidos de fagos. Para as cepas ST6 e ST7 determináronse un péptido e 5 péptidos de fagos, respectivamente. No caso de ST2 e ST7, encontrouse que os péptidos determinados presentan homoloxía con 7 fagos e un fago descritos, respectivamente. Polo contrario, para o péptido da proteína non caracterizada determinado para ST6, ningún fago presenta homoloxía fronte a base de datos do NCBI (Táboa 21).

Algúns dos péptidos determinados para ST2 pertencen a proteínas estruturais como proteínas da cola, da envoltura e a proteína minoritaria estrutural (Táboa 21). O péptido MATNLGQAYVQIMPSAK determinado para a cepa ST2, pertencente á proteína de superficie PblA e é un péptido moi específico de *S. agalactiae*. Isto non ocorre para as demais secuencias peptídicas estudadas, as cales están presentes en proteínas de diferentes especies de *Streptococcus* (Táboa 21). Péptidos de proteínas fáxicas como a proteína de replicación de fagos, a PrCI (*phage related-chromosomal island protein*) e unha proteína non caracterizada, tamén foron determinados para ST2. As proteínas PrCIs presentan un conxunto de función específicas de fagos implicadas no seu ciclo de reprodución e portan xenes de resistencia a antibióticos e a outros fagos, proteínas indutoras de produción de *biofilm* e máis. Diversos PrCIs foron identificados para as especies *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* e *L. lactis* (Novick et al., 2012).

Os péptidos determinados para a cepa ST7 pertencen a unha proteína principal da cápside, unha TMP, unha integrasa de fagos, unha DnaD con dominio asociado a fago (*DnaD and phage-associated domain-containing protein*) e unha proteína de superficie PbB (Táboa 21). A DnaD está involucrada na replicación do DNA e pode unirse ó DNA e formar largos complexos de nucleoproteínas. Encontráronse motivos similares en proteínas de función descoñecida de fagos e bacterias (Carneiro et al., 2006; Huang et al., 2016). O mesmo péptido da proteína de superficie PblB determinado para a cepa ST7, determinouse para ST5, sendo a primeira vez que un péptido de esta proteína é identificado nas especies *S. agalactiae* e *S. parauberis*.

4.2.1.3.5 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus canis*

A cepa ST10 pertence á especie *S. canis*, para esta cepa determináronse 5 péptidos de orixe fáxico. As proteínas ás que pertencen estes péptidos foron o represor tipo Cro/CI, unha integrasa, unha proteína non caracterizada de fagos e unha proteína principal da cola de fagos. Encontrouse que dous dos péptidos determinados para ST10 presentan homoloxía con 3 fagos descritos na base de datos do NCBI (Táboa 21).

4.2.1.3.6 Péptidos de fagos determinados para *Streptococcus gallolyticus*

As cepas analizadas da especie *S. gallolyticus* son ST12 e ST13. Para a cepa ST12 determináronse 4 péptidos de fagos e, no caso da cepa ST13, 6 péptidos foron identificados. Na análise de ST12, encontrouse que os péptidos determinados presentan homoloxía con 2 fagos descritos do NCBI, do mesmo xeito que para ST13 (Táboa 21).

Os péptidos identificados para a cepa ST12 pertencen a unha endopeptidasa de fagos, unha proteína non caracterizada do fago phiARI0131-1 e unha proteína da familia PBSX de fagos. Tamén determinouse unha secuencia peptídica dunha citosina metil transferasa (Táboa 21). Esta pro-

teína é unha DNA metiltransferasa de tipo II C5-metilcitosina (clase III), asociada a una endonucleasa de restrición, involucrada na protección da bacteria fronte a invasión de DNA exógeno. Foron encontradas tanto en bacterias como en xenomas de bacteriófagos nos que confírelle a habilidade de protección fronte Reasas (*cognate restriction endonuclease*) das bacterias que infectan (Murphy et al., 2013). No caso das proteínas da familia PBSX en fagos están involucrados na entrada do DNA no interior da cápside durante o seu empacotado (Gual et al., 2000).

Entre os péptidos de fagos determinados para ST13 encóntanse péptidos do conector cabeza-cola, un péptido dunha TMP, un péptido dunha endopeptidasa de fagos, dous péptidos de proteínas non caracterizadas e un péptido dunha proteína da familia PBSX de fagos (Táboa 21).

4.2.1.3.7 Estudo filoxenómico dos fagos de *Streptococcus* determinados.

Para levar a cabo o estudo filoxenómico dos fagos de *Streptococcus* que presentan 100% de similitude (Táboa 22) fronte os péptidos determinados, tomáronse as súas secuencias xenómicas da base de datos GenBank e construíuse a árbore filoxenómica mediante o programa bioinformático VICTOR (*Virus Classification and Tree Building Online Resource*) (Meier-Kolthoff & Göker, 2017) (Figura 35).

Xenomas de bacteriofagos ben coñecidos das principais familias de *Caudovirales* coma o fago *Lambda* (*Siphoviridae*), o fago *T4* (*Myoviridae*) e o fago *T7* (*Podoviridae*), foron engadidos para a construción da árbore filoxenómica con fines comparativos.

Resultados e Discusión

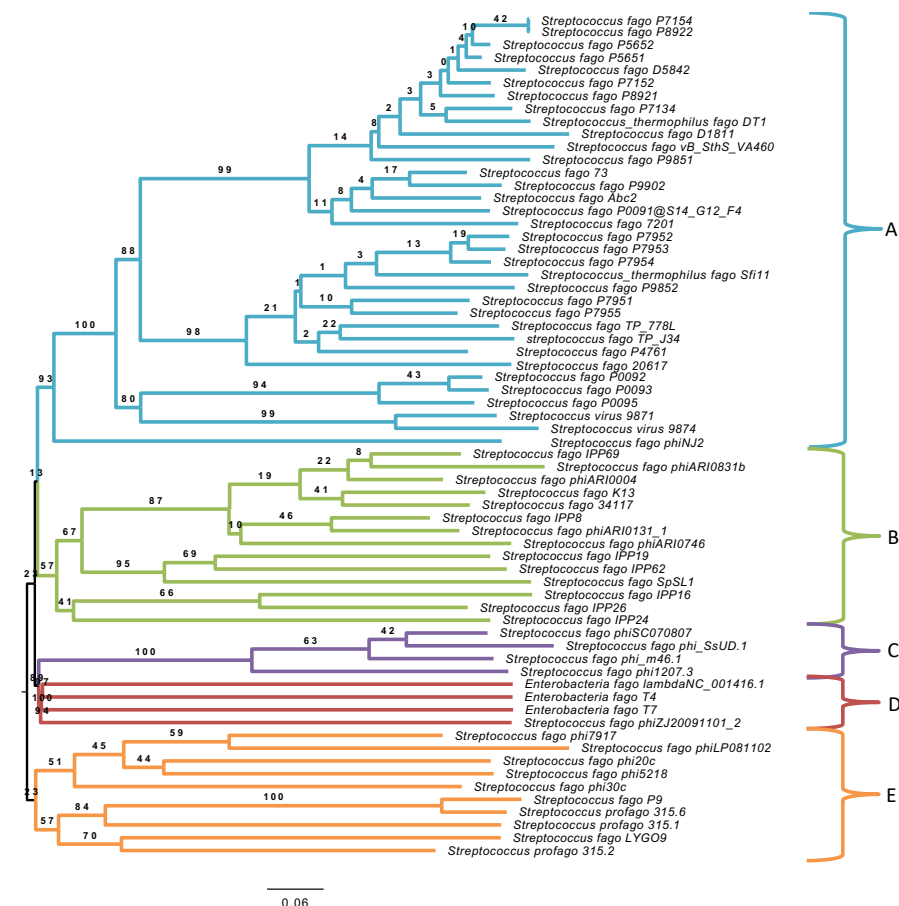


Figura 35. Arbore filoxenómica dos fagos de *Streptococcus* determinados con 100% homoloxía fronte os péptidos identificados e os fagos *Lambda* (NC_001416.1), *T4* (NC_000866.4) e *T7* (NC_001604.1). A árbore filoxenética construíuse mediante o servizo web VICTOR o cal basease no cálculo das distancias interxenómicas coa ferramenta GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*). Para a construción das ramificacións calculouse o *pseudo-bootstrap* incluíndo 100 replicas. Os códigos de acceso ó GenBank dos xenomas dos fagos determinados amósanse na Táboa 22. Os diferentes Clusters representanse por cores: azul claro, *Cluster A*; verde claro, *Cluster B*; morado, *Cluster C*; vermello, *Cluster D*; laranxa, *Cluster E*.

A figura 35 representa ata o momento, a primeira árbore filoxenómica construída dos fagos implicados na infección de *Streptococcus* spp. produtoras de mastite, ou polo menos dunha parte deles. A análise da árbore permitiunos establecer 5 *Clusters* ben definidos. As dúas ramas principais separan o *Cluster A*, B e C do E. Os *Clusters A* e B

localízanse na mesma rama secundaria e, o mesmo ocorre cos *Clusters* C e D. O *Cluster* A está formado por virus da familia *Siphoviridae* de *Streptococcus*, a maioría clasificados como virus do xénero *Sfi21 dt1*. O *Cluster* B está formado por fagos de *Streptococcus* non clasificados e dous fagos da familia *Siphoviridae*. *Cluster* C está formado por fagos de *Streptococcus* non clasificados. O *Cluster* D, o cal está moi próximo ó *Cluster* C, está formado polo fago lambda, T4, T7 e polo bacteriófago de *Streptococcus phi1207.3* non clasificado, illado orixinariamente de *S. pyogenes* (Iannelli et al., 2014). Finalmente, o *Cluster* E fórmao virus de *Streptococcus* da familia *Podoviridae* e fagos de *Streptococcus* non clasificados.

Tras a análise da árbore filoxenómica, observouse como os mesmos péptidos encóntranse en distintos fagos moi próximos na árbore. Na Táboa 23 amósanse os potenciais péptidos biomarcadores encontrados en bacteriofagos do mesmo *Cluster* na árbore filoxenómica.

Ademais, estudouse a relación entre os fagos determinados e as bacterias que presentan os mesmos péptidos fronte a base de datos do NCBI. Observouse como certas especies de *Streptococcus* relaciónanse con determinadas ramas dos *Clusters*. Por exemplo, cepas de *S. thermophilus* comparten secuencias peptídicas especificamente con fagos do *Cluster* A, e a especie *S. pneumoniae* comparte secuencias peptídicas especificamente con fagos do *Cluster* B. Por outro lado, *S. suis* comparte secuencias peptídicas especificamente con fagos do *Cluster* C. Polo contrario, os fagos do *Cluster* E comparten péptidos encontrados en variedade de especies de *Streptococcus*. As especies bacterianas *S. uberis* e *S. parauberis* comparten secuencias peptídicas con fagos de tódolos *Clusters*. Estes resultados xunto coa arbore filoxenómica (Figura 35), amosan que a relación filoxenómica entre fagos vai asociado coas bacterias que infectan e/ ou viceversa.

Resultados e Discusión

Táboa 23. Potenciais péptidos biomarcadores de *Streptococcus* de orixe faxico e a relación de estes péptidos cos *Clusters* xerados na árbore filoxenómica.

Proteína	Péptido	Bacteriofagos	Cluster
Proteína de fago non caracterizada	YPNSFTAYIMDVKGCK	<i>Streptococcus</i> fago D1811 <i>Streptococcus</i> fago TP-778L <i>Streptococcus</i> fago D5842 <i>Streptococcus</i> fago vB_SthS_VA460 <i>Streptococcus</i> fago P9902 <i>Streptococcus</i> fago P9852 <i>Streptococcus</i> fago P8922 <i>Streptococcus</i> fago P9851 <i>Streptococcus</i> fago P8921 <i>Streptococcus</i> fago P7152 <i>Streptococcus</i> fago P7154 <i>Streptococcus</i> fago P7151 <i>Streptococcus</i> fago P5652 <i>Streptococcus</i> fago P5651 <i>Streptococcus</i> fago P4761 <i>Streptococcus</i> fago P0095 <i>Streptococcus</i> fago P0093 <i>Streptococcus</i> fago P0091 <i>Streptococcus</i> fago P0092 <i>Streptococcus</i> fago 9874 <i>Streptococcus</i> fago phiAbc2.	Cluster A
Proteína de fago non caracterizada	VKEKIAAIVNDEELLA	<i>Streptococcus</i> fago P4761 <i>Streptococcus</i> fago 73 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34 <i>Streptococcus</i> fago P7952	Cluster A
Proteína estrutural minoritaria	ISGITLSDTNVAGN-LISSSEHFVQMLSNIK	<i>Streptococcus</i> fago P7954 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34	Cluster A

Táboa 23. (Continuación)

Proteína	Péptido	Bacteriofagos	Cluster
Proteína da cola	FQLALLNTTTTFAQY-QCSAYIDFEGQR	<i>Streptococcus</i> fago vB_SthS_VA460 <i>Streptococcus</i> fago P7953 <i>Streptococcus</i> fago P7952 <i>Streptococcus</i> fago P7954 <i>Streptococcus</i> fago P7951 <i>Streptococcus</i> virus phiAbc2 <i>Streptococcus</i> fago P7955 <i>Streptococcus</i> fago TP-J34 <i>Streptococcus</i> fago P4761	Cluster A
Proteína de fago non caracterizada	DNVLIETVKMQ-GEQAMQLVK	<i>Streptococcus</i> fago 20617 <i>Streptococcus</i> fago P7152 <i>Streptococcus</i> fago P7134 <i>Streptococcus</i> virus 9871 <i>Streptococcus</i> fago P0091	Cluster A
Proteína de fago non caracterizada	TTTELTITHTVGDII-QKEMVRMNDR	<i>Streptococcus</i> fago IPP16 <i>Streptococcus</i> fago K13 <i>Streptococcus</i> fago 34117	Cluster B
Proteína principal da cola	MLANGITLSYGESKE-TYTKLVGLK	<i>Streptococcus</i> fago phiARI0831b <i>Streptococcus</i> fago phiARI0004 <i>Streptococcus</i> fago phiARI0746 <i>Streptococcus</i> fago IPP8	Cluster B
Proteína de fago GDSL-like	LSDKPKSYTEILNNI-INSQK	<i>Streptococcus</i> fago IPP24 <i>Streptococcus</i> fago IPP26	Cluster B
Endopeptidasa/EbhB	ITTGIIISAARIGAEAITA-DKLLK	<i>Streptococcus</i> fago phi-SsUD.1 <i>Streptococcus</i> fago phi-m46.1 <i>Streptococcus</i> fago phiSC070807	Cluster D
Proteína Gp58-like	HAQGDVGVNINSV-TQRIVPANINAESEI-WSK	<i>Streptococcus</i> fago phi20c <i>Streptococcus</i> fago phi7917	Cluster E
Proteína de fago non caracterizada	TLITMTEQIKNLTDDVK	<i>Streptococcus</i> fago 315.2 <i>Streptococcus</i> fago 315.6 <i>Streptococcus</i> fago 315.1	Cluster E

4.2.1.3.8 Estudo filoxenético do xene holin dos fagos de *Streptococcus* determinados

Co obxectivo de comparar a árbore filoxenomica cunha árbore filoxenetica, seleccionouse o xene *holin* para a construción de dita árbore. A proteína holina é esencial para a lise das células do hospedador bacteriano e constitúe unha das proteínas máis diversas no xenoma dos fagos. A holina foi empregada tamén en estudos previos na análise filoxenética de diversos fagos (Wang et al., 2000; Goerke et al., 2009). Para a comparación do xene *holin* xerouse a árbore filoxenética coas secuencias dos fagos determinados da base de datos GenBank con 100% de homoloxía fronte os péptidos identificados e, do fago T7 (NC 001604.1) e o fago lambda (NC 001416.1). As secuencias da proteína tomáronse das holinas anotadas no xenoma dos fagos e os números de acceso dos fagos determinados encóntranse na Táboa 22. Construíuse a árbore mediante o programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) baseándose nos modelos de análises *Maximum-Likelihood* (ML) (Rogers & Swofford, 1998) (Figura 36).

Algúns fagos presentan dous secuencias do xene nos seus xenomas, as cales diferéncianse en clase I e clase II. Isto ocorre con algúns bacteriofagos analizados que aparecen en diferentes *Clusters* da árbore filoxenética. Na árbore filoxenética pode apreciarse como estas especies forman *Clusters* similares ó da arbore filoxenómica (Figura 35). Os *Clusters* A e B da árbore filoxenómica están ben definidos na árbore filoxenética do xene *holin* (Figura 36).

No repositorio proteómico das especies de *Streptococcus* produtoras de mastite analizadas neste estudo, determináronse 65 péptidos específicos de *Streptococcus* de orixe fáxico, pertencentes a proteínas como RecT, o represor Cro/CI, a proteína de superficie PblB e PblA, a antitoxina HicB, a DnaD e os PrCIs. Os péptidos de fagos poder ser útiles como biomarcadores para a detección de bacterias patóxenas e/ou dos seus fagos indistintamente nunha mostra. Un bo exemplo, é o péptido MATNLG-

QAYVQIMPSAK da proteína PblA, xa que é moi específico da especie *S. agalactiae*. Por outro lado, o estudo e análise da arbore filoxenómica (Figura 35) e dos péptidos determinados, amosa que a relación filoxenómica entre fagos vai asociado coas bacterias que infectan e/ ou viceversa.

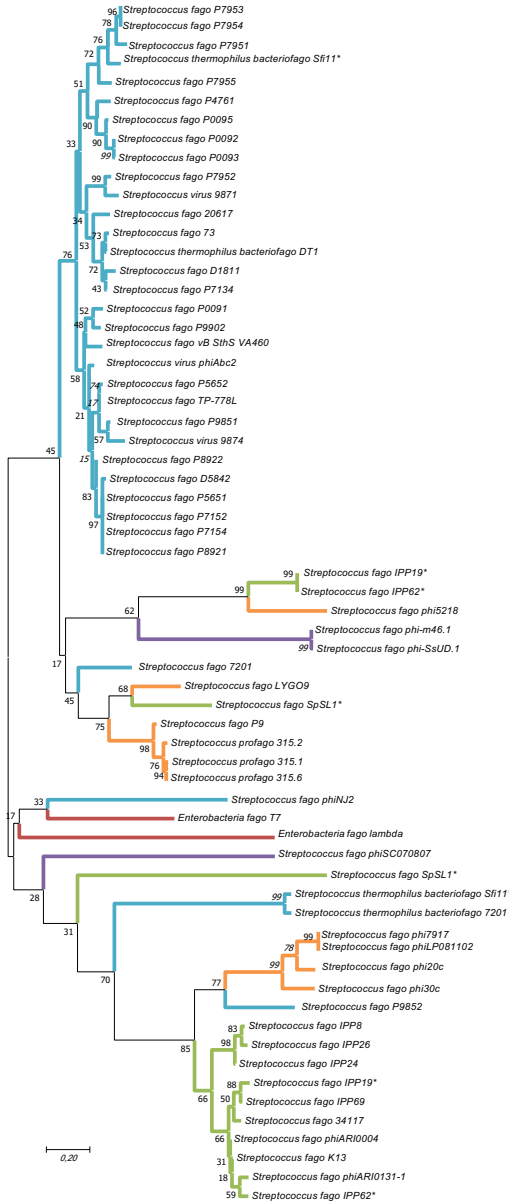


Figura 36. Árbore filoxenética das secuencias do xene *holin* dos bacteriofagos determinados, baseada no modelo *Maximum-Likelihood* (ML) (Rogers & Swofford, 1998) co parámetro de kimura-2 (Kimura, 1980). A significancia de cada rama indicase polo valor do bootstrap que foi calculado en porcentaxe de 1000 subconxuntos. Bar, 20 nt substitucións por 100 nt. Os códigos de acceso ó GenBank dos xenomas dos fagos determinados coas proteínas anotadas amósanse na Táboa 22. Os fagos dos diferentes *Clusters* definidos para a árbore filoxenómica (Figura 35) representáanse polas cores das súas ramas: azul claro, *Cluster* A; verde claro, *Cluster* B; morado, *Cluster* C; vermello, *Cluster* D; laranxa, *Cluster* E. * Fagos con 2 xenes *holin* na árbore.

4.2.2 Caracterización dos péptidos para a identificación de *Staphylococcus aureus* mediante LC-ESI-MS/MS.

4.2.2.1 Repositorio proteómico de *S. aureus* produtoras de mastite

Tras a análise mediante LC-ESI-MS/MS das cepas de *S. aureus*, 1135 péptidos non redundantes correspondentes a 644 proteínas foron identificados por Carrera et al. (2017). Carrera et al. (2017) tamén realizou análises bioinformáticas para o estudo dos péptidos das 20 cepas de *S. aureus* analizadas e a selección de potenciais péptidos biomarcadores específicos de especie centrándose especialmente nos factores de virulencia.

4.2.2.2 Caracterización dos péptidos de orixe fájico para a identificación de *S. aureus*

De entre os 1135 péptidos identificados para as cepas de *S. aureus*, 12 péptidos foron identificados como péptidos de bacteriofagos. Estes péptidos foron analizados empregando a ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990) para determinar a homoloxía coas proteínas da base de datos NCBI. Realizouse unha primeira análise coa ferramenta BLASTp incluíndo e excluindo *Staphylococcus* nos parámetros de busca. Para determinar a especificidade dos péptidos analizados con *S. aureus* e cos seus bacteriofagos, realizouse o BLASTp excluindo *S. aureus* nos parámetros de busca. Dos 12 péptidos de fagos identificados, 5 son específicos de *S. aureus* e tódolos péptidos determinados presentan homoloxía con bacteriofagos de *Staphylococcus* fronte a base de datos do NCBI. Na Táboa 24 amosase a lista dos 12 péptidos e, as especies bacterianas e bacteriofagos con 100% de homoloxía fronte a base de datos de proteínas do NCBI.

Como pode observarse na Táboa 24, 7 dos péptidos de fagos determinados non son específicos da especie *S. aureus* e encóntranse tamén en outras especies de *Staphylococcus*. Como excepción, o péptido

LLHALPTGNDSGGDKLLPK tamén foi atopado en *S. pneumoniae*. Por outro lado, os péptidos IRLPYYDVK, LYVGVFNPEATK, IY-NEIDEALKSK, SIINGKLD SQWTV PNEHK, e MNDSNQGLQANP-QYTIHYLSQEITR son moi específicos da bacteria *S. aureus* fronte a base de datos do NCBI . Encontráronse homoloxías cos mesmo fagos para diferentes péptidos das cepas analizadas como ocorre, por exemplo, cos virus de *Staphylococcus 3a* e *phiN315* entre outros (Táboa 24).

Táboa 24. Tódolos péptidos de orixe fájico determinados para as cepas de *S. aureus* analizadas. Amósanse os 12 péptidos de fagos, as cepas nas que foron determinados e as bacterias e fagos con 100% de homoloxía fronte a base de datos de proteínas do NCBI.

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
S9	Proteína principal da cápside	IYDRNSDTLD-GLPVVNLK	<i>S. aureus</i> <i>S. argenteus</i>	<i>Staphylococcus</i> virus 85 <i>Staphylococcus</i> fago SP5 <i>Staphylococcus</i> virus phiETA2 <i>Staphylococcus</i> fago phiNM <i>Staphylococcus</i> virus SAP26
S4	Proteína de fago non caracterizada	IRLPYYDVK	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago StauST398-2
S4	Proteína de fago non caracterizada	AVAELLKEINR	<i>S. argenteus</i> <i>S. simiae</i> <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> virus 71 <i>Staphylococcus</i> virus 55 <i>Staphylococcus</i> virus 88

Resultados e Discusión

Táboa 24. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
S4	Proteína principal da cápside	LLHALPTG- NDSGGDK- LLPK	<i>S. aureus</i> <i>S. xylosus</i> <i>S. muscae</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. argenteus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st72</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st121mssa</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-2</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>LH1</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st30</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>tp310-2</i> .
S7	Proteína principal da cola	LYVGVFNPEA- TK	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago <i>SH-St 15644</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>P240</i>

Táboa 24. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
S8	Proteína principal da cola	AYINITGLGFAK	<i>S. aureus</i> <i>S. argenteus</i> <i>Pararheinheimera mesophila</i>	<i>Staphylococcus</i> fago phiNM3 <i>Staphylococcus</i> fago StauST398-4 <i>Staphylococcus</i> fago phiN315 <i>Staphylococcus</i> fago phi7247PVL <i>Staphylococcus</i> fago phiSa2wa_st22 <i>Staphylococcus</i> virus 77 <i>Staphylococcus</i> fago P954
S11 e S20	Represor tipo Cro/CI	ELAEAIGVSQP-TVSNWIQQTK	<i>S. aureus</i> <i>S. argenteus</i> <i>S. sciuri</i>	<i>Staphylococcus</i> virus IPLA35 <i>Staphylococcus</i> fago SMSAP5 <i>Staphylococcus</i> fago vB_SauS_phi2
S11 e S20	Represor tipo Cro/CI	IQQLADYFN-VPK	<i>S. aureus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. warneri</i> <i>S. capitis</i> <i>S. argenteus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago SMSAP <i>Staphylococcus</i> fago vB_SauS_phi2 <i>Staphylococcus</i> virus IPLA35
S12	Complemento inhibidor	IYNEIDEALKS-K.Y	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago 13 <i>Staphylococcus</i> fago phiNM3

Resultados e Discusión

Táboa 24. (Continuación)

Cepa	Proteína	Péptido	Bacterias con 100% homoloxía	Fagos con 100% homoloxía
S20	Proteína principal da cápside	VSYTLDDDD-FITDVETAK	<i>S. aureus</i> , <i>S. haemolyticus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. argenteus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>S. sciuri</i>	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st72</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>tp310-2</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st121mssa</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-2</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>LH1</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st30</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i>
S20	DUF2479	SIINGKLDL-QWTPNEHK	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago <i>DW2</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>IPLA88</i>
S8	Proteína de fago non caracterizada	MNDSNQGL-QANPQYTI-HYLSQEITR	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiN315</i>

Determináronse 30 fagos de *Staphylococcus* cun 100% de homoloxía fronte ós péptidos analizados, pertencentes todos eles á familia *Siphoviridae*. Dos 30 bacteriofagos, 8 pertencen o xénero *Phietavirus*, 6 a *Biseptimavirus*, 14 ó xénero *Triavirus* e os demais non foron clasificados dentro de xénero. Na Táboa 25 expóñese a liñaxe de cada fago determinado e o número de acceso no NCBI.

Táboa 25. Liñaxe, autores e números de acceso dos xenomas no NCBI dos fagos determinados con 100% de homoloxía. N^o, número.

Nome	Liñaxe	N ^o Acceso	Autores
<i>Staphylococcus</i> virus 85	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_007050.1	Kwan et al., 2005.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st72</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	MG029513.1	O'Brien et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiNM3</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i> ; non clasificado <i>Biseptimavirus</i>	NC_008617.1	Bae et al., 2006.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>SH-St 15644</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	MG770897.1	Ji, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiN315</i> ,	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>	NC_004740.1	Kuroda et al., 2001.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>DW2</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i> ; non clasificado <i>Phietalikevirus</i>	NC_024391.1	Keary et al., 2014.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-2</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	NC_021323.1	Van Der Mee-Marquet et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> virus 71	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_007059.1	Kwan et al. (2005).
<i>Staphylococcus</i> virus <i>IPLA35</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i>	NC_011612.1	García et al. (2009).
<i>Staphylococcus</i> fago <i>SMSAP5</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	NC_019513.1	Lee, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> virus <i>phiETA2</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_008798.1	Sawada, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st121mssa</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	MG029518.1	O'Brien, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	NC_028862.1	El Haddad et al. (non publicado)

Resultados e Discusión

Táboa 25. (Continuación)

Nome	Liñaxe	Nº Acceso	Autores
<i>Staphylococcus</i> virus 88	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_007063.1	Kwan et al., 2005.
<i>Staphylococcus</i> fago SP5	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i> ; non clasificado <i>Phietalikevirus</i>	JX274646.1	Yoon et al., 2013.
<i>Staphylococcus</i> fago tp310-2	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	NC_009762.3	Reichholf, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-4</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i> ; non clasificado <i>Biseptimavirus</i>	NC_023499.1	Van Der Mee-Marquet et al., 2013.
<i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i>	NC_004616.1	landolo et al., 2002.
<i>Staphylococcus</i> virus <i>IPLA88</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_011614.1	García et al., 2009.
<i>Staphylococcus</i> virus 55	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_007060.1	Kwan et al., 2005.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiNM</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; non clasificado <i>Siphoviridae</i>		
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phi7247PVL</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i> ; non clasificado <i>Biseptimavirus</i>	AP011956.1	Zhang et al., 2011.
<i>Staphylococcus</i> virus 3a	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i>	NC_007053.1	Kwan et al., 2005.
<i>Staphylococcus</i> virus <i>SAP26</i> .	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Phietavirus</i>	NC_014460.1	Rahman, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago <i>LH1</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	JX174275.1	El Haddad et al., 2013.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st22</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i> ; non clasificado <i>Biseptimavirus</i>	MG029510.1	O'Brien, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> virus 77	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i>	NC_005356.1	Liu et al., 2004.

Táboa 25. (Continuación)

Nome	Liñaxe	Nº Acceso	Autores
<i>Staphylococcus</i> fago P240.	sDNA virus; ; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	KY056620.1	Kraushaar et al., 2017.
<i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i>	NC_002661.2	Narita et al., 2001.
<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st30</i>	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Triavirus</i> ; non clasificado <i>Triavirus</i>	MG029511.1	O'Brien, et al. (non publicado)
<i>Staphylococcus</i> fago P954	dsDNA virus; <i>Caudovirales</i> ; <i>Siphoviridae</i> ; <i>Biseptimavirus</i> ; non clasificado <i>Biseptimavirus</i>	NC_013195.1	Young e Summers (non publicado)

4.2.2.2.1 Péptidos de fagos determinados para *S. aureus*

Moitos dos péptidos determinados para as cepas de *S. aureus* pertencen a proteínas estruturais dos fagos como a proteína principal da cápside e da cola. Determináronse tamén 2 péptidos pertencentes ó regulador tipo Cro/CI de fagos, 3 péptidos de proteínas non caracterizadas de fagos, un péptido dun dominio de función descoñecida (DUF2479) que encontrase en fagos e bacterias; e un péptido do complemento inhibidor de fagos. O complemento inhibidor de *Staphylococcus* está involucrado na evasión da fagocitose das células humanas mediante o bloqueo das C3 convertasas (Wamel et al., 2006). Estudos publicados describen como o xene deste complemento inhibidor tamén encontrase en fagos de *Staphylococcus* (Wamel et al., 2006), tal e como detectouse neste estudo.

4.2.2.2.2 Estudo filoxenómico dos fagos de *S. aureus* determinados

Para levar a cabo o estudo filoxenómico, tomáronse as secuencias xenómicas da base de datos GenBank dos fagos de *S. aureus* que presentan 100% de similitude (Táboa 25) fronte ós péptidos determinados, e construíuse a árbore filoxenómica mediante o programa bioinformático VICTOR (*Virus Classification and Tree Building Online Resource*) (Meier-Kolthoff & Göker, 2017) (Figura 37).

Xenomias de bacteriofagos ben coñecidos das principais familias de *Caudovirales* coma o fago *Lambda* (*Siphoviridae*), o fago *T4* (*Myoviridae*) e o fago *T7* (*Podoviridae*), foron engadidos para a construción da árbore filoxenómica con fines comparativos.

A figura 37 representa a árbore filoxenómica dos fagos implicados na infección de *S. aureus* produtoras de mastite, ou dunha parte deles. A análise da árbore permitiunos establecer 3 *Clusters* ben definidos que dividen a árbore en 3 xéneros de fagos. As dúas ramas principais separan o *Cluster* A e B do *Cluster* C. Os *Clusters* A e B localízanse na mesma rama secundaria e, están formados por fagos de *Staphylococcus* dos xéneros *Triavirus* e *Biseptamivirus* a excepción dun fago non caracterizado, respectivamente. O *Cluster* C está composto de virus de *Staphylococcus* do xénero *Phieta-virus*. Finalmente o *Cluster* D está formado polos fagos de enterobacterias, o fago *Lambda*, *T7* e *T4*.

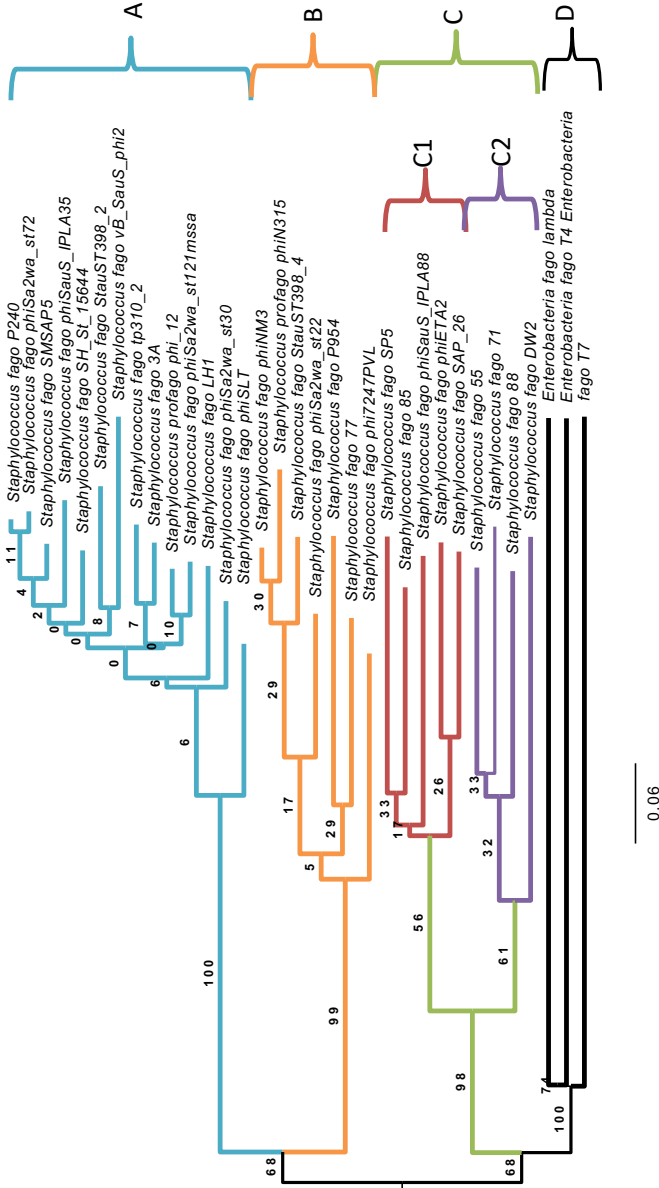


Figura 37. Arbore filoxenónica dos fagos determinados para as cepas de *S. aureus* con 100% homoloxía fronte ós péptidos identificados e os fagos *Lambda* (NC_001416.1), *T4* (NC_000866.4) e *T7* (NC_001604.1). A árbore filoxenética construíuse mediante o servizo web VICTOR o cal basease no cálculo das distancias interxenómicas coa ferramenta GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*). Para a construción das ramificacións calculouse o *pseudo-bootstrap* incluíndo 100 replicas. Os códigos de acceso ó GenBank dos xenomas dos fagos determinados amósanse na Táboa 25. Os diferentes *Clusters* representáanse por cores: azul claro, *Cluster A*; laranxa, *Cluster B*; verde claro, *Cluster C*; vermello, *Cluster C1*; morado, *Cluster C2*; negro, *Cluster D*.

Resultados e Discusión

Tras a análise da árbore filoxenómica, observouse como os mesmos péptidos encóntranse en distintos fagos moi próximos na árbore filoxenómica, como ocorre para os fagos de *Streptococcus* estudados previamente. Na Táboa 26 amósanse os potenciais péptidos biomarcadores encontrados en bacteriofagos do mesmo *Cluster* na árbore filoxenómica.

Táboa 26. Potenciais péptidos biomarcadores de *S. aureus* de orixe fájico e a relación de estes péptidos cos *Clusters* xerados na árbore filoxenómica.

Proteína	Péptido	Fagos	Cluster
Proteína principal da cápside	VSYTLDDDDFITDVE-TAK	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st72</i>	Cluster A
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>tp310-2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st121mssa</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>LH1</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st30</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i>	

Táboa 26. (Continuación)

Proteína	Péptido	Fagos	Cluster
Proteína principal da cápside	LLHALPTGNDSSGDK-LLPK	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st72</i>	Cluster A
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st121mssa</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>LH1</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st30</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>tp310-2</i>	
Proteína principal da cola	LYVGVFNPEATK	<i>Staphylococcus</i> fago <i>SH-St 15644</i>	Cluster A
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phi12</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>3a</i>	
		<i>Staphylococcus</i> virus <i>phiSLT</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>P240.</i>	
Represor tipo Cro/CI	ELAEAIGVSQPTVS-NWIIQGTK	<i>Staphylococcus</i> virus <i>IPLA35</i>	Cluster A
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>SMSAP5</i>	
		<i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	
Represor tipo Cro/CI	IQQLADYFNVPK	<i>Staphylococcus</i> virus <i>IPLA35</i> , <i>Staphylococcus</i> fago <i>SMSAP5</i> , <i>Staphylococcus</i> fago <i>vB_SauS_phi2</i>	Cluster A

Resultados e Discusión

Táboa 26. (Continuación)

Proteína	Péptido	Fagos	Cluster
Proteína principal da cola	AYINITLGLFAK	<i>Staphylococcus</i> fago <i>phiNM3</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>StauST398-4</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiN315</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phi7247PVL</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiSa2wa_st22</i> <i>Staphylococcus</i> virus 77 <i>Staphylococcus</i> fago <i>P954</i>	Cluster B
Proteína principal da cápside	IYDRNSDTLDGLP-VVNLK	<i>Staphylococcus</i> virus 85 <i>Staphylococcus</i> fago <i>SP5</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>phiETA2</i> <i>Staphylococcus</i> fago <i>phiNM</i> <i>Staphylococcus</i> virus <i>SAP26</i>	Cluster C.1
Proteína de fago non caracterizada	AVAELLKEINR	<i>Staphylococcus</i> virus 71 <i>Staphylococcus</i> virus 55 <i>Staphylococcus</i> virus 88	Cluster C.2

Coma no caso de *Streptococcus*, tamén, estudouse a relación entre os fagos determinados e as bacterias que presentan os mesmos péptidos fronte a base de datos do NCBI. Observouse como certas especies de *Staphylococcus* relaciónanse con determinadas ramas dos *Clusters*. Aínda que tódolos fagos comparten secuencias peptídicas con *S. aureus*, a maioría tamén comparte péptidos con outras especies de

Staphylococcus fronte a base de datos de proteínas do NCBI. Por exemplo, *Staphylococcus argenteus* comparte secuencias peptídicas con fagos de tódolos *Clusters*. Sen embargo, *Staphylococcus simiae* só comparte secuencias peptídicas con fagos do *Cluster C* e as demais especies (*S. xylosum*, *Staphylococcus muscae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. sciuri*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus vevriesei*, *Staphylococcus warneri*, *S. capitis* e *S. pneumoniae*) presentan os mesmos péptidos que fagos do *Cluster A*. Ademais, cabe destacar que as cepas analizadas de *S. aureus* produtoras da enterotoxina A (S8 e S12), comparten péptidos especificamente con fagos do *Cluster B* (*Biseptamivirus*). Existen publicacións que establecen que o xene da enterotoxina A está codificado no xenoma de bacteriofagos de *S. aureus* (Chen et al., 2018).

Do mesmo xeito que no caso de *Streptococcus*, estes resultados xunto coa árbore filoxenómica (Figura 37), amosan que a relación filoxenómica entre fagos vai asociado coas bacterias que infectan e/ou viceversa.

4.2.2.2.3 Estudo filoxenético do xene *holin* dos fagos de *S. aureus* determinados

Co obxectivo de comparar a árbore filoxenómica cunha árbore filoxenética, seleccionouse o xene *holin* para a construción de dita árbore de igual modo que para o estudo dos fagos de *Streptococcus*. Para a comparación do xene *holin* xerouse a árbore filoxenética coas secuencias dos fagos determinados da base de datos GenBank con 100% de homoloxía fronte os péptidos identificados e, do fago *T7* (NC 001604.1) e o fago *Lambda* (NC 001416.1) con fines comparativos. As secuencias

Resultados e Discusión

tomáronse da proteína holina, anotadas no xenoma dos fagos e os códigos de acceso encóntranse na Táboa 25. Neste caso 20 fagos dos 30 fagos determinados presentan a proteína holina anotada no seu xenoma. Construíuse a árbore mediante o programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016) baseándose nos modelos de análises *Maximum-Likelihood* (ML) (Figura 38).

Na árbore filoxenética pode apreciarse como estas especies non forman os mesmos *Clusters* que os da arbore filoxenómica (Figura 37). Neste caso non permite organizar por *Clusters* segundo o xénero o que pertencen os fagos e tampouco segundo as especies coas que comparten péptidos.

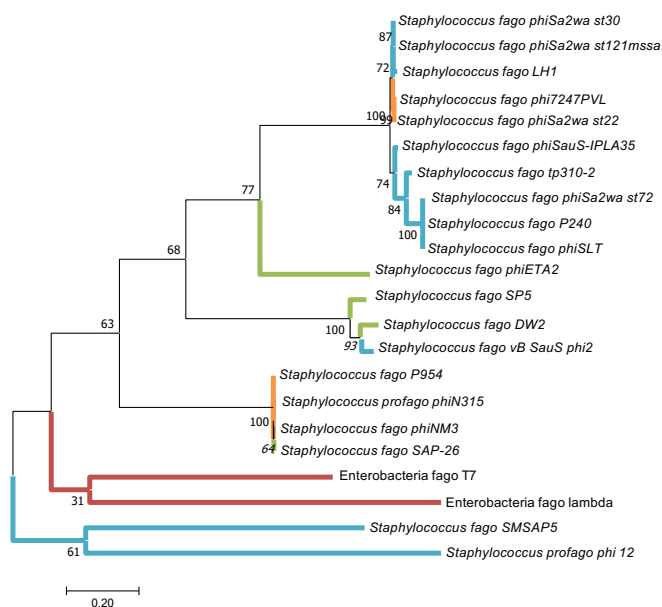


Figura 38. Arbore filoxenética das secuencias do xene *holin* dos bacteriofagos determinados de *S. aureus*, baseada no modelo *Maximum-Likelihood* (ML) (Rogers & Swofford, 1998) co parámetro de kimura-2 (Kimura, 1980). A significancia de cada rama indicase polo valor do *bootstrap* que foi calculado en porcentaxe de 1000 subconxuntos. Bar, 20 nt substitucións por 100 nt. Os fagos dos diferentes *Clusters* definidos para a arbore filoxenómica (figura 37) representáanse polas cores das súas ramas: azul claro, *Cluster A*; laranxa, *Cluster B*; verde claro, *Cluster C*; vermello, *Cluster D*.

No repositorio proteómico das cepas de *S. aureus* produtoras de mastite analizadas neste estudo, determináronse 12 péptidos de orixe fáxico específicos de *Staphylococcus* dos cales 5 son específicos de *S. aureus*. Estes péptidos pertencen a proteínas como as proteínas estruturais maioritarias da cápside e da cola, o represor Cro/CI e o complemento inhibidor. Os péptidos de fagos específicos de *Staphylococcus* poden ser útiles como biomarcadores para a detección de bacterias patóxeñas e/ou dos seus fagos indistintamente nunha mostra. Este é o caso dos péptidos IRLPYYDVK, LYVGVFNPEATK, IYNEIDEALKSK, SIINGKLDSQWTVNEHK, e MNDSNQGLQANPQYTIHYLSQEITR, os cales son moi específicos de *S. aureus*. Por outro lado, o estudo e análise da arbore filoxenómica (Figura 37) e dos péptidos determinados, amosa que a relación filoxenómica entre fagos vai asociado coas bacterias que infectan e/ ou viceversa.

4.2.3 Perspectivas de futuro dos péptidos biomarcadores determinados de *Streptococcus* spp. e *S. aureus* produtoras de mastite

Tanto as proteínas de orixe fáxico como os factores de virulencia son proteínas involucradas en funcións moi específicas. Moitas veces estes factores de virulencia teñen o seu orixe en fagos, e se as comparamos con proteínas implicadas no metabolismo basal da célula bacteriana, en xeral, presentan homoloxías máis restrinxidas a especies e cepas específicas (Calo-Mata et al., 2016).

No repositorio proteómico das especies de *Streptococcus* produtoras de mastite analizadas neste estudo, determináronse 58 péptidos de factores de virulencia (Táboa 20) e 65 péptidos de orixe fáxico (Táboa 21), todos eles específicos de *Streptococcus*. Por outro lado, tras a análise das cepas de *S. aureus* determináronse 12 péptidos específicos de *Staphylococcus* de orixe fáxico, 5 de eles específicos de *S. aureus* (Táboa 24). Os péptidos dos factores de virulencia para *S. aureus* estudáronse previamente por Carrera et al. (2017).

A especificidade dos fagos no recoñecemento de determinadas bacterias e a especificidade nas funcións dos factores de virulencia, fan que péptidos de estas proteínas sexan potenciais biomarcadores para a detección e caracterización de cepas e especies. Neste estudo seleccionamos 6 péptidos de orixe fájico como potenciais biomarcadores específicos de especies produtoras de mastite. O péptido MATNLTGQAYVQIMPSTK é moi específico para a especie *S. agalactiae* e os péptidos IRLPYYDVK, LYVGVFNPEATK, IYNEIDEALKSK, SIINGKLDSQWTPNEHK, e MNDSNQLQANPQYTIHYLSQEITR son moi específicos para *S. aureus*. Seleccionouse tamén o péptido DLWCNMIIAAK pertencente a un transportador de lantibiotico implicado na virulencia das bacterias e moi específico para *S. dysgalactiae*, como potencial biomarcador.

A identificación de péptidos de factores de virulencia permítenos detectar bacterias patóxenas en alimentos capaces de producir enfermidades trala súa inxesta e poden ser de gran utilidade no desenrolo de novos tratamentos terapéuticos fronte a mastite (Carrera et al., 2017).

Moitas das proteínas de fagos (RecT, o represor Cro/CI, PblB e PblA, HicB, DnaD, o complemento inhibitor e os PrCIs) asinadas ós péptidos determinados neste estudo, foron previamente analizadas noutros estudos como secuencias ensartadas no xenoma de bacterias por HGT (Wamel et al., 2006; Iyer et al., 2002; Menouni et al., 2015; Bensing et al., 2001; Mitchell et al., 2007; Durante-Rodríguez et al., 2016; Jørgensen et al., 2009; Carneiro et al., 2006; Huang et al., 2016; Richard et al., 2012). A identificación dos péptidos determinados de orixe fájico permite detectar patóxenos moi específicos con secuencias fájicas estables no seu xenoma e, no mesmo caso a detección dos seus fagos.

Por outro lado, a análise das árbores filoxenómicas amosan como os péptidos biomarcadores encóntranse en diferentes bacteriofagos próximos filoxeneticamente (Figura 35 e Figura 37). Tamén observouse como os bacteriofagos que presentan os mesmos péptidos que especies específicas de *Streptococcus* e, tamén no caso de *Staphylococcus*, localízanse próximos na árbore filoxenómica. Estes resultados suxiren que existe unha relación entre a filoxenia dos fagos e os fagos que poden infectar unha mesma especie bacteriana.

Construíuse unha árbore filoxenómica con tódolos fagos estudados para *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Figura 39), que corrobora a afirmación sobre a relación entre os fagos filoxenomicamente próximos e as bacterias que infectan. A árbore foi xerada a partir das secuencias xenómicas da base de datos GenBank dos fagos de *Streptococcus* e *Staphylococcus* que presentan 100% de similitude (Táboas 22 e 25) fronte os péptidos determinados e, dos xenomas do fago *Lambda* (*Siphoviridae*), o fago *T4* (*Myoviridae*) e o fago *T7* (*Podoviridae*). A árbore filoxenómica construíuse mediante o programa bioinformático VICTOR (*Virus Classification and Tree Building Online Resource*) (Meier-Kolthoff & Göker, 2017). Dita árbore separa claramente os bacteriofagos de *Streptococcus* e enterobacterias, dos fagos de *Staphylococcus* polas ramas principais. Na primeira rama os fagos de enterobacterias encóntanse distanciados dós de *Streptococcus*.

Coñécese que as interaccións entre fagos e bacterias poden ser mutuamente beneficiosas, e manteñen a diversidade xenética e fenotípica de ambos mediante HGT (Koskella & Brockhurst, 2014). Tamén é ben coñecido que as bacterias presentan profagos e/ou elementos fáxicos no seu xenoma, sen embargo, poucas interaccións foron estudadas ata o momento. Isto indica que gran parte da bioloxía dos bacteriófagos aínda non foi descuberta.

Por outro lado, os ordes e familias de bacteriofagos son asinados segundo a súa morfoloxía, a composición de DNA ou RNA, a orientación do xenoma (sentido +ou) a segmentación, o estudo dun *set* de xenes e as estratexias de replicación (Simmonds, 2015). Sen embargo, o contido xenómico dos fagos aínda no está moi estudado, e por ese motivo refírese ós fagos, empregando un símil de física, como a “materia escura” da biosfera (Argov et al., 2017). Deste xeito, existe a necesidade da xeración dunha base de datos con información das secuencias xenómicas dos bacteriofagos que infectan as principais bacterias patóxenas (Brüssow & Desiere, 2001).

Resultados e Discusión

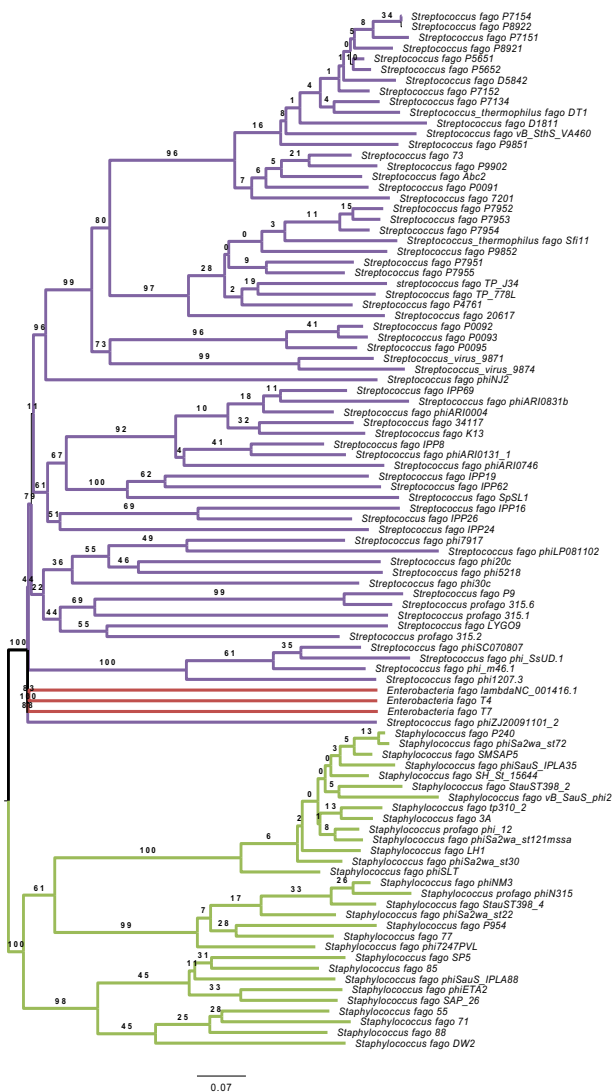


Figura 39. Árbore filoxenómica dos fagos determinados para as cepas de *S.aureus* e *Streptococcus* spp. con 100% homoloxía fronte os péptidos identificados e os fagos Lambda (NC_001416.1), T4 (NC_000866.4) e T7 (NC_001604.1). A árbore filoxenética construíuse mediante o servizo web VICTOR o cal basease no cálculo das distancias interxenómicas coa ferramenta GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*). Para a construción das ramificacións calculouse o pseudo-bootstrap incluíndo 100 replicas. Os códigos de acceso ó GenBank dos xenomas dos fagos determinados amósanse nas Táboas 22 e 25. Cores: morado, fagos de *Streptococcus*; vermello, fagos de enterobacterias; verde, fagos de *Staphylococcus*.







CONCLUSIONS/CONCLUSIÓNS



5. CONCLUSIONS

- From the condensed milk sample, we have isolated one yeast strain (BC03) and 3 bacterial strains (BC05, BC08 and BC09).
- BC03 yeast strain was identified as *Zygosaccharomyces rouxii* by the ITS and *HIS3* genes sequencing with 100% homology for both genes.
- BC05 bacterial strain was identified as *Paenibacillus polymyxa* by 16S rRNA sequencing with 99.9 % homology, and by the *gyrB* amplification, resulting in a GNAT family proteins sequencing with a 100% homology.
- BC08 bacterial strain was identified as a very close phylogenetically relative to *Bacillus paralicheniformis* by 16S rRNA, *gyrB* and *tuf* sequencing, with 100%, 96.6% and 100% homology, respectively.
- The obtained results showed that strain BC09^T is on the limit to be considered as a new species of the genus *Bacillus*. Taking in to account the high phylogenetic closeness to the species *B. safensis* it is considered a new subspecies of this species, for which the name *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov. was proposed.
- The new subspecies *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. for which the type strain is FO-36b^T, was created.
- The analysis of *Bacillus* strains by MALDI-TOF MS determined that peak 6096 Da is characteristic of *B. altitudinis* and BC09^T strain.
- MALDI-TOF MS analysis determined that the major difference between BC09^T and *B. safensis* FO-36b^T, compared to their close relatives *Bacillus* species, is the absence of peak 2679 Da.

Conclusions

- From proteomic repository of *Streptococcus* analysed mastitis producer strains, 92 peptides from virulence factors were identified. Among these peptides, 58 peptides were determined as *Streptococcus* specific peptides. Peptide DLWCNMIIAAK determined by LC-ESI MS/MS belongs to a lantibiotic transporter and is specific of *S. dysgalactiae* being a useful diagnostic peptide biomarker.
- From proteomic repository of *Streptococcus* analysed mastitis producer strains, 69 peptides from phage proteins were identified. Among these peptides, 65 peptides were determined as *Streptococcus* and their phages specific peptides. Peptide MATN-LGQAYVQIMPSAK determined by LC-ESI MS/MS belongs to PblA phage protein and is specific of *S. agalactiae*, being a useful diagnostic peptide biomarker.
- From proteomic repository of *S. aureus* analysed mastitis producer strains, 12 peptides from phage proteins were identified. Among these peptides, 5 peptides were determined as *S. aureus* and their phages specific peptides. IRLPYYDVK, LYVGVFNPEATK, MNDSNQGLQANPQYTIHYLSQEITR, IYNEIDEALKSK and SIINGKLDSQWTVPNEHK peptides are specific of *S. aureus*, being useful diagnostic peptide biomarkers.
- Results show that specific peptides are present in close related phages. Moreover, phages which present same peptides as specific species of bacteria, are located very close in the phylogenomic tree. This suggests that a link exists between phage phylogeny and bacterial species which infect.

5. CONCLUSIÓNS

- Dende un sobre de leite condensado contaminado, illáronse 3 cepas bacterianas (BC05, BC08 e BC09) e unha cepa de levaduras (BC03).
- A cepa de levaduras BC03 foi identificada como *Zygosaccharomyces rouxii* mediante a secuenciación dos xenes ITS e *HIS3* cunhas homoloxías de 100% para ambos xenes.
- A cepa bacteriana BC05 foi identificada como *Paenibacillus polymyxa*. Dita identificación levouse a cabo mediante a secuenciación do 16S rRNA obtendo un 99.9 % de homoloxía, e mediante a secuenciación do xene *gyrB* onde dita secuenciación resultou na amplificación dunha secuencia da proteína da familia GNAT cun 100% de homoloxía fronte á cepa illada.
- A cepa bacteriana BC08 foi identificada como unha cepa moi próxima filoxeneticamente a *Bacillus paralicheniformis* mediante a secuenciación dos xenes 16S rRNA, *gyrB* e *tuf* cun 100%, 96.6% e 100% de homoloxía, respectivamente.
- Os resultados obtidos amosan que a cepa BC09^T encontrase no límite para ser considerada unha nova especie do xénero *Bacillus*. Tendo en conta a proximidade filoxenética coa especie *B. safensis*, foi considerada unha nova subespecie de dita especie co nome *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov.
- A nova subespecie *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. para a cepa tipo FO-36b^T foi creada.

Conclusions

- A análise mediante MALDI-TOF MS das cepas de *Bacillus*, determinou que o pico de 6096 Da é característico da especie *B. altitudinis* e da cepa BC09^T.
- A análise mediante MALDI-TOF MS determinou que a principal diferenca entre as cepas BC09^T e *B. safensis* FO-36b^T, comparado coas especies máis próximas de *Bacillus* é a ausencia do pico de 2679 Da nestas dous cepas.
- No repositorio proteómico das cepas analizadas produtoras de mastite de *Streptococcus*, identificáronse 92 péptidos de factores de virulencia. Entre estes péptidos, 58 determináronse como péptidos específicos de *Streptococcus*. O péptido DLWCNMIIAAK determinado por LC-ESI MS/MS pertence a un transportador de lantibióticos e é específico da especie *S. dysgalactiae*, sendo un péptido diagnóstico útil como biomarcador.
- No repositorio proteómico das cepas analizadas produtoras de mastite de *Streptococcus*, identificáronse 69 péptidos de proteínas de bacteriófagos. Entre estes péptidos, 65 determináronse como péptidos específicos de *Streptococcus* e dos seus fagos. O péptido MATNLGQAYVQIMPSAK determinado por LC-ESI MS/MS pertence á proteína de fagos PblA e é específico da especie *S. agalactiae*, sendo un péptido diagnóstico útil como biomarcador.
- No repositorio proteómico das cepas analizadas produtoras de mastite de *S. aureus*, identificáronse 12 péptidos de proteínas de bacteriófagos. Entre estes péptidos, 5 determináronse como péptidos específicos de *S. aureus* e dos seus fagos. Os péptidos IRLPYYDVK, LYVGVFNPEATK, MNDSNQGLQANPQYTIHYLSQEITR, IYNEIDEALKSK e SIINGKLDSQWTVPNEHK son específicos de *S. aureus*, sendo péptidos diagnóstico útiles como biomarcadores.

- Os resultados obtidos amosan como péptidos específicos están presentes en bacteriofagos próximos filoxeneticamente. Ademais, os fagos que presentan os mesmos péptidos que determinadas especies de bacterias, encóntranse localizados moi próximos na árbore filoxenómica. Isto suxire que existe unha ligazón entre a filoxenia dos fagos e as especies bacterianas que infectan.







REFERENCES



6. REFERENCES

- Abril, A. G., Rama, J. L. R., Feijoo-Siota, L., Calo-Mata, P., Salazar, S., Peix, A., Velázquez, E. & Villa, T. G. (2019).** *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1), 189-195.
- Abril, A. G., Ortea, I., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Villa, T. G. & Calo-Mata, P. (2018).** Characterization biomarker peptides for the Identification of *Bacillus* species by LC-ESI-MS/MS. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.) *Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology* (pp. 74-77). Universal Publishers Inc.
- Achigar, R., Magadán, A. H., Tremblay, D. M., Pianzola, M. J., & Moineau, S. (2017).** Phage-host interactions in *Streptococcus thermophilus*: Genome analysis of phages isolated in Uruguay and ectopic spacer acquisition in CRISPR array. *Scientific reports*, 7, 43438.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003).** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207.
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., & Shaw, J. F. (2004).** GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 534–552.
- Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., Back, A., Horst, N., & Heller, K. J. (2014).** Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. *Frontiers in Microbiology*, 5, 98.
- 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.

References

- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., & Prieto, M. (2015).** The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 99–109.
- André, S., Vallaey, T., & Planchon, S. (2017).** Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, 168(4), 379–387.
- Argov, T., Azulay, G., Pasechnek, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I., Sijal, N., & Herskovits, A. A. (2017).** Temperate bacteriophages as regulators of host behaviour. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 81–87.
- Arioli, S., Eraclio, G., Della Scala, G., Neri, E., Colombo, S., Scaloni, A., Fornita N. G., & Mora, D. (2018).** Role of temperate bacteriophage ϕ 20617 on *Streptococcus thermophilus* DSM 20617^T autolysis and biology. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2719.
- Auch A. F., von Jan, M., Klenk, H. P., & Göker, M. (2010).** Digital DNA–DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 117
- Bae, T., Baba, T., Hiramatsu, K., & Schneewind, O. (2006).** Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1035-1047.
- Bai, Q., Yang, Y., & Lu, C. (2016).** Isolation and characterization of siphovirus phages infecting bovine *Streptococcus agalactiae*. *Wei sheng wuxue bao = Acta Microbiologica Sinica*, 56(2), 317-326.
- Bai, Q., Zhang, W., Yang, Y., & Lu, C. (2013).** Characterization and genome sequencing of a novel bacteriophage infecting *Streptococcus agalactiae* with high similarity to a phage from *Streptococcus pyogenes*. *Archives of Virology*, 158(8), 1733-1741.

- 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.
- Bateman, A., Coghill, P., & Finn, R. D. (2010).** DUFs: Families in search of function. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *66*(10), 1148–1152.
- Benachour, A., Ladjouzi, R., Thorpe, S., Courtin, P., Prajsnar, T. K., & Foster, S. J. (2012).** The lysozyme-induced peptidoglycan n -acetylglucosamine deacetylase PgdA (EF1843) is required for *Enterococcus faecalis* virulence. *Journal of Bacteriology*, *194*(22), 6066–6073.
- Bensing, B. A., Siboo, I. R., & Sullam, P. M. (2001).** Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infection and Immunity*, *69*(10), 6186–6192.
- Beres, S. B., Sylva, G. L., Barbian, K. D., Lei, B., Hoff, J. S., Mammarella, N. D., Liu, M., Smoot, J. C., Porcella, S. F., Parkins, L. D., Campbell, D. S., Smith, T. M., McCormick, J. K., Leung, D. Y. M., Schlievert, P. M., & Musser, J. M. (2002).** Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(15), 10078-10083.
- Binetti, A. G., Del Río, B., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2005).** Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Applied and environmental microbiology*, *71*(10), 6096-6103.

References

- Bishop, C. M. (1999).** Bayesian pca. *Advances in neural information processing systems*, 382-388.
- Boelke, J. K., Gerhard, M., Schleif, F. M., Decker, J., Kuhn, M., Elssner, T., Pusch, W., & Kostrzewa, M. (2005)** ClinProTools 2.0 User Documentation. Available in the ClinProt-ClinProTools, 2.
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2012a).** SpectraBank: An open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 33(14), 2138-2142.
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2011).** Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 32, 2951–2965.
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Pazos, M., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2013).** Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 34, 877–887.
- Böhme, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Fernández No, I.C., Barros-Velázquez, J., Castiglioni, B., Brasca, M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2012b).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 33, 2355–2364.
- Brandy, A. W. H., & Brandy, C. A. (1989).** A note on the isolation and propagation of lytic phages from *Streptococcus uberis* and their potential for strain typing. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(4), 425–431.

- Branquinho, R., Sousa, C., Lopes, J., Pintado, M. E., Peixe, L. V., & Osório, H. (2014).** Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* Using MALDI-TOF-MS. *PLoS ONE*, 9(10) e110127.
- Broxton, C. N., & Culotta, V. C. (2016).** SOD enzymes and microbial pathogens : surviving the oxidative storm of infection. *PLoS pathogens*, 12(1), 8–13.
- Brueggemann, A. B., Harrold, C. L., Rezaei Javan, R., van Tonder, A. J., McDonnell, A. J., & Edwards, B. A. (2017).** Pneumococcal prophages are diverse, but not without structure or history. *Scientific Reports*, 7, 42976.
- Brussow, H. (2001).** Phages of dairy bacteria, *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 283-303.
- Brüssow, H., & Desiere, F. (2001).** Comparative phage genomics and the evolution of siphoviridae: Insights from dairy phages. *Molecular Microbiology*, 39(2), 213–222.
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W., & Bru, H. (2004).** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602.
- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I. C., Bohme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2015).** Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiology*, 46, 288–298.
- Calo-Mata, P., Carrera, M., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., & Canas, B. (2016).** Novel Peptide biomarker discovery for detection and identification of bacterial Pathogens by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 7(1),1-9.

References

- Canchaya, C., Fournous, G., & Brüssow, H. (2004).** The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular Microbiology*, 53(1), 9–18.
- Cantera, J. J. L., & Stein, L. Y. (2007).** Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria. *Environmental microbiology*, 9(3), 765-776.
- Carneiro, M. J. V. M., Zhang, W., Ioannou, C., Scott, D. J., Allen, S., Roberts, C. J., & Soutanas, P. (2006).** The DNA-remodelling activity of DnaD is the sum of oligomerization and DNA-binding activities on separate domains. *Molecular Microbiology*, 60(4), 917–924.
- Carrera, M., Böhme, K., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2017).** Characterization of foodborne strains of *Staphylococcus aureus* by shotgun proteomics: Functional networks, virulence factors and species-specific peptide biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–15.
- Carrera, M., Cañas, B., & Gallardo, J. M. (2013).** The sarcoplasmic fish proteome: Pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *Journal of Proteomics*, 78, 211–220.
- Chanishvili, N. (2015).** Bacteriophage-based products and techniques for identification of biological pathogens, In: Camesano T. A. (Ed.) *Nanotechnology to Aid Chemical and Biological Defense*, (pp. 17-33). Springer, Dordrecht..
- Chen, D., Song, Q., Xu, Z., & Zhang, D. (2018).** Characterization of enterotoxin A-producing *Staphylococcus aureus*. *Infection and drug resistance*, 11, 531.
- Cheng, K., Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., & Wang, G. (2016).** Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing, *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 10(4), 346-357..

- Chun J., & Goodfellow M. A. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 240-245.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018).** Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466
- Claus, D., & Berkeley, R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: Sneath, P. H. A., Mair N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 (pp. 1105–1139). Williams & Wilkins: Baltimore
- Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin, M., Carapetis, J., Robins-browne, R., & Curtis, N. (2008).** Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. *Journal of Medical Microbiolog*, 57(10), 1238–1246.
- Coorevits, A., Logan, N. A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Scheldeman, P., Heyndrickx, M., Schumann, P., Landschoot, A. V., & De Vos, P. (2011).** *Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1954-1961.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2009).** Identification of a novel two-peptide lantibiotic ,lichenicidin , following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5451–5460.
- Cox, C. R., Rees, J. C., & Voorhees, K. J. (2012).** Modelling bacteriophage amplification as a predictive tool for optimized MALDI-TOF MS-based bacterial detection. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(11), 1435-1441.

References

- Craigie, J., & Yen, C. H. (1938).** The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of Type II Vi phage. *Canadian Public Health Journal*, 29(10), 484-496.
- Croucher, N. J., Hanage, W. P., Harris, S. R., McGee, L., van der Linden, M., de Lencastre, H., Sá-Leão R., Song J.H., Ko K.S., Beall B. & Klugman, K. P. (2014).** Variable recombination dynamics during the emergence, transmission and ‘disarming’ of a multidrug-resistant pneumococcal clone. *BMC Biology*, 12(1), 49.
- Croucher, N. J., Harris, S. R., Fraser, C., Quail, M. A., Burton, J., van der Linden, M., McGee L., von Gottberg A., Song J. H., Ko K. S., Pichon B., Baker S., Parry C. M., Lambertsen L. M., Shahinas D., Pillai D.R., Mitchell T. J., Dougan G., Tomasz A., Klugman K. P., Parkhill J., Hanage W. P., Bentley S. D. (2011).** Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science*, 331(6016), 430-434.
- Croucher, N. J., Mostowy, R., Wymant, C., Turner, P., Bentley, S. D., & Fraser, C. (2016).** Horizontal DNA transfer mechanisms of bacteria as weapons of intragenomic conflict. *PLoS Biology*, 14(3), e1002394.
- Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G., Fotia, G. (2014).** Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics*, 30, 1928-1929.
- da Silva Duarte, V., Giaretta, S., Treu, L., Campanaro, S., Vidigal, P. M. P., Tarrach, A., Giacomini A., Corich, V. (2018).** Draft genome sequences of three virulent *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from the dairy environment in the Veneto region of Italy. *Genome Resource Announcements.*, 6(10), e00045-18.

- Davies, M. R., Mcmillan, D. J., Domselaar, G. H. Van, Jones, M. K., & Sriprakash, K. S. (2007).** Phage 3396 from a *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Pathovar May Have Its Origins in *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology*, 189(7), 2646–2652.
- Deghorain, M., & Van Melder, L. (2012).** The staphylococci phages family: An overview. *Viruses*, 4(12), 3316–3335.
- Doern, C. D., & Butler-wu, S. M. (2016).** Emerging and future applications of in the clinical microbiology laboratory a report of the association for molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 789–802.
- Doetsch, R. N. (1981).** Determinative Methods of Light Microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips, G.B. (Ed.). *Manual of Methods for General Bacteriology* (pp. 21-33) Washington: American Society for Microbiology.
- Dokland, T., & Murialdo, H. (1993).** Structural transitions during maturation of *Lambda* Capsid. *Journal of Molecular Biology*, 233, 682-694.
- Doll, E. V., Scherer, S., Wenning, M. (2017).** Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in Microbiology*, 8, 135.
- Domelier, A. S., Van Der Mee-Marquet, N., Sizaret, P. Y., Héry-Arnaud, G., Lartigue, M. F., Mereghetti, L., & Quentin, R. (2009).** Molecular characterization and lytic activities of *Streptococcus agalactiae* bacteriophages and determination of lysogenic-strain features. *Journal of bacteriology*, 191(15), 4776-4785.

References

- Dumke, J., Hinse, D., Vollmer, T., Schulz, J., & Knabbe, C. (2015).** Potential Transmission Pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *PLoS One*, 10(5) e0126507.
- Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., & Kim, S. J. (2015).** *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), 3487-3492.
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., Schisler, D. A., Rooney, A. P. (2016).** Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojavenensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(6), 2438-2443..
- Dunlap, C., Schisler, D., Perry, E., Connor, N., Cohan, F., & Rooney, A. (2017).** *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2720-2725.
- Durante-Rodríguez, G., Mancheño, J. M., Díaz, E., & Carmona, M. (2016).** Refactoring the λ phage lytic/lysogenic decision with a synthetic regulator. *Microbiology Open*, 5(4), 575–581.
- Eckhard, U., Bandukwala, H., Mans, M. J., Marino, G., Holyoak, T., Charles, T. C., & Doxey, A. C. (2017).** Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella. *Nature Communications*, 8(1), 521.
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., & Gohar, M. (2015).** Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 6,1–12.

- El Haddad, L., & Moineau, S. (2013).** Characterization of a novel Panton-Valentine leukocidin-encoding staphylococcal phage and its natural PVL-lacking variant. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2828-2832.
- Escott, C., del Fresno, J., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. (2018).** *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. *Fermentation*, 4(3), 69.
- Ezaki, T., Hashimoto Y., & Yabuchi E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 224-229.
- Fagerquist, C. K. (2017).** Unlocking the proteomic information encoded in MALDI-TOF-MS data used for microbial identification and characterization. *Expert Review of Proteomics*, 14(1), 97-107.
- Farooq, U., Yang, Q., Wajid, M., & Wang, S. (2018).** Biosensors and bioelectronics bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. *Biosensors and Bioelectronic*, 118
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015).** A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641-650.
- Fortier, L. C., & Sekulovic, O. (2013).** Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354-365.
- Galán-Bartual, S., Pérez, I., Hermoso, J. A., & Garcia, P. (2015).** Structure and Function of Choline-Binding Proteins, In: Brown, J., Hammerschmidt, S., & Orihuela, C. (Ed.). *Streptococcus pneumoniae, Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions* (p.p 207-230). Academic Press.

References

- García, P., Martínez, B., Obeso, J. M., Lavigne, R., Lurz, R., & Rodríguez, A. (2009).** Functional genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7663-7673.
- Golińsk, E., Van der Linden, M., Więcek, G., Mikołajczyk, D., Machul, A., Samet, A., & Strus, M. (2016).** Virulence factors of *Streptococcus pyogenes* strains from women in peri-labor with invasive infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(5), 747-754.
- Goodacre, N. F., Gerloff, D. L., & Uetz, P. (2014).** Protein Domains of unknown function are essential in Bacteria. *MBio*, 5(1), e00744-13.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015).** The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1418.
- Grove, A. (2013).** Quick guide MarR family transcription factors. *Current Biology*, 23(4), R142–R143.
- Gual, A., Camacho, A. G., & Alonso, J. C. (2000).** Functional analysis of terminase large subunit, G2P, of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35311–35319.
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1997).** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. 26(1874), 1S–11S.
- Harhala, M., Barylski, J., Humi, K., Lecion, D., Wojciechowicz, J., Lahutta, K., Kuś M., Kropinski A.M., Nowak S., Nowicki G., Hodyra-Stefaniak K., Dąbrowska K. (2018).** Two novel temperate bacteriophages infecting *Streptococcus pyogenes*: Their genomes, morphology and stability. *Plos One*, 1–15.

- Harrison, E., Muir, A., Stratford, M., & Wheals, A., (2011).** Species-specific PCR primers for the rapid identification of yeasts of the genus *Zygosaccharomyces*. *FEMS Yeast Research*, 11(4), 356-365.
- Huang, J., Ma, J., Shang, K., Hu, X., Liang, Y., Li, D., Chen L., Wang, L. (2016).** Evolution and diversity of the antimicrobial resistance associated mobilome in *Streptococcus suis*: a probable mobile genetic elements reservoir for other streptococci. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 118.
- Huang, Y. H., Lien, Y., Huang, C. C., & Huang, C. Y. (2016).** Characterization of *Staphylococcus aureus* primosomal DnaD protein: Highly conserved C-terminal region is crucial for ssDNA and PriA helicase binding but not for DnaA protein-binding and self-tetramerization. *PLoS ONE*, 11(6), 1–18.
- Hynes, A. P., Rousseau, G. M., Agudelo, D., Goulet, A., Amigues, B., Loehr, J., Romero D.A., Fremaux C., Horvath P., Doyon Y., Cambillau C., Moineau S., & Cambillau, C. (2018).** Widespread anti-CRISPR proteins in virulent bacteriophages inhibit a range of Cas9 proteins. *Nature Communications*, 9(1), 2919.
- Hynes, W., & Sloan, M. (2016).** Secreted Extracellular Virulence Factors. In: Ferretti, J.J., Stevens, D.L., Fischetti, V.A. (Ed.). *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. (p.p 1–40) University of Oklahoma Health Sciences Center.
- Iandolo, J. J., Worrell, V., Groicher, K. H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Jib, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H., & Roe, B.A. (2002).** Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages ϕ 11, ϕ 12 and ϕ 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene*. 289(1), 109-118.

References

- Iannelli, F., Santagati, M., Santoro, F., Oggioni, M. R., Stefani, S., & Pozzi, G. (2014).** Nucleotide sequence of conjugative prophage Φ 1207. 3 (formerly Tn1207. 3) carrying the *mef* (A)/*msr* (D) genes for efflux resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 687.
- Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier B. M., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012).** Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1853-1864.
- Iyer, L., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002).** Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Red β , ERF and RAD52. *BMC Genomics*, 3(1) 1–11.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., BritKolstø, A., Ramó, D., Martínez, J. F., Codoñer, F. M., Rosselló-Móra, F. & Codoñer, F. M. (2013).** Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 383-391.
- Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M., & Gerdes, K. (2009).** HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1191–1199.
- Kajfasz, J. K., Martinez, A. R., Rivera-ramos, I., Abranches, J., Koo, H., & Quivey, R. G. (2009).** Role of Clp Proteins in Expression of Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2060–2068.

- Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S., & MacCoss, M. J. (2007).** Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature Methods*, 4(11), 923–925.
- Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O’Mahony, J., & Coffey, A. (2014).** Genome analysis of the staphylococcal temperate phage DW2 and functional studies on the endolysin and tail hydrolase. *Bacteriophage*, 4(1), e28451.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., & Chun, J. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014).** Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 916–931.
- Kraushaar, B., Hammerl, J. A., Kienöl, M., Heinig, M. L., Sperling, N., Thanh, M. D., Reetz, J., Jäckel, C., Fetsch, A., & Hertwig, S. (2017).** Acquisition of virulence factors in livestock-associated MRSA: lysogenic conversion of CC398 strains by virulence. *Scientific reports*, 7(1), 2004.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016).** MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief communication. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.

References

- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K. ... & Hiramatsu, K. (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264), 1225-1240.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., & Pelletier, J. (2005).** The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5174-5179.
- Kwon, H., Ogunniyi, A. D., Choi, M., Pyo, S., Rhee, D., & Paton, J. C. (2004).** The ClpP Protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge. *Infection and Immunity*, 72(10), 5646–5653.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., & Clark, W. A. (1992).** International code of nomenclature of bacteria: bacteriological code, 1990 revision. *ASM Press*.
- Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Stämmler, M., Siegbrecht, E., Grunow, R., & Naumann, D. (2009).** Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7229–7242.
- Lavigne, R., Ceysens, P., & Robben, J. (2009).** Phage proteomics: applications of mass spectrometry. In: Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (Ed.) *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects*, (pp. 239-251). Humana Press.

- Law, J. W., Mutalib, N. A., Chan, K., & Lee, L. (2014).** Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 1–19.
- Li, G., Zhang, Y., Inouye, M., & Ikura, M. (2008).** Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *Journal of Molecular Biology*, 107–119.
- Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., Arhin, F., Bauda, P., Bergeron, D., Callejo, M., Ferretti, V., Ha, N., Kwan, T., McCarty, J., Srikumar, R., Williams, D., Wu, J.J., Gros, P., Pelletier, J., & DuBow, M. (2004).** Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nature Biotechnology*, 22(2), 185.
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2016).** *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1193-1199.
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., de Vos P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M. S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009)** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2114-2121.
- Logan, N. A., & Bacillus, V. P. D. (2015).** *Bacillus* In: Wiley, J., & Sons. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteriavol.* Bergey's Manual Trust.
- Logan, N. A., & Berkeley, R. C. W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Microbiology*, 130(7), 1871-1882.

References

- López-pelegrín, M., Cerdà-costa, N., Martínez-jiménez, F., Cintas-pedrola, A., Canals, A., Peinado, J. R., & Gomis-rüth, F. X. (2013).** A novel family of soluble minimal scaffolds provides structural insight into the catalytic domains of integral membrane metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21279–21294.
- Lopez-Sanchez, M. J., Sauvage, E., Da Cunha, V., Clermont, D., Ratsima H. E., Gonzalez-Zorn, B., Poyart C., Rosinski-Chupin I., & Glaser, P. (2012).** The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Molecular Microbiology*, 85(6), 1057–1071.
- Lucchini, S., Desiere, F., & Brüßow, H. (1999).** Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *Journal of Virology*, 73(10), 8647-8656.
- Lundberg, Å., Nyman, A., Unnerstad, H. E., & Waller, K. P. (2014).** Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 80.
- Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S., Spinelli, S., Feyereisen, M., Cambillau, C., & Van Sinderen, D. (2016).** Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- Manco, S., Herson, F., Yesilkaya, H., Paton, J. C., Andrew, P. W., & Kadioglu, A. (2006).** Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infection and Immunity*, 74(7), 4014–4020.
- Mandel, M., & Mamur, J. (1968).** Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods in Enzymology*, 12,195-206.

- Martinez, B. A., Stratton, J., & Bianchini, A. (2017).** Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of dairy Science*, *100*(2), 919-932.
- Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, R., G., Malorni, A. & Siciliano, R. A (2006).** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. *72*(2), 1180-1189.
- McDonald, I. R., & Murrell, J. C. (1997).** The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiology letters*, *156*(2), 205-210.
- McDonnell, B., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Neve, H., Noben, J.-P., Lugli, G. A., & van Sinderen, D. (2017).** Global survey and genome exploration of Bacteriophages infecting the lactic acid Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1754.
- McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J. P., Kouwen, T., & van Sinderen, D. (2016).** Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(17), 5153-5165.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013).** Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, *14*, 60.
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2017).** VICTOR: Genome-based Phylogeny and Classification of Prokaryotic Viruses. *Bioinformatics*, *33*(21), 3396-3404.

References

- Menouni, R., Hutinet, G., Petit, M. A., & Ansaldi, M. (2015).** Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1), 1–10.
- Mikkonen, M., & Alatossava, T. (1994).** Characterization of the genome region encoding structural proteins of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H. *Gene*, 151(1–2), 53–59.
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016).** *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4744.
- Mitchell, J., Siboo, I. R., Takamatsu, D., Chambers, H. F., & Sullam, P. M. (2007).** Mechanism of cell surface expression of the *Streptococcus mitis* platelet binding proteins PblA and PblB. *Molecular Microbiology*, 64(3), 844–857.
- Morales, G. Y. E., Herrera, M. C. & Muñoz R. J. (2007).** Chloramphenicol, a classic antibiotic as an alternative for the present, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38, 58-69
- Murphy, J., Mahony, J., Ainsworth, S., Nauta, A., & van Sinderen, D. (2013).** Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: Insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7547–7555.
- Murray, R. G. E., & Schleifer, K. H. (1994).** Taxonomic Notes: A proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1), 174-176.

- Na, S. I., Kim, Y. O., Yoon, S. H., Ha, S. min, Baek, I., & Chun, J. (2018).** UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of Microbiology*, 56(4), 281–285.
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S., & Cohan, F. M. (1999).** Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 49:1211–1215.
- Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J. I., Piémont, Y., Jarraud, S., Etienne, J., & Kamio, Y. (2001).** Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, ϕ SLT. *Gene*, 268(1), 195-206.
- Neve, H., Zenz, K. I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K. J., & BruÈssow, H. (1998).** Comparison of the Lysogeny Modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages TP-J34 and Sfi21: Implications for the Modular Theory of Phage Evolution. *Virology*, 241(1), 61-72.
- Nieto, C., Cherny, I., Khoo, S. K., Garcı, M., Lacoba, D., & Chan, W. T. (2007).** The yefM-yoeB Toxin-Antitoxin Systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae* : Functional and Structural Correlation, *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1266–1278.
- Nomura, F. (2015).** Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(6), 528–537.

References

- Novick, R. P., Christie, G. E., & Penadés, J. R. (2012).** The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 541.
- Palmieri, C., Princivalli, M. S., Brenciani, A., Varaldo, P. E., & Facinelli, B. (2011).** Different genetic elements carrying the tet (W) gene in two human clinical isolates of *Streptococcus suis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 631-636.
- Park, M. A., Kwon, G., Hwang, Y., Jung, H., Kim, J., Park, J. Y., Kim, J.S., Na, Y.J., Kim, M. Y., Kim, D. S., Chae, S. H., & Seo, J. S. (2013).** Genome sequence of *Streptococcus parauberis* strain KCTC11980, isolated from diseased *Paralichthys olivaceus*. *Genome Announcements*, 1(5), 5–6.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. (2014).** Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043-1055.
- Pell, L. G., Cumby, N., Clark, T. E., Tuite, A., Battaile, K. P., Edwards, A. M., Chirgadze N. Y., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2013).** A conserved spiral structure for highly diverged phage tail assembly chaperones. *Journal of Molecular Biology*, 425(14), 2436–2449.
- Pfrunder, S., Grossmann, J., Hunziker, P., Brunisholz, R., Gekenidis, M. T., & Drissner, D. (2016).** *Bacillus cereus* group-type strain-specific diagnostic peptides. *Journal of proteome Research*, 15(9), 3098-3107.
- Price, C. T., Bukka, A., Cynamon, M., & Graham, J. E. (2008).** Glycine betaine uptake by the ProXVWZ ABC transporter contributes to the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to initiate growth in human macrophages. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3955-3961.

- Quigley, L., O'sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013).** The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
- Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I. C., Alnakip, M. E., Caamano, S., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2014).** MALDI-TOF Mass Spectrometry, rapid and reliable method for the identification of bacterial species in food microbiology laboratories. *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, 353-385.
- Rees, J. C., & Barr, J. R. (2017).** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using phage amplification combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(5), 1379-1386.
- Rees, J. C., & Voorhees, K. J. (2005).** Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(19), 2757-2761.
- Relman, D. A., & Falkow, S. (1992).** Identification of uncultured microorganisms: expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infectious agents and disease*, 1(5), 245-253.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., & Zagorec, M. (2015).** Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45-53.
- Rhuland, L. E., Work, E., Denman, R. F. & Hoare, D. S. (1955).** The behaviour of the isomers of diaminopimelic acid on paper chromatograms. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 4844-4846.

References

- Ribardo, D. A., Lambert, T. J., & Mciver, K. S. (2004).** Role of *Streptococcus pyogenes* two-component response regulators in the temporal control of Mga and the Mga-regulated virulence gene emm. *Infection and Immunity*, 72(6), 3668–3673.
- Richards, V. P., Palmer, S. R., Bitar, P. D. P., Qin, X., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Town, C. D., Burne, R. A., & Stanhope, M. J. (2014).** Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus*. *Genome Biology and Evolution*, 6(4), 741–753.
- Richter, Ł., Janczuk-richter, M., Niedzió, J., Paczesny, J., & Ho, R. (2018).** Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection. *Drug discovery today*, 23(2), 448-455.
- Richter, M., & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126–19131.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2015).** JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929-931.
- Rodrigues, P. A., & Ferrari, R. G. (2018).** Application of molecular tools to elucidate the microbiota of seafood. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1347-1365.
- Rodriguez-Rubio, L., Gutierrez, D., Martinez, B., Rodriguez, A., Gotz, F., & Garcia, P. (2012).** The tape measure protein of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiIPLA35 has an active muramidase domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6369–6371.
- Rogers, J. S., & Swofford, D. L. (1998).** A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Systematic Biology*, 47(1), 77-89.

- Rohde, A., Andre, J., Boone, I., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R., & Al, S. (2017).** Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. *Trends in Food Science & Technology*, *62*, 113–118.
- Romero, P., López, R., & García, E. (2004).** Genomic organization and molecular analysis of the inducible prophage EJ-1, a mosaic myovirus from an atypical pneumococcus. *Virology*, *322*(2), 239–252.
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009).** Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(10), 2429-2436.
- Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R. G., Manfreda, G., Revez, J., & Vandamme, P. (2009).** *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(9), 2364-2369.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** A neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*, 406-425.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975).** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *94*(3), 441-448.
- Santagati, M., Iannelli, F., Cascone, C., Campanile, F., Oggioni, M. R., Stefani, S., & Pozzi, G. (2003).** The novel conjugative transposon Tn 1207.3 carries the macrolide efflux gene *mef* (A) in *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Drug Resistance*, *9*(3), 243-247.

References

- Sasser, M. (1990)** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Satomi, M., La Duc, M. T., & Venkateswaran, K., (2006)** *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1735-1740.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robertd, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Chen, W. (2012)** Fungal barcoding consortium, nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *PNAS Early Edition* ,16, 6241-6
- Schofield, D., Sharp, N. J., & Westwater, C. (2012).** Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage*, 2(2), 105-121.
- Schumann, P. (2011).** Peptidoglycan Structure. In: Rainey, F., & Oren, A. (Ed.). *Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology*, (pp. 101-129). London: Academic Press.
- Seemann, T. (2014).** Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068-2069.
- Serafim, V., Ring, C., Pantoja, L., & Shah, H. (2017).** Rapid identification of *E. coli* bacteriophages using mass spectrometry. *Journal of Proteomics and Enzymology*, 6(1), 1-5.
- Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2017).** Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (English ed.)*, 35(5), 303-313.

- Silva, C. J. (2018).** Food Forensics: Using Mass Spectrometry to detect foodborne protein contaminants, as exemplified by shiga toxin variants and prion strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*, 8435–8450.
- Singh, A., Poshtiban, S., & Evoy, S. (2013).** Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors*, *13*(2), 1763-1786.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018).** Fungal spoilage in food processing. *Journal of Food Protection*, *81*(6), 1035-1040.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016).** *Bacillus* spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(6), 1139–1148.
- Stanley, E., Walsh, L., van der Zwet, A., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2000).** Identification of four loci isolated from two *Streptococcus thermophilus* phage genomes responsible for mediating bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Letters*, *182*(2), 271-277.
- Starostin, K. V., Demidov, E. A., Bryanskaya, A. V., Efimov, V. M., Rozanov, A. S., & Peltek, S. E. (2015).** Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific reports*, *5*, 16989.
- Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., Pflüger, V., Tonolla, M., Ravasi, D., Fredriksson-Ahomaa, M. & Hächler, H. (2011).** Rapid species specific identification and subtyping *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF Mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, *87*(2), 150-153.
- Suprenant, K. A., Bloom, N., Fang, J., & Lushington, G. (2007).** The major vault protein is related to the toxic anion resistance protein (TelA) family. *Journal of Experimental Biology*, *210*(6), 946-955.

References

- Tanaka, K. J., Song, S., Mason, K., & Pinkett, H. W. (2018).** Selective substrate uptake : The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. *BBA - Biomembranes*, 1860(4), 868–877.
- Tang, F., Bossers, A., Harders, F., Lu, C., & Smith, H. (2013).** Comparative genomic analysis of twelve *Streptococcus suis* (pro) phages. *Genomics*, 101(6), 336-344.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. (1997).** The clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Tindall, B. J. (1990).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters*, 66(1-3), 199-202.
- Tindall, B. J. (2017).** The consequences of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García et al. 2005, *Bacillus malacitensis* Ruiz-García et al. 2005 and *Brevibacterium halotolerans* Delaporte and Sasson 1967 (Approved Lists 1980) being treated as heterotypic synonyms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1279-1285.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
- Tiwari, R., Artiushin, S., & Timoney, J. F. (2006).** P9, a temperate bacteriophage of *Streptococcus equi*. *International Congress Series*, 1289, 165-168.
- Umesha, S., & Manukumar, H. M. (2018).** Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 84-104.

- Van Der Mee-Marquet, N., Corvaglia, A. R., Valentin, A. S., Hernandez, D., Bertrand, X., Girard, M., Kluytmans, J., Donnio, P., Quentin, R., & Francois, P. (2013).** Analysis of prophages harbored by the human-adapted subpopulation of *Staphylococcus aureus* CC398. *Infection, Genetics and Evolution*, *18*, 299-308.
- Vetting, M. W., de Carvalho, L. P. S., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S. (2005).** Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *433*(1), 212-226.
- Vollmer, W., & Tomasz, A. (2002).** Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *70*(12), 7176-7178.
- Walker, J. N., Crosby, H. A., Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Malone, C. L., Rosenthal, C. B., & Horswill, A. R. (2013).** The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. *PLoS Pathogens*, *9*(12), 1–17.
- Wamel, W. J., Rooijackers, S. H., Ruyken, M., van Kessel, K. P., & van Strijp, J. A. (2006).** The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of bacteriology*, *188*(4), 1310-1315.
- Wang, Y., & Qian, P-Y. (2009).** Conservative Fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S Ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, *4*, e7401.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kasai, H. (2007).** Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(8), 1846-1850.

References

- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. C., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trupper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Wells-Bennik, M. H. J., Eijlander, R. T., den Besten, H. M. W., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Groot, M. N. N., Xiao, Y., Zwietering, M. H., Kuipers, H. P., & Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 457–482.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., & Gillis, M. (2001). DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1315-1322.
- Xia, G., & Wolz, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21(1), 593–601.
- Xiao, K., Wang, X., & Yu, H. (2019). Comparative studies of catalytic pathways for *Streptococcus pneumoniae* sialidases NanA, NanB and NanC. *Scientific Reports Nature*, 9(1), 1–13.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13amp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119

- Yoon, H., Yun, J., Lim, J. A., Roh, E., Jung, K. S., Chang, Y., Ryu, S. & Heu, S. (2013).** Characterization and genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* bacteriophages isolated from poultry/livestock farms. *Journal of General Virology*, 94(11), 2569-2576.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. & Chun, J. (2017).** Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. 67, 1613-1617.
- Zapun, A., Contreras-martel, C., & Vernet, T. (2008).** Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 361-385.
- Zhang, M., Ito, T., Li, S., Jin, J., Takeuchi, F., Lauderdale, T. L. Y., Higashide, M., & Hiramatsu, K. (2011).** Identification of the third type of PVL phage in ST59 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *FEMS microbiology letters*, 323(1), 20-28.





PUBLICATIONS



7. PUBLICATIONS

This work has produced the following publications:

- Abril, A. G., Rama, J. L. R., Feijoo-Siota, L., Calo-Mata, P., Salazar, S., Peix, A., Velázquez, E. & Villa, T. G. (2019).** *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1), 189-195.
- Abril, A. G., Ortea, I., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Villa, T. G. & Calo-Mata, P. (2018).** Characterization biomarker peptides for the Identification of *Bacillus* species by LC-ESI-MS/MS. In: A. Mendez-Vilas (Ed.) *Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology* (pp. 74-77). Universal Publishers Inc.
- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Rama, J. L. R., Villa, T. G. & Calo-Mata, P.** Characterization of bacteriophage peptides for *Streptococcus* pathogen identification by LC-ESI-MS/MS. (Manuscript in preparation).
- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Rama, J. L. R., Villa, T. G. & Calo-Mata, P.** Characterization of bacteriophage peptides for *Staphylococcus aureus* pathogen identification by LC-ESI-MS/MS. (Manuscript in preparation).
- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Rama, J. L. R., Villa, T. G. & Calo-Mata, P.** Characterization of foodborne strains of *Streptococcus* by shotgun proteomics: Functional networks and species-specific peptide biomarkers. (Manuscript in preparation).

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.003126#tab2>

