

Elementos genómicos asociados a la formación de biopelículas en *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie lactis

Genomic elements associated with biofilm formation in *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies lactis

Cesar Onoshi Sedano-Juaréz¹  , Joivier Vichi-Lozada²  , Rodolfo Lagunes-Quintanilla³  , Raúl Dávila-Delgado⁴   y América Ivette Barrera-Molina^{4*}  

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3004, Copilco Universidad, Coyoacán, Ciudad de México.

² Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal, 62574, Jiutepec Mor.

³ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI).

⁴ Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición, Calle Ixtaccíhuatl 100, Vista Hermosa, 62350 Cuernavaca, Mor.

ABSTRACT

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* are two biotechnologically important subspecies within the group of lactic acid bacteria. Both are used to obtain products based on lactic fermentation and their activity as probiotics has been reported. The aim of the present study was to identify and compare the genomic elements associated with biofilm formation in both subspecies using computational tools. The bibliometric analysis showed that adhesin genes, exopolysaccharide synthesis genes, and *cis*- and *trans*-regulatory elements could be associated with biofilm formation in both subspecies. The comparison of 12 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and seven *L. delbrueckii* subsp. *lactis* genomes, detected the presence of the *pili* and *srtA* genes in a conserved operon with identity percentages greater than 97 % between both subspecies. The *inu* gene that has a levansucrase function was also identified. Finally, the *epsD* gene was found present in a polycistronic transcriptional unit, encoding an enzyme associated with the synthesis of heteropolysaccharides. These data show, for the first time, evidence of the presence of genes that participate in biofilm formation in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains.

Keywords: *pili* gene; *srtA* gene; *inu* gene, *epsD* gene, bioinformatic.

RESUMEN

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* son dos subespecies biotecnológicamente importantes dentro del grupo de bacterias ácido-lácticas. Ambas se emplean en la obtención de productos basados en fermentación láctica y se ha reportado su actividad como probióticos. El objetivo del presente estudio fue identificar y comparar los elementos genómicos asociados a la formación de biopelículas en ambas subespecies utilizando herramientas computacionales. El análisis bibliométrico mostró que los genes de adhesinas, de síntesis de exopolisacáridos y ele-

mentos reguladores tipo *cis* y *trans* podrían estar asociados a la formación de biopelículas en ambas subespecies. La comparación de 12 genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y 7 de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* detectaron la presencia de los genes *pili* y *srtA* en un operón conservado con porcentajes de identidad superiores al 97 %. También se identificó el gen *inu* que presenta función de levansucrasa. Finalmente se encontró el gen *epsD*, presente en una unidad transcripcional policistronica, que codifica para una enzima asociada a la síntesis de heteropolisacáridos. Estos datos muestran por primera vez, evidencia de la presencia de genes que participan en la formación de biopelículas en cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Palabras clave: gen *pili*; gen *srtA*; gen *inu*, gen *epsD*, bioinformática.

INTRODUCCIÓN

Lactobacillus delbrueckii, descrita inicialmente como *Bacillus delbrueckii* por Leichmann en 1896, corresponde a una especie de bacterias grampositivas, productoras de ácido láctico. Desde su descubrimiento ha tenido una larga historia de aplicaciones en la microbiología y en la industria alimentaria, especialmente en la obtención de alimentos derivados de la fermentación láctica. En la actualidad, la especie comprende seis subespecies: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* y *L. delbrueckii* subsp. *indicus*. Estudios de genómica comparativa han demostrado que este grupo posee una alta diversidad intraespecífica, lo cual explica las diferencias en cuanto a los hábitats que ocupan y sus requerimientos nutricionales (Baek *et al.*, 2023). Dentro del grupo de *L. delbrueckii*, las subespecies, *bulgaricus* y *lactis* son de mayor importancia comercial debido a su uso como cultivos iniciadores de varios alimentos derivados de lácteos, especialmente en la elaboración de queso y yogurt, junto con *Streptococcus thermophilus* (Rizzello y De Angelis, 2011), ya que mejoran la textura y el sabor de los productos.

*Autor para correspondencia: América Ivette Barrera-Molina

Correo-e: america.barrera@uaem.mx

Recibido: 19 de agosto de 2024

Aceptado: 9 de octubre de 2024

Publicado: 27 de noviembre de 2024

Adicionalmente, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* son microorganismos considerados GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros, por sus siglas en inglés), y presentan actividades probióticas con beneficios demostrados para la salud. Estos beneficios incluyen la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en la mucosa intestinal (Oyeniran *et al.*, 2020), efectos protectores en modelos de mucositis (De Jesus *et al.*, 2019), inmunomodulación a nivel local y sistémico, y la mejora de parámetros bioquímicos de la sangre en estudios *in vivo* (Suzzi *et al.*, 2020). El mecanismo probiótico de estas bacterias incluye la producción de ácido láctico, que reduce el pH del intestino e inhibe el crecimiento de patógenos, y la producción de bacteriocinas, que son sustancias antimicrobianas. Además contribuyen a la barrera intestinal y modulan el sistema inmunológico (El-Sayed *et al.*, 2021). Sin embargo, para que estas bacterias proporcionen dichos beneficios, dependen en gran medida de la asimilación de determinadas fuentes de carbono, la producción de sustancias microbianas como las bacteriocinas y la capacidad de colonización de la mucosa intestinal, un proceso que está estrechamente relacionado con la formación de biopelículas (De Jesus *et al.*, 2022).

Las biopelículas son comunidades microbianas estructuralmente organizadas, embebidas en una matriz compleja de exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN exógeno, y sustancias inorgánicas, que se adhieren a superficies sólidas o en interfaces superficiales (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

Las especies bacterianas del género *Lactobacillus* son capaces de formar biopelículas una vez que alcanzan una densidad poblacional que permite la comunicación sincrónica entre ellas, un proceso conocido como "quorum sensing" (Lebeer *et al.*, 2007). Cuando ocurre esta transición, se activa un sistema de comunicación mediante de señales químicas y se regula la expresión de genes específicos cuyos productos principales son los agentes que determinan la formación de las biopelículas (Ruiz *et al.*, 2016). Sin embargo, es importante destacar que los reportes y estudios sobre la caracterización de los elementos genómicos asociados a la formación de las biopelículas en *L. delbrueckii*, son limitados. El propósito principal del este estudio es explorar las secuencias de ADN asociadas a la formación de las biopelículas en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* mediante herramientas de genómica comparativa. Este tipo de análisis permite inferir relaciones filogenéticas y comparar la existencia de elementos de regulación vinculados a secuencias de ADN entre diferentes cepas, así como la conservación de unidades transcripcionales relacionadas con la formación de estructuras y/o procesos celulares (de Crécy-Lagard *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recuperación de secuencias genómicas y selección de genes asociados a formación de biopelículas

Los genomas bacterianos pertenecientes a cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se recuperaron de la base de datos pública GenBank en formato

FASTA y GFF. Los genomas seleccionados estaban completamente secuenciados a la fecha de junio del 2021.

Para seleccionar genes que participan en la formación de biopelículas, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura donde se caracterizaron genes y/o proteínas involucradas en las etapas de formación de biopelículas del género *Lactobacillus*. Una vez identificados los genes, se hizo la búsqueda de las secuencias codificantes en la base de datos pública GenBank y las secuencias se recuperaron en formato FASTA.

Análisis de identidad de las secuencias nucleotídicas y peptídicas

Una vez seleccionados los genes a estudiar, se buscaron en los genomas bacterianos de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* utilizando las herramientas bioinformáticas BLASTN y BLASTP. Las secuencias nucleotídicas y/o peptídicas identificadas de los genomas bacterianos se sometieron a un análisis de identidad mediante un alineamiento local de secuencias nucleotídicas y/o peptídicas empleando los servidores BLASTN y BLASTP, con el objetivo de determinar el grado de conservación entre ambas subespecies (Altschup *et al.*, 1990). De los genes seleccionados se obtuvieron las secuencias peptídicas para analizar regiones o dominios proteicos de relevancia mediante los servidores UniProtKB de Expasy e Interpro.

Análisis de unidades transcripcionales y contexto genómico

Con la finalidad de identificar si los genes seleccionados se encuentran en unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas se empleó el programa Operon-mapper, el cual analiza la distancia intergénica de genes vecinos y las relaciones funcionales de sus productos codificantes (Taboada *et al.*, 2018). Por otro lado, el análisis del contexto genómico se realizó por medio del software Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). Subsecuentemente se utilizó el programa VISTA para la detección de diferencias en la presencia y orden de los genes que forman parte de las unidades transcripcionales (Frazer *et al.*, 2004).

Detección de elementos reguladores

La identificación de potenciales factores de transcripción involucrados en la formación de las biopelículas, se realizó en dos etapas sucesivas: una búsqueda de reguladores transcripcionales descritos en la base de datos del NCBI tomando a *Bacillus subtilis* como microorganismo modelo, posteriormente, dichas secuencias fueron identificadas en los genomas de estudio pertenecientes a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

A continuación se recuperó la secuencia corriente arriba (400 pb) de los genes seleccionados utilizando el servidor RSAT: Prokaryotes (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/index.php>) (Santana-García *et al.*, 2022). Con los programas Oligo-analysis y dyad-analysis (Defrance *et al.*, 2008), se determinó si la secuencia corriente arriba identificada presenta motivos de unión a potenciales factores de transcripción en la formación de las biopelículas.



RESULTADOS

Genomas bacterianos

El análisis de los genomas de referencia reportados en la base de datos Genbank mostró la anotación de 104 secuencias genómicas pertenecientes a 6 subespecies de *L. delbrueckii*, de las cuales sólo 27 genomas se encontraron secuenciados completamente. Las secuencias genómicas pertenecen a las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (11.5 %), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (6.7 %) y cepas de otras subespecies (7.6 %). Siendo los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* los más representados de las cepas de *L. delbrueckii*.

Se recuperaron las secuencias genómicas completas en formato FASTA de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12 genomas) y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7 genomas) y se analizaron los datos reportados en la base de datos, de donde se observa que el tamaño del genoma de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es de aproximadamente 1.8 Mb, mientras que los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, se encuentran en un rango de 2.0 a 2.3 Mb. Ambas subespecies cuentan con un porcentaje de GC inferior al 50 % y un promedio de secuencias codificantes (CDS) de 1615. No obstante, cerca del 40 % de CDS presentan una función desconocida (Tabla 1).

Selección de genes asociados a la formación de biopelículas

Como primer paso para la elección de genes involucrados en la formación de biopelículas se hizo una revisión bibliográfica exhaustiva donde se analizaron genes y/o proteínas que participan en las etapas de formación de biopelículas de bacterias ácido-lácticas. De este análisis minucioso se seleccionaron diez genes bastante bien caracterizados, los genes: *pili*, *welE*, *luxS*, *msa*, *ccpA*, *gadph*, *srtA*, *inu*, *bfrK* y *epsD* (Leeber *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2013; Walter *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2011). Estos genes fueron buscados en los genomas de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Los resultados muestran que existen genes asociados al metabolismo de carbohidratos con mayor frecuencia en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que genes asociados a la adhesión a superficie se identificaron de forma relevante en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Figura 1). De los diez genes analizados, se seleccionaron 4 genes con evidencia experimental asociada a diferentes etapas de la formación de biopelículas en bacterias del género *Lactobacillus*; *pili* (pilina) y *srtA* (sortasa de clase A), son genes que codifican a enzimas involucradas en las etapas de adhesión primaria y secundaria; y los genes *inu* y *epsD*, los cuales participan en la etapa de maduración de las biopelículas produciendo homo y heteropolisacáridos (Tabla 2).

Tabla 1. Características generales de los genomas de las cepas de las subespecies de *L. delbrueckii*. El análisis de los genomas de cada cepa reveló que presentan un tamaño de aproximadamente 1.8 Mb, para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se encuentran en un rango de 2.0 a 2.3 Mb. En ambas subespecies se identificó un porcentaje de GC inferior al 50 % y un promedio de secuencias codificantes (CDS) de 1615.

Table 1. General characteristics of the *L. delbrueckii* subspecies strains genomes. The analysis of each strain's genomes revealed that they have a size of approximately 1.8 Mb for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, while the genomes of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* range from 2.0 to 2.3 Mb. Both subspecies were found to have a GC content below 50% and an average of 1615 coding sequences (CDS).

Organismo	Cepa	Acceso GenBank	Tamaño (Mb)	%GC	CDS
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LJJ	CP049052.1	1.89109	49.5	1620
	KLDS1.1011	CP041280.1	1.88749	49.8	1629
	MN-BM-F01	CP013610.1	1.87507	49.7	1598
	KLDS1.0207	CP032451.1	1.86918	49.8	1625
	DSM 20080	CP019120.1	1.86818	49.8	1585
	ND04	CP016393.1	1.86175	49.6	1544
	ACA-DC 87	LT899687.1	1.856	49.8	1585
	L99	CP017235.1	1.84811	49.7	1580
	ATCC 11842	CR954253.1	1.865	49.7	1572
	2038	CP000156.1	1.87292	49.7	1584
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ND02	CP002342.1	2.13198	49.59	1855
	ATCC BAA-365	CP000412.1	1.85695	49.7	1595
	KCCM 34717	CP018215.1	2.26338	49.1	1958
	DSM 20072	CP022988.1	2.16598	49	1796
	KCTC 3034	CP023139.1	2.23761	49	1881
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1	LS991409.1	2.05032	49.6	1680
	KCTC 3035	CP018156.1	1.97273	50	1695
	NWC_1_2	CP029251.1	2.25977	48.5793	1909
	MAG_rmk202_Idel	CP046131.1	2.18449	48.9603	1801

Figura 1. Identificación de secuencias con similitud significativa con genes asociados a la formación de biopelículas en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Los genes *pili*, *welE*, *msa*, *gadph* y *srtA* son genes asociados a la adhesión celular, mientras que el gen *luxS* media el mecanismo del "quorum sensing". El gen *ccpA* se ha descrito como un regulador del crecimiento bacteriano, y el gen *bfrK* participa en un complejo de regulación de dos componentes. Finalmente, los genes *inu* y *epsD* participan en la síntesis de polisacáridos.

Figure 1. Identification of sequences with significant similarity to genes associated with biofilm formation in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. The *pili*, *welE*, *msa*, *gadph*, and *srtA* genes are associated with cell adhesion, while the *luxS* gene mediates the "quorum sensing" mechanism. The *ccpA* gene has been described as a regulator of bacterial growth, and the *bfrK* gene is involved in a two-component regulatory system. Finally, the *inu* and *epsD* genes are involved in polysaccharide synthesis.

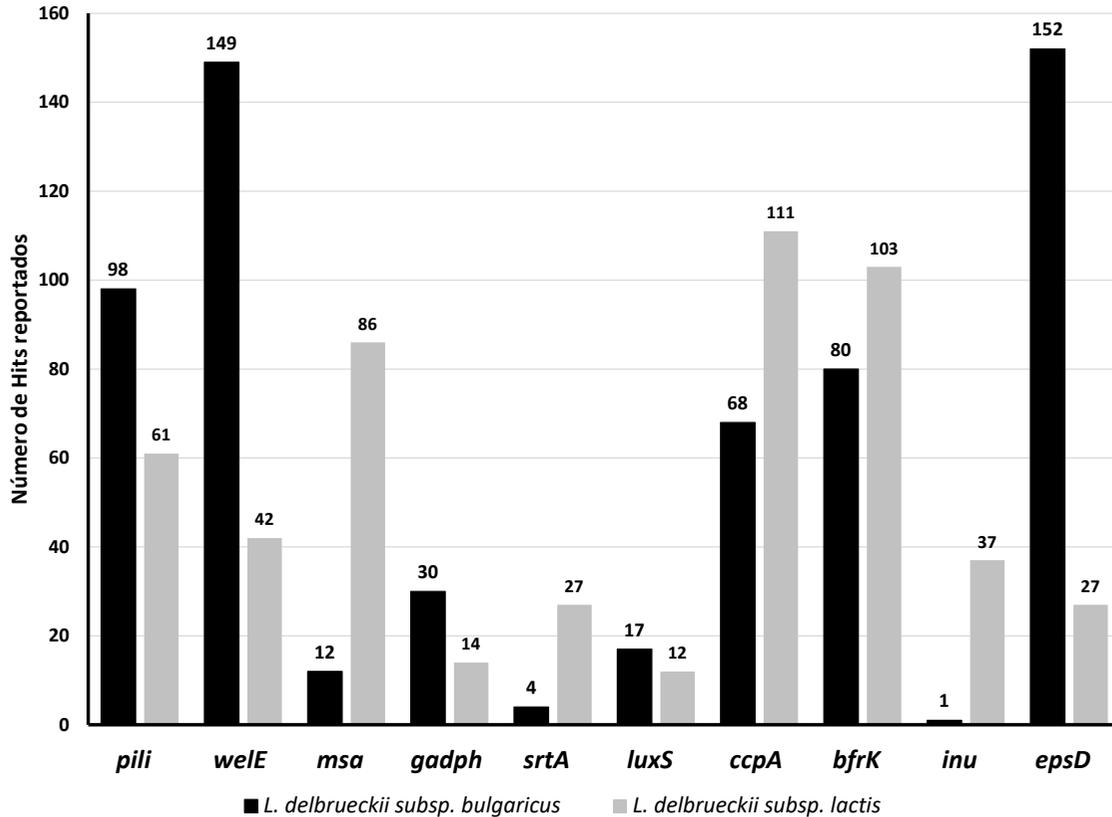


Tabla 2. Genes seleccionados involucrados en la formación de biopelículas. Los genes *pili*, *srtA*, *inu* y *epsD* fueron seleccionados para una caracterización bioinformática en los genomas de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Table 2. Selected genes involved in biofilm formation. The *pili*, *srtA*, *inu*, and *epsD* genes were selected for a bioinformatic characterization in the genomes of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains.

Gen	Función	Organismo	Referencia
<i>pili</i>	Pilina, involucrada en la adhesión y agregación bacteriana	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Leeber <i>et al.</i> , 2012
<i>srtA</i>	Sortasa de clase A, responsable de anclar covalentemente las proteínas de superficie a la pared celular	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Malik <i>et al.</i> , 2013
<i>inu</i>	Inulosacarasa, implicada en la producción de glucanas y fructanas (síntesis de homopolisacáridos)	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Walter <i>et al.</i> , 2008
<i>epsD</i>	Proteína de síntesis de heteropolisacáridos	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Hao <i>et al.</i> , 2011

Caracterización bioinformática de los genes asociados a la formación de biopelículas

La caracterización de los genes asociados a la formación de biopelículas se realizó a partir de los archivos en formato GFF. La búsqueda inicial del gen *pili* en los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* indicó que corresponde a una secuencia anotada como Prepilin-type N-terminal con una extensión de 324 nucleótidos. El alineamiento local de la secuencia de nucleótidos mostró que el gen de Prepilin-type N-terminal se encuentra presente en el 100 % de los genomas de estudio, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7). Se identificó un porcentaje de identidad global en un rango del 97.2 % al 98.77 % para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y del 98.46 % al 100 % para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Tabla 3). Con respecto al gen *srtA* presenta una extensión de aproximadamente 702 nucleótidos y una localización muy variable según entre las subespecies y las diferentes cepas, está presente en el 100 % de los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7), y el alineamiento nucleotídico reveló un rango de identidad del 98.15 % al 99.98 % para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de entre 99.15 % y 100 % para *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. (Tabla 3).

La etapa de maduración de las biopelículas consta de la síntesis de exopolisacáridos, que se pueden clasificar en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. El gen *epsD* participa en la síntesis de heteropolisacáridos durante la formación de la biopelícula, la secuencia genética de aproximadamente 777 pb fue determinada en el 100 % (12/12) de los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, con un porcentaje de identidad superior de 96.78 %. Por otro lado, dicha secuencia fue identificada en el 71.4 % (5/7) de los genomas de la subespecie *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. No se obtuvieron resultados positivos para las cepas KCCM 34717 y KCTC 3034 (Tabla 3).

Partiendo de la secuencia codificante de la inulosacarasa (*inu*) de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 se realizó un análisis de identidad para identificar proteínas homólogas en los genomas de estudio, teniendo como resultado la detección de cuatro proteínas: dos glicosil hidrolasas de la familia 68, una levansacarasa y una proteína hipotética LDE04_11610 con porcentajes de identidad del 43.83, 43.48, 43.83 y 45.15 % respectivamente (Tabla 4).

Análisis de familias y dominios funcionales

El análisis de familias y dominios proteicos realizado en Interpro mostró que la secuencia de aminoácidos del Prepilin-type

Tabla 3. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *pili*, *srtA* y *epsD*. Para el alineamiento se utilizaron los genes de ¹*L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 y a ²*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 como genes de referencias. N.D., no determinado.

Table 3. Nucleotide sequence alignment of the *pili*, *srtA*, and *epsD* genes. The genes from ¹*L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 and ²*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 were used as reference genes for the alignment. N.D., not determined.

Organismo	Cepa	% Identidad		
		<i>pili</i> ¹	<i>srtA</i> ¹	<i>epsD</i> ²
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842 = JCM 1002	97.22	99.00	96.01
	ND02	98.77	99.29	94.85
	LJJ	96.91	98.86	96.78
	KLDS1.1011	97.22	99.00	94.85
	MN-BM-F01	97.22	98.15	94.85
	2038	97.84	98.58	100
	KLDS1.0207	97.53	98.86	94.85
	DSM 20080	97.53	98.86	94.85
	ND04	97.22	98.43	98.58
	ATCC BAA-365	97.84	98.72	96.40
	ACA-DC 87	97.84	98.43	95.24
	L99	97.84	99.15	95.88
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20072	100	99.57	94.72
	KCTC 3034	100	100	N.D.
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1	100	99.43	94.98
	KCTC 3035	100	99.15	95.75
	NWC_1_2	100	99.57	93.83
	MAG_rmk202_ldel	100	99.72	93.83

Tabla 4. Determinación de secuencias similares al gen *inu* de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 mediante análisis BLASTX. Se identificaron 4 secuencias con similitud al gen *inu* en genomas de algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii*, cuya función está relacionada con la síntesis de carbohidratos.

Table 4. Determination of sequences similar to the *inu* gene of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 through BLASTX analysis. Four sequences similar to the *inu* gene were identified in the genomes of some *Lactobacillus delbrueckii* strains, whose function is related to carbohydrate synthesis.

Microorganismo	Nombre	Cobertura	E-Value	% Id	Acceso
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucósido hidrolasa de la familia 68	63 %	3.00E-142	43.83	WP_035182812.1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20072	Levansacarasa	63 %	4.00E-142	43.83	EGD27493.1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Glucósido hidrolasa de la familia 68	63 %	7.00E-141	43.48	WP_003614406.1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Proteína hipotética LDE04_11610	59 %	2.00E-139	45.15	EGD27493.1

N-terminal pertenece a la familia de la proteína de competencia "ComGC", la cual representa una *pseudopilina*, a su vez conserva diferentes elementos, como el sitio de metilación procariota N-terminal, el dominio de escisión N-terminal y el motivo de metilación procariota N-terminal. El alineamiento de la secuencia peptídica determinó un porcentaje de identidad superior al 98.14 %. Las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ y ND04 presentaban hasta tres variaciones de nucleótidos, mientras que el resto únicamente presentaban dos modificaciones. Se analizó también si existían cambios puntales de aminoácidos entre las secuencias peptídicas. Las modificaciones de aminoácidos detectadas se encuentran en sitios de unión entre dominios. El residuo nueve es quien presenta cambios más frecuentes, cambiando una glutamina (Q) por una prolina (P); pero también se encontraron cambios en la posición 21 entre una valina (V) y una leucina (L).

Por su parte, la proteína sortasa de clase A, pertenece a la familia sortasa, se caracteriza por anclar un gran número de proteínas de superficie funcionalmente distintas que contienen una señal de clasificación de pared celular bacteriana. La secuencia peptídica muestra un porcentaje de identidad superior del 99.57 %. Adicionalmente, se identificaron cambios de aminoácidos entre ambas subespecies, los cuales se presentan en los sitios de unión entre dominios. Los cambios observados en esta secuencia de aminoácidos no se presentan en el sitio activo ni en el sitio catalítico, se dan en sitios de unión entre dominios. Los cambios más significativos son entre una Asparagina (N) y un Aspartato (D) en la posición 204, mientras que la segunda variación con mayor incidencia fue en la posición 148, entre una Alanina (A) y una Glicina (G).

En relación con las enzimas vinculadas a la síntesis de exopolisacáridos, la secuencia codificante del gen *epsD* produce una proteína de 259 aminoácidos que forma parte de la familia de proteínas de síntesis de polisacáridos capsulares CpsB/CapC y contiene un dominio similar a PHP (polimerasa e histidil fosfatasa). La secuencia peptídica de la proteína mostró un porcentaje de identidad superior del 98.45 %.

Análisis del contexto genómico

El análisis de identificación de operones asociados a la adhesión a superficies en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038

realizado mediante el programa computacional Operon-mapper, permitió determinar que el gen correspondiente a la Pre-pilina tipo N-terminal se localizaba en un operón conformado por seis secuencias codificantes con las coordenadas genómicas 567122-570612. La unidad genética transcripcional comprende los genes: *comGC*, *comGD*, *comGF*, un regulador transcripcional, entre otras proteínas relacionadas a la síntesis de proteínas de membrana y adquisición de ADN exógeno.

Así mismo, se identificó que el gen *srtA* correspondiente a la sortasa de clase A se encontraba inmerso en un operón constituido por ocho genes localizado en la posición 1166395-1176625. Dicho operón está constituido por 8 genes, presentando un tamaño aproximado de 10.5 Kb. La unidad genética transcripcional se encuentra conformado por los genes: *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *hrcA*, un regulador transcripcional, un gen codificante para una exonucleasa y una proteína de integración. Este hallazgo denota que los 8 genes que componen la unidad genética transcripcional podrían estar estructuralmente conservados, al menos entre los microorganismos *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038.

La síntesis de heteropolisacáridos se caracteriza por la participación de varios genes. El análisis del contexto genómico mostró que el gen *epsD* se encontraba en un operón asociado a la síntesis de exopolisacáridos. El operón tiene una extensión aproximada de 10.5 Kb y se compone por los genes: *epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD*, *epsF*, *epsG*, *epsJ*, *epsK*, *epsM*, entre otros. La mayoría de estos genes codifican para glucosiltransferasas y galactosiltransferasas, enzimas que catalizan la transferencia de azúcares para la síntesis de polisacáridos. El mismo análisis en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 reveló que se encuentra en un operón compuesto únicamente por 5 genes que codifican para proteínas relacionadas a la síntesis de exopolisacáridos y comprenden una extensión aproximada de 4.4 Kb, 6 Kb menos que en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Así mismo, existe la presencia de proteínas hipotéticas, es decir enzimas con función desconocida. Es importante destacar que, ningún gen se encuentra anotado como "Eps" por lo que se infiere que la unidad genética transcripcional para la síntesis de exopolisacáridos está

presente pero no se encuentra caracterizada en los genomas estudiados.

Elementos reguladores asociados a la formación de las biopelículas

La búsqueda de factores de transcripción identificó un regulador transcripcional maestro asociado a la formación de biopelículas codificado por el gen *sinR* estudiado en *Bacillus subtilis*. Esta secuencia reguladora fue potencialmente identificada en el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* mediante un alineamiento local de secuencias peptídicas. El análisis indicó la presencia de una proteína llamada Helix-turn-helix Domain-containing con una cobertura de extensión de 45 % y un E-value de 2×10^{-9} .

Finalmente, la búsqueda de proteínas relacionadas a factores de transcripción con dominio Helix-turn-helix mostró la presencia de tres potenciales elementos reguladores en el 100 % de los genomas estudiados. Para el caso del regulador transcripcional, con el número de acceso WP_099279028.1 ubicado con las coordenadas genómicas 1665100-1665459 en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038, se encontró que está anotado como una proteína hipotética conservada, además tiene secuencias genéticas adyacentes que codifican para proteínas hipotéticas y proteínas de biosíntesis de exopolisacáridos, entre ellas glucosiltransferasas.

Sitios de unión de factores de transcripción

Con el objetivo de identificar elementos de regulación en *cis*, se llevó a cabo un análisis de identificación de secuencias de unión a factores de transcripción mediante el software Oligo-analysis. Los resultados muestran una lista de motivos de unión ordenados significativamente. En la región río arriba (400 pb) de los operones que contienen los genes *Prepilin-N-terminal*, *srtA* y *epsD*, se identificaron ocho oligonucleótidos significativamente sobrerrepresentados (Figura 2).

El oligonucleótido de mayor rango, GCTGGA, se encuentra siete veces a lo largo de la secuencia región corriente arriba, mientras que se esperarían 0.47 ocurrencias por casualidad. El P-value ($\text{occ}_p = 6.2 \times 10^{-7}$) indica la probabilidad

de observar al menos 7 ocurrencias cuando se esperan 0.47. El número esperado correspondiente de falsos positivos es bajo ($\text{occ}_E = 1.3 \times 10^{-3}$), lo que indica que es poco probable que la sobrerrepresentación sea resultado del azar. La sección correspondiente al *Pattern assembly* del ensamble número uno muestra que los hexanucleótidos GCTGGA y CCAGCG se pueden ensamblar para formar un solo motivo: CGCTGGA (Figura 2).

DISCUSIÓN

Ante el crecimiento exponencial de datos disponibles de múltiples proyectos de secuenciación de genomas procariotas, la atención se ha centrado en comparaciones intraespecíficas que permitan descubrir genes asociados a procesos celulares específicos. Los análisis de secuencias intraespecíficas han demostrado ser fundamentales en la mejora de las anotaciones existentes, la identificación de nuevas regiones de codificación y la predicción de elementos reguladores (Windsor y Mitchell-Olds, 2006).

Los resultados del análisis bibliométrico mostraron que cuatro genes son fundamentales en las etapas de adhesión y maduración de las biopelículas (Tabla 2). Los genes seleccionados fueron el codificante a la subunidad monomérica de la pilina, proteína involucrada en la adhesión de las células bacterianas a una superficie sólida y responsables de la agregación celular para la formación de microcolonias (Lebeer *et al.*, 2012; Oxaran *et al.*, 2012). El gen *srtA* que se traduce en una proteína denominada sortasa de clase A, responsable de anclar covalentemente las proteínas de superficie a la pared celular (Malik *et al.*, 2013). El gen *inu*, implicado en la producción de glucanas y fructanas en el proceso de síntesis de homopolisacáridos (Lebeer *et al.*, 2009) y el gen *epsD* que forma parte de una unidad transcripcional policistrónica asociada a la síntesis de heteropolisacáridos (Lamothe *et al.*, 2002). En la figura 3 se observa la posible activación de genes específicos que controlan el desarrollo y progreso de la biopelícula.

Las proteínas de adhesión en el género *Lactobacillus* son fundamentales para la adherencia eficiente a las células epiteliales intestinales y dar lugar a la agregación celular y

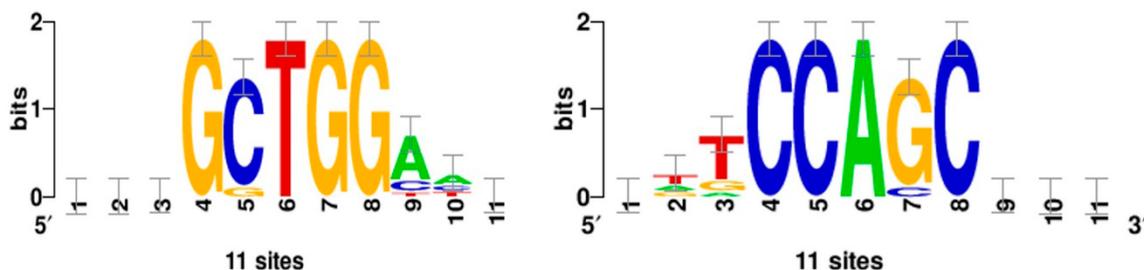


Figura 2. Logotipos de los motivos de unión a factores de transcripción identificados mediante el software Oligo-analysis. El análisis de la región río arriba (400 pb) de los operones que contienen los genes *pili*, *srtA* y *epsD*, reveló ocho oligonucleótidos significativamente sobrerrepresentados, de los cuales el hexanucleótido GCTGGA es el más representado. La evaluación con la herramienta bioinformática *Pattern assembly* mostró que los hexanucleótidos GCTGGA y CCAGCG se pueden ensamblar para formar un solo motivo: CGCTGGA.

Figure 2. Logos of transcription factor binding motifs identified using Oligo-analysis software. Analysis of the upstream region (400 bp) of the operons containing the *pili*, *srtA*, and *epsD* genes revealed eight significantly overrepresented oligonucleotides, among which the hexanucleotide GCTGGA is the most represented. Evaluation with the bioinformatics tool *Pattern Assembly*, showed that the hexanucleotides GCTGGA and CCAGCG can be assembled to form a single motif, CGCTGGA.

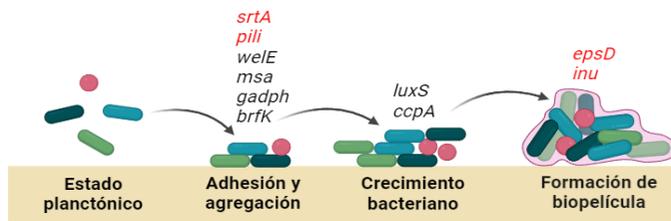


Figure 3. Modelo hipotético de activación de genes específicos que controlan el desarrollo y progreso de la biopelícula. Las bacterias libres (planctónicas) se acercan y se adhieren de manera reversible a una superficie. En seguida, comienzan a segregar componentes extracelulares (genes *srtA*, *pili*, *welE*, *msa* y *gadph*), lo que las fija de forma más estable y permite su agregación (regulado por el gen *brfK*, si el mecanismo de adhesión depende de sacarosa). A medida que proliferan (gen *ccpA*), las bacterias inician la formación de la biopelícula, mediante la secreción de polisacáridos (genes *epsD* e *inu*). Durante este proceso, se comunican mediante señales químicas (quórum sensing, gen *luxS*), lo que les permite coordinar su crecimiento y organizar la estructura de la biopelícula.

Figure 3. Hypothetical activation model of specific genes controlling biofilm development and progression. Free (planktonic) bacteria approach and adhere reversibly to a surface. Next, they begin to secrete extracellular components (*srtA*, *pili*, *welE*, *msa*, and *gadph* genes), which anchor them more stably and allow their aggregation (regulated by the *brfK* gene if the adhesion mechanism depends on sucrose). As they proliferate (*ccpA* gene), the bacteria initiate the formation of the biofilm through the secretion of polysaccharides (*epsD* and *inu* genes). During this process, they communicate via chemical signals (quorum sensing, *luxS* gene), allowing them to coordinate their growth and organize the biofilm structure.

una subsecuente formación de las biopelículas (Lebeer *et al.*, 2012). La secuencia nucleotídica del gen anotado como Prepilin-type N-terminal se encuentran altamente conservado entre ambas subespecies, sin embargo, no se encuentran en la misma posición del genoma, esto podría ser explicado debido a que los genomas bacterianos pueden cambiar drásticamente en tamaño, repertorio de genes y sintenia entre las diferentes cepas o linajes ambientales (Cuadros-Orellana *et al.*, 2007).

La secuencia peptídica identificada de la pilina pertenece a la familia de la proteína de competencia ComGC, presenta un motivo de metilación procarionta N-terminal. Estos resultados sugieren que la proteína determinada posiblemente sea una pilina tipo IV, las cuales se definen por un motivo de secuencia N-terminal conocido como péptido señal de clase III (Giltner *et al.*, 2012). Esta proteína se encuentra en la mayoría de las bacterias confiriendo una variedad de funciones, incluyendo adhesión, motilidad, secreción de proteínas y absorción de ADN (Sheppard *et al.*, 2020).

Adicionalmente Laurenceau *et al.* (2013) reportó que las proteínas tipo pilina están compuestas principalmente por la subunidad mayor (comGC) y se ensamblan mediante una maquinaria simple compuesta por cuatro pilinas menores (comGD, comGE, comGF y comGG), una pre-pilina peptidasa (comC), una extensión ATPasa (comGA) y una proteína de plataforma (comGB). Los hallazgos encontrados en el presente estudio sugieren la presencia del gen codificante a una pilina de tipo IV en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* como estructura de adherencia. Esta misma, al ser una proteína de competencia podría estar potencial-

mente relacionada con el mecanismo de adquisición de ADN exógeno, siendo este un componente principal de las biopelículas, razón que puede explicar el fenómeno de adherencia. Adicionalmente, los pili de tipo IV son esenciales en una gran diversidad de especies bacterianas, ya que contribuyen a distintos procesos como la motilidad espasmódica, competencia natural, formación de biopelículas o microcolonias y adhesión de células huésped (Ronish *et al.*, 2019).

Por otro lado, el gen *srtA* que codifica a la sortasa de clase A se identificó en el 100 % de los genomas de estudio (Tabla 3). De acuerdo con Guiton *et al.* (2009), factores como las sortasas, la autolisina y el ADN extracelular se han asociado a la producción de las biopelículas. Evidencias experimentales revelan que, cuando es eliminado el gen *srtA*, se ve afectada la etapa de maduración de las biopelículas en *Enterococcus faecalis*. En *Lactobacillus plantarum* una deleción génica en el gen *srtA* muestra una disminución en la adherencia a las células epiteliales y pérdida de la capacidad para formar biopelículas (Malik *et al.*, 2013).

El gen *srtA* se identificó en una unidad transcripcional que comprende los genes *hrcA*, *dnaK*, *dnaJ*, *lepA* y *recJ*. Dichos genes han sido relacionados con la formación de biopelículas en algunas especies del género *Lactobacillus*. En correlación con De Angelis *et al.* (2015) cuando *L. plantarum* DB200 forma su biopelícula, se incrementan los niveles de algunas proteínas de estrés como DnaJ y GroEL. Los altos niveles de estas proteínas pueden contribuir a una mayor supervivencia de las células en condiciones de estrés por calor (De Angelis *et al.*, 2015) y ejercer protección cruzada frente a otros choques ambientales (De Angelis *et al.*, 2004). Además, dichas proteínas también muestran propiedades adhesivas e inmunomoduladoras (Pessione, 2012).

En la actualidad, no existen reportes en la literatura sobre proteínas de biosíntesis de homopolisacáridos en los genomas de estudio (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*). Sin embargo, al realizar un análisis del tipo BLASTX utilizando la secuencia codificante de la Inulosacarasa de *L. reuteri* TMW 1106.1 se reveló la presencia de 4 proteínas homólogas de las cuales dos son glicosil hidrolasas, una levansacarasa y una proteína hipotética (Tabla 4). *L. reuteri* es una bacteria ácido-láctica formadora de biopelículas que se ha encontrado con mayor prevalencia en individuos con obesidad que en individuos con normopeso (Million *et al.*, 2012). Adicionalmente, Jones y Versalovic (2009) demostraron que la biopelícula formada por *L. reuteri* modula la producción de citocinas y produce sustancias antiinflamatorias. Estos resultados indican que, solo algunas cepas pertenecientes a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* contienen al menos una proteína relacionada a la síntesis de homopolisacáridos. Para el caso particular de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 se identificó una proteína compuesta por 1091 aminoácidos denominada levansacarasa, por lo que se podría inferir que el homopolisacárido sintetizado por dicho microorganismo es una fructana de tipo levana. Este resultado es altamente significativo, puesto que las especies pertenecientes al grupo de *Lactobacillus*

delbrueckii presentan genomas muy similares, de hecho, no se pueden diferenciar al utilizar la secuencia del *rrs* que codifica el RNA 16S. Nuestro hallazgo confirma la existencia de un gen específico de cepas asociado al metabolismo de los carbohidratos responsables de catalizar la formación de polímeros de fructosa ya sean lineales o ramificados a partir de sacarosa (Tiekong y Gänzle, 2005).

Según Schwab *et al.* (2007) la inactivación de los genes *inu* y *ftfA* (codifica una levansacarasa) elimina por completo la síntesis de homopolisacáridos en *L. reuteri* TMW1.106 y *L. reuteri* LTH5448. Además, evidencias experimentales postulan que estos genes confieren importantes atributos ecológicos a *L. reuteri* TMW1.106 ya que, contribuyen a la colonización en el tracto gastrointestinal del huésped (Walter *et al.*, 2008). Identificar secuencias homologas de estos genes en las especies *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* es de suma importancia, ya que, pudieran cumplir una función similar en la síntesis de exopolisacáridos y en el proceso de adherencia a las células epiteliales del intestino.

Los heteropolisacáridos se caracterizan por ser sintetizados mediante la acción conjunta de un grupo de genes denominados *eps*, los cuales se pueden localizar tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Caggianiello *et al.*, 2016). Estos genes han sido reportados en *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus sp.* (Ruas-Madiedo, 2009). En el presente estudio se identificó el gen *epsD* con las coordenadas genómicas 1683916-1694141 en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Dicho gen se encontraba inmerso en una unidad transcripcional policistrónica compuesta por los genes *epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD*, *epsF*, *epsG*, *epsJ*, *epsK*, *epsM*, entre otros, presentando una extensión aproximada de 10.5 Kb. En conformidad con Zeidan *et al.* (2017) los grupos de genes *eps* (u operones) tienen un tamaño de 15 a 20 Kb y comprenden menos de 30 genes.

El presente estudio encontró cierta variabilidad en la extensión y composición del operón *eps* entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Una posible explicación de este resultado se debe a que el programa Operon-mapper se basa en la distancia intergénica de genes vecinos y en las relaciones funcionales de sus productos codificantes. Por lo que una distancia intergénica mayor a la que detecta el programa pudo discriminar la cantidad de genes presentes en el operón con respecto a lo reportado en la literatura. De forma general se ha descrito que, en las Bacterias Ácido Lácticas, los genes que conforman el operón *eps* suelen tener la misma orientación y se transcriben como un solo ARN mensajero (Lamothe *et al.*, 2002). Esta postulación coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que, el operón responsable de la síntesis de EPS se encuentra en la misma dirección tanto en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 como en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072.

Adicionalmente, Hao *et al.*, 2011 menciona que, el grupo de genes *eps* propio de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 muestra diferencias significativas contra *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

BAA365 con respecto a la ganancia y pérdida de algunos genes que codifican glucosiltransferasas. Por lo tanto, la unidad de repetición EPS producida por los grupos de genes de la cepa 2038 debe ser diferente de la ATCC 11842 y BAA365 asumiendo que cada cepa sintetiza un heteropolisacárido único.

Si bien se necesitan múltiples productos genéticos para el desarrollo de biopelículas, en *Bacillus subtilis* la decisión de cambiar de un estado planctónico de vida libre a un estado de formación de biopelículas se rige por SinR, el regulador transcripcional maestro de la formación de biopelículas (Newman *et al.*, 2013). Los resultados de la presente investigación mostraron 3 proteínas con porcentajes de identidad significativos contra SinR con el nombre *Helix-turn-helix transcriptional regulator* y los códigos de accesos WP_099279028.1, WP_072547665.1 y WP_072547106.1. De acuerdo con Branda *et al.* (2001), SinR es un represor transcripcional que se une a la región promotora del operón responsable de la biosíntesis de exopolisacáridos EpsA-O.

A pesar de haber detectado 3 proteínas homologas, únicamente WP_099279028.1 presenta como genes vecinos a proteínas asociadas a la biosíntesis de exopolisacáridos como, por ejemplo, glucosiltransferasas, hecho que nos brinda la posibilidad de inferir que este regulador transcripcional esta potencialmente relacionado en la regulación del operón *eps* en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Además de la proteína SinR, se han identificado otros factores de transcripción que están relacionados con la regulación de algunos genes durante el cambio en el estilo de vida de un estado planctónico al séstil. Entre ellos, *ccpA*, un regulador transcripcional clave de la respuesta a la limitación de carbohidratos inicialmente descrito en *L. plantarum* (Muscarello *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que la proteína BrpA regula el desarrollo de biopelículas en *S. mutans* (Wen *et al.*, 2006).

Los elementos regulatorios que actúan en *cis* se pueden definir como una secuencia de ADN no codificante responsable de la transcripción de los genes cercanos (Wittkopp *et al.*, 2012). El descubrimiento de este tipo de secuencias puede desempeñar un papel crucial en el descifrado de las secuencias del genoma y en la interpretación de los datos del transcriptoma (Defrance *et al.*, 2008). Se han empleado una gran diversidad de enfoques para la identificación de elementos que actúan en *cis* entre especies. Algunos de ellos se basan en la identificación de patrones en especies evolutivas considerablemente distantes (Alkema *et al.*, 2004) y algunos otros en la comparación de especies directamente relacionadas (Yan *et al.*, 2004).

En el presente estudio se identificaron dos motivos altamente significativos, GCTGGA y GAATGGTC en las regiones corriente arriba de los genes conservados y las unidades transcripcionales predichas en los diferentes genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Figura 2). Este tipo de análisis bioinformático se ha empleado para la detección de motivos de unión específicos en *L. plantarum* en el que se detectaron 6 patrones de secuencia en la

región corriente arriba de genes asociados al metabolismo de fructooligosacáridos (Chen *et al.*, 2015), resultados que posteriormente fueron confirmados mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Este resultado es altamente significativo para dar pie al diseño de protocolos experimentales que permitan reafirmar los motivos de unión detectados mediante análisis bioinformáticos.

CONCLUSIONES

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* son dos subespecies dentro del grupo de *Lactobacillus delbrueckii* con genes altamente conservados. El presente estudio demuestra que ambas subespecies presentan elementos genómicos para formar biopelículas, especialmente los genes relacionados a mecanismos de adhesión (*pili* y *srtA*) y síntesis de exopolisacáridos (*inu* y *epsD*), correspondientes a las etapas de adherencia y maduración de las biopelículas.

Los genes *pili*, *epsD* y *srtA* forman parte de unidades transcripcionales policistrónicas conservadas, por lo que es necesario realizar estudios enfocados a revelar qué estímulos ambientales y redes de interacción biológica están vinculados a la formación de biopelículas. A pesar de que los genes identificados presentan porcentajes de identidad superiores al 95 % entre subespecies, la posición genómica es altamente variable, lo que revela que los genomas estudiados son altamente dinámicos y pueden cambiar el repertorio de genes entre las diferentes cepas o linajes ambientales.

Independientemente de que las especies *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se han utilizado ampliamente en aplicaciones biotecnológicas e industria alimentaria, se dispone de información limitada sobre el mecanismo de regulación genética de formación de las biopelículas. Los análisis realizados demostraron que las especies de estudio contienen un factor de transcripción potencialmente vinculado con el control transcripcional de genes, cuyo producto son proteínas de biosíntesis de exopolisacáridos y otras enzimas fundamentales en la formación de biopelículas. Por lo tanto, se infiere que deben existir vías reguladoras mediadas por reguladores transcripcionales y condiciones ambientales que deben ser dilucidadas.

Los patrones de secuencia de ADN detectados río arriba de los operones vinculados a la formación de biopelículas demostraron ser estadísticamente significativos, los datos generados en este análisis pueden ser importantes para futuros protocolos experimentales. Los análisis de predicción de elementos reguladores en *cis* pueden identificar subconjunto de genes co-regulados inmerso en un subgrupo más extenso de genes co-expresados, lo que permitirá esclarecer el estado de la red reguladora y reconocer las señales ambientales a las que reacciona el microorganismo.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alkema, W.B.L., Lenhard, B. y Wasserman, W.W. 2004. Regulo analysis: Detection of conserved regulatory networks across bacteria: Application to *Staphylococcus aureus*. *Genome Res.* 7:1362-1373.
- Altschup, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* Vol. 215.
- Baek, M.G., Kim, K.W. y Yi, H. 2023. Subspecies-level genome comparison of *Lactobacillus delbrueckii*. *Sci Rep.* 13(1).
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. y Spano, G. 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 100:3877-3886.
- Chen, C., Zhao, G., Chen, W. y Guo, B. 2015. Metabolism of fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST-III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. *Appl Environ Microbiol.* 81(22):7697-7707.
- Sarduy Bermúdez, L. y González Díaz, M.E. 2016. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana Biofilm: a new conception of dentobacterial plaque. *Medicentro electronica.* Vol. 20.
- Cuadros-Orellana, S., Martin-Cuadrado, A.B., Legault, B., D'Auria, G., Zhaxybayeva, O., Papke, R.T. y Rodriguez-Valera, F. 2007. Genomic plasticity in prokaryotes: The case of the square haloarchaeon. *ISME Journal.* 1(3):235-245.
- De Angelis, M. y Gobbetti, M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics.* 4:106-122.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Campanella, D., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. 2015. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200. *Proteomics.* 15(13):2244-2257.
- de Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R.D., Noiriell, A. y Hanson, A.D. 2007. Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: Predictions and validations. *BMC Genomics.* 23:8.
- De Jesus, L.C.L., Aburjaile, F.F., Sousa, T.D.J., Felice, A.G., Soares, S.D.C., Alcantara, L.C.J. y De Carvalho, A.V.A. 2022. Genomic characterization of *Lactobacillus delbrueckii* strains with probiotics properties. *Frontiers in Bioinformatics.* 6:2.
- De Jesus, L.C.L., Drumond, M.M., de Carvalho, A., Santos, S.S., Martins, F.S., Ferreira, Ê., Salgado, F.R., Do Carmo, F.L., Perez, P.F., Carvalho, A., Vascos, A., Mancha, A.P. 2019. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 in a model of 5 fluorouracil-induced intestinal mucositis. *J Funct Foods.* 53:197-207.
- Defrance, M., Janky, R., Sand, O. y van Helden, J. 2008. Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences. *Nat Protoc.* 3(10):1589-1603.
- El-Sayed, A., Aleya, L. y Kamel, M. 2021. Microbiota's role in health and diseases. *Environmental science and pollution research international,* 28(28), 36967-36983.
- Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M. y Dubchak, I. 2004. VISTA: Computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 1;32(WEB SERVER ISS.).
- Giltner, C.L., Nguyen, Y. y Burrows, L.L. 2012. Type IV pilin proteins: Versatile molecular modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 76(4):740-772.
- Guiton, P.S., Hung, C.S., Kline, K.A., Roth, R., Kau, A.L., Hayes, E., Heuser, Dodson, K.W., Caparon, M.G. y Hultgren, S.J. 2009. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus*

- faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect Immun.* 77(9):3626-3638.
- Hao, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Zhonghao, Y., Munehiro, O., Tomonobu, K., Shengyue, W., Xuan, L., Zai-Si, J. y Guoping, Z. 2011. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. *PLoS One.* 6(1).
- Jones, S.E. y Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 9.
- Lamothe, G., Jolly, L., Mollet, B. y Stingle, F. 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch Microbiol.* 178(3):218-228.
- Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., Campo, N., Chamot-Rooke, J., Le EL., Claverys, J.P. y Fronzes, R. 2013. A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 9(6).
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L.P., Verhoeven, T.L.A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., De Vos, W.M., De Keersmaecker, S.C.J. y Vanderleyden, J. 2012. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 78(1):185-193.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Fadda, A.A., Marchal, K. y Vanderleyden, J. 2007. Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J Bacteriol.* 189(3):860-871.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrière, Y., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. 2009. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol.* 75(11):3554-3563.
- Malik, S., Petrova, M.I., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Busschaert, P., Vaneechoutte, M., Lievens, Bart., Lambrichts, I., Sienzen, R.J., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. 2013. The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain cmpg5300 is sortase dependent. *Appl Environ Microbiol.* 79(15):4576-4585.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B. y Raoult, D. 2012. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes.* 36(6):817-825.
- Muscariello, L., Marino, C., Capri, U., Vastano, V., Marasco, R., Sacco, M. 2013. CcpA and three newly identified proteins are involved in biofilm development in *Lactobacillus plantarum*. *J Basic Microbiol.* 53(1):62-71.
- Newman, J.A., Rodrigues, C. y Lewis, R.J. 2013. Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry.* 12;288(15):10766-10778.
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J.M., Péchoux, C., Meylheuc, T., Briandet, R., Juillard, V., Piard, J.C. 2012. Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS One.* 6;7(12).
- Oyeniran, A., Gyawali, R., Aljaloud, S.O., Krastanov, A. y Ibrahim, S.A. 2020. Probiotic characteristics and health benefits of the yogurt bacterium *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86939>
- Pessione, E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2:86.
- Rizzello, C.G., De Angelis, M. 2011. Lactic acid bacteria *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus delbrueckii* Group. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition.* 1;119-124.
- Ronish, L.A., Lillehoj, E., Fields, J.K., Sundberg, E.J. y Piepenbrink, K.H. 2019. The structure of PilA from *Acinetobacter baumannii* AB5075 suggests a mechanism for functional specialization in *Acinetobacter* type IV pili. *Journal of Biological Chemistry.* 4;294(1):218-230.
- Ruas-Madiedo, P. 2009. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends.* p. 279-310.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Ad' Rajandream, M.A. y Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation [Internet]. Vol. 16, *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*. Available from: <http://www.acedb.org/>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M.F.R. y Ha, S.D. 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 14(4):491-509.
- Santana-Garcia, W., Castro-Mondragon, J.A., Padilla-Gálvez, M., Nguyen, N.T.T., Elizondo-Salas, A., Ksouri, N., Gerbes, F., Thieffry, D., Vincens, P., Contreras-Moreira, B., Helden, J.V., Thomas-Chollier, M. y Medina-Rivera, A. 2022. RSAT 2022: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 5;50(W1):W670-676.
- Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F. y Gänzle, M.G. 2007. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst Appl Microbiol.* 10;30(6):433-443.
- Sheppard, D., Berry, J.L., Denise, R., Rocha, E.P.C. y Matthews, S. 2020. Pelvic V. The major subunit of widespread competence pili exhibits a novel and conserved type IV pilin fold. *Journal of Biological Chemistry.* 8;295(19):6594-5604.
- Suzzi, G., Sidari, R., Reinheimer, J., Liu, F., Huo, G. y Evivie, S.E. 2020. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS 1.0207 exerts antimicrobial and cytotoxic effects *in vitro* and improves blood biochemical parameters *in vivo* against notable foodborne pathogens. Available from: www.frontiersin.org
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R. y Merino, E. 2018. Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics.* 1;34(23):4118-4120.
- Tieking, M. y Gänzle, M.G. 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated *Lactobacilli*. In: *Trends in Food Science and Technology.* 79-84.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, M.G. y Tannock, G.W. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology.* 154(1):72-80.

- Wen, Z.T., Baker, H.V. y Burne, R.A. 2006. Influence of BrpA on critical virulence attributes of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 188(8):2983-2992.
- Windsor, A.J. y Mitchell-Olds, T. 2006. Comparative genomics as a tool for gene discovery. *Current Opinion in Biotechnology.* 17:161-7.
- Wittkopp, P.J. y Kalay, G. 2012. Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics.* 13:59-69.
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J. 2004. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics.* 109(8):1677-1686.
- Zeidan, A.A., Poulsen, V.K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P.M.F., Øregaard, G. y Neves, A.R. 2017. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews.* 47.