

## 28. Mecanismos implicados en la resistencia de *Lactococcus lactis* a la bacteriocina Lcn972

Clara Roces, Ana B. Campelo, Verónica Pérez, Diego Blanco, Ana Rodríguez y Beatriz Martínez

Grupo DairySafe. Departamento de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos. IPLA-CSIC. Carretera de Infiesto s/n. 33300 Villaviciosa (Asturias).

*Lactococcus lactis* es un microorganismo de gran relevancia industrial ya que es uno de los componentes mayoritarios de los cultivos iniciadores mesófilos utilizados en la elaboración de queso. Con el objeto de conocer mecanismos implicados en la respuesta de *L. lactis* al daño de la envuelta celular y desarrollar estrategias para la selección de cultivos iniciadores más robustos, hemos abordado la caracterización fenotípica y genética de mutantes resistentes a la bacteriocina lactococina 972 (Lcn972). Esta bacteriocina no modificada inhibe la síntesis de pared celular durante la formación del septo de división en *Lactococcus lactis* y es un potente activador del sistema de dos componentes CesSR que modula la respuesta a dicho estrés en *Lactococcus*. La selección de cultivos resistentes se realizó *in vitro* mediante el cultivo sucesivo de la cepa sensible *L. lactis* MG1614 (CIM 10 UA/ml) en presencia de concentraciones crecientes de Lcn972. Se seleccionaron dos mutantes, *L. lactis* D1 y D1-20, resistentes a >320 UA/ml y 80 UA/ml, respectivamente.

La caracterización fenotípica de estos mutantes demostró que la resistencia a Lcn972 no repercute negativamente en el crecimiento de *L. lactis* en condiciones de laboratorio, ni se correlacionó con cambios sustanciales en las propiedades físico-químicas de la superficie celular. Sin embargo, el análisis del peptidoglicano de los mutantes resistentes reveló una mayor concentración de muropeptidos con cadenas amino acídicas formadas por tripéptidos y una reducción de las formadas por pentapéptidos, asociándose por primera vez cambios en la composición del peptidoglicano con la resistencia a bacteriocinas. También se detectó la existencia de resistencia cruzada a lisozima y nisina y una mayor susceptibilidad a penicilina G y bacitracina. Sorprendentemente, los mutantes resistentes a Lcn972 lo fueron también a la infección por el fago lítico c2. El análisis de la región del gen *pip*, que codifica la proteína de membrana Pip necesaria para la infección por este fago, puso de manifiesto la existencia de una delección de 22.6 kpb que engloba, entre otros, *pip* y genes implicados en el metabolismo de maltosa y almidón. La contribución de estas funciones al fenotipo de resistencia no se ha podido establecer experimentalmente.

Por otro lado, el análisis transcripcional de *L. lactis* D1 reveló la activación de 14 genes de los cuales *llmg2447*, que codifica un posible factor anti-sigma de función extracelular (ECF), presentaba el factor de inducción más alto (x37.6) respecto a la cepa parental. Comprobamos que la activación de *llmg2447* era consecuencia de la integración de la secuencia de inserción IS981 en la región promotora y que la sobreexpresión de este gen protege de forma específica a *L. lactis* de la acción de Lcn972 pero no de otros antimicrobianos de pared.

A la vista de estos resultados podemos concluir que la bacteriocina Lcn972 puede constituir una herramienta útil para la selección de mutantes de *L. lactis* más resistentes a lisozima, nisina y a fagos y, por tanto, con una funcionalidad mejorada como cultivos iniciadores.

CIM: concentración inhibitoria mínima. UA: unidades de actividad

**Palabras clave:** cultivo iniciador, estrés, pared celular, bacteriocina