

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 876**

21 Número de solicitud: 202330818

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)	<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/20</b>	(2010.01)		
<b>A61K 35/747</b>	(2015.01)		
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/16</b>	(2006.01)		
<b>C12P 13/00</b>	(2006.01)		
<b>B09C 1/10</b>	(2006.01)		

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.09.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.03.2025**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE JAÉN (100.00%)**  
**Campus Las Lagunillas, S/N**  
**23071 Jaén (Jaén) ES**

72 Inventor/es:

**ABRIOUEL HAYANI, Hikmate;**  
**BENOMAR EL BAKALI, Nabil;**  
**MANETSBERGER, Julia y**  
**CABALLERO GÓMEZ, Natacha**

54 Título: **Cepa *Lactiplantibacillus pentosus* CECT 30896**

57 Resumen:

La presente invención describe una nueva cepa de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), aislada de aceitunas de mesa alcoreñas, con efecto dual como bacteria probiótica para los seres humanos/animales y también para las plantas, y su uso como agente antimicrobiano y para la biorremediación del selenio.

ES 3 009 876 A1

## DESCRIPCIÓN

**Cepa *Lactiplantibacillus pentosus* CECT 30896**

### CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuadra en el campo de la Microbiología, en concreto, se refiere a la identificación de nuevas cepas de microorganismos para diversos usos, entre los que destacan su uso como probióticos, para la producción de compuestos funcionales, así como su uso en la biorremediación de suelos contaminados con metales.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La creciente aparición de microorganismos patógenos multirresistentes (MDR) en humanos, animales y plantas supone actualmente un reto sanitario global, planteando como objetivo limitar la propagación de estos patógenos y de sus genes antimicrobianos/virulentos por los diferentes ecosistemas. En este sentido, la promoción y el aumento del uso de probióticos, especialmente los de origen vegetal, brindan una buena oportunidad para optimizar y equilibrar la salud de las personas, los animales, las plantas y los ecosistemas.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Incluyen microorganismos de diferentes orígenes como pueden ser el suelo; plantas; alimentos; el tracto gastrointestinal, urogenital y vaginal; la leche materna y las heces de sujetos humanos. Corresponden a microorganismos de muy diversos grupos taxonómicos, que se encuentran presentes en el medio con diferente biodisponibilidad, y que presentan una gran variedad de actividades metabólicas y de mecanismos de acción distintos. La característica común que los agrupa es su capacidad de promover la salud, bien humana, animal o vegetal.

La caracterización funcional de los probióticos depende en gran medida de la cepa específica y de su origen. En este sentido, la genómica proporciona valiosos e interesantes conocimientos sobre los mecanismos y la funcionalidad de los probióticos, así como sobre sus funciones promotoras de la salud.

Entre los probióticos, las bacterias lácticas grampositivas (BAL) constituyen un grupo filogenéticamente heterogéneo y versátil que encierra un elevado potencial probiótico, especialmente las BAL de origen vegetal como *Lactiplantibacillus pentosus* y

*Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente conocidas como *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*) que son habitualmente aisladas de alimentos vegetales crudos y fermentados como las aceitunas de mesa, el pepino, el kimchi y los encurtidos, entre otros. En concreto, las aceitunas de mesa aloreñas, aceitunas verdes tradicionales fermentadas de forma natural con denominación de origen protegida (DOP), se consideran una fuente potencial de cepas probióticas de *L. pentosus*.

La versatilidad de *L. pentosus* y *L. plantarum* se debe a su diversidad genómica, plasticidad y funcionalidad ligadas a sus nichos ecológicos que les permiten adaptarse al tracto gastrointestinal y a las condiciones ambientales cambiantes (**Pérez-Díaz et al., 2021**).

Estudios previos han demostrado que cepas de *L. pentosus* presentan buena capacidad de crecimiento y supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas (pH ácido de 1,5, hasta 4% de sales biliares y 5 mM de nitrato), buena capacidad de autoagregación y coagregación con bacterias patógenas, adherencia a líneas celulares intestinales y vaginales, actividad antimicrobiana y fermentación de prebióticos y lactosa (**Pérez Montoro et al., 2016**). Cabe destacar que cepas de *L. pentosus* aisladas de aceituna de mesa aloreña como *L. pentosus* MP-10 y *L. pentosus* CF2-10N son especialmente interesantes por su diversidad genética y funcionalidad, que les dota de gran capacidad de adaptación (**Abriouel et al., 2022**). El análisis *in silico* y algunos ensayos *in vitro* de estas cepas confirmó su seguridad con respecto a su uso como complementos alimenticios probióticos.

Un área de investigación prometedora es la búsqueda de probióticos que puedan interactuar con diferentes hospedadores y cumplir diferentes funciones al mismo tiempo.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente memoria se describe una cepa probiótica con efecto dual como bacteria beneficiosa para los seres humanos y otros animales y también para las plantas, *L. pentosus* CF-6HA, aislada de aceitunas de mesa aloreñas, que ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de depósito CECT 30896.

Aunque esta cepa comparte varias características fenotípicas y genotípicas con las cepas *L. pentosus* MP-10 y CF2-10N, aisladas del mismo nicho ecológico, hay algunas características ligadas a la cepa que confiere a cada una de ellas un potencial probiótico y una funcionalidad diferenciados (**Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016**).

El estudio *in silico* de su genoma confirmó la inocuidad de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) por la ausencia de determinantes de virulencia y genes de resistencia adquirida a

antibióticos en su genoma, y permitió detectar una amplia variedad de genes codificantes de defensa y de adaptabilidad a diferentes estilos de vida, además de propiedades funcionales, que confieren a la cepa su robustez y potencial probiótico.

Se identificaron genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios interesantes como son:

- bacteriocinas; proteínas o toxinas peptídicas sintetizadas por bacterias que inhiben el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas a las que las producen. Algunas de las bacteriocinas identificadas son la pediocina, utilizada como conservante en productos vegetales y cárnicos, y con una elevada actividad contra especies de *Listeria*, y plantaricina Y, caracterizada por una fuerte actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes*;

- diversos exopolisacáridos;

- terpenos; que ejercen distintas funciones en las plantas, principalmente la protección frente a los insectos y animales herbívoros y la protección contra las temperaturas elevadas;

- sintasas de policétidos de tipo III (T3PKS), con importantes funciones biológicas y actividades farmacéuticas;

- policétidos (PKS); que participan en la biosíntesis de algunos compuestos lipídicos y varios metabolitos secundarios, y tienen funciones biológicas significativas e importantes actividades farmacéuticas;

- péptidos no ribosomales (NRP), con un rango extremadamente amplio de actividades biológicas y farmacológicas pudiendo actuar como toxinas, sideróforos o pigmentos, o presentar actividad antibiótica, citostática o inmunosupresora;

- productos híbridos péptido-policétido (PK+NRP), compuestos con actividad antimicrobiana y anticancerígena;

- péptidos modificados postraduccionalmente (RiPP);

- proteínas implicadas en la adhesión y otras funciones.

Es especialmente interesante el papel de esta cepa como agente probiótico para humanos y animales manteniendo o restaurando la microbiota natural del huésped. Además, tanto en humanos y animales como en plantas, puede reducir la propagación de patógenos y sus

genes de resistencia. Destaca su actividad antimicrobiana contra patógenos humanos y animales y plagas de plantas, como *Pseudomonas syringae* y *Verticillium dahliae*.

La cepa de la invención, puede utilizarse de forma aislada o en combinación con las ya citadas *L. pentosus* MP-10 y *L. pentosus* CF2-10N.

- 5 Por último, *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) presenta capacidad para biotransformar selenito en nanopartículas (SeNPs) por lo que puede ser utilizada en la biorremediación del selenio en medios naturales y como cultivo iniciador para el bioenriquecimiento de alimentos fermentados con selenio.

- 10 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención describe la cepa *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 30896, en adelante “cepa de la invención”.

La invención también se refiere al cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo aislado de dicha cepa, así como a la composición que comprende dicho cultivo, extracto o compuesto bioactivo.

- 15 Un **segundo aspecto** de la invención describe el uso de la cepa de la invención, el cultivo puro bacteriano y/o la composición que lo comprende como probiótico para humanos, mamíferos no humanos y plantas.

- 20 Un **tercer aspecto** de la invención describe el uso de la cepa de la invención, el cultivo puro bacteriano y/o la composición que lo comprende como agente antimicrobiano contra *Pseudomonas fragi*.

- 25 Preferiblemente, este agente antimicrobiano se utiliza además y de forma simultánea contra uno o más de los microorganismos que se seleccionan de la lista que consiste en: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*, *Pseudomonas syringae* y *Verticillium dahliae*.

- 30 Un **cuarto aspecto** de la invención es el uso del extracto o compuesto bioactivo aislado de la cepa de la invención y/o la composición que lo comprende como compuesto o composición antimicrobiana contra *Pseudomonas syringae*, *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y/ o *Candida albicans*.

Un **quinto aspecto** de la invención refiere al uso de de la cepa de la invención para la obtención de pediocina y Plantaricina Y.

Un **sexto aspecto** de la invención describe el uso de la cepa de la invención para la biorremediación de medios contaminados con selenio.

- 5 Un **séptimo aspecto** de la invención describe el uso de la cepa de la invención para el bioenriquecimiento de alimentos fermentados con selenio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Resultados de la predicción realizada con BlastKOALA de las categorías funcionales en el genoma de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896) y sus frecuencias.

**Figura 2.** Relaciones filogenéticas entre los genomas de *Lactiplantibacillus* spp. Se construyó un árbol filogenético con ND Tree 1.2 comparando la secuencia genómica de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) con las secuencias genómicas de otras *Lactiplantibacillus* spp. (*L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*) que se visualizó con el visor de árboles Tree Viewer del NCBI.

**Figura 3.** Organización de los grupos de genes biosintéticos de antimicrobianos predichos en el genoma de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896). **(A)** Clúster de genes de bacteriocina predicho utilizando el servidor web BAGEL4. **(B)** Clúster de genes T3PKS (Type III PKS, región 2.1) predicho utilizando la herramienta de software antiSMASH. Los genes están representados por flechas con diferentes colores que corresponden a diferentes funciones.

**Figura 4.** Micrografías electrónicas de barrido **(A, B, D y F)** y microanálisis EDX (microanálisis por dispersión de energías de rayos-X) **(C, E y G)** de células de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896) cultivadas en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) en ausencia **(A-C)** y presencia de 5 ppm de Se **(D-G)** a 37°C durante 24 h. Las

imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM, por *scanning electron microscope*) se tomaron a diferentes aumentos y las flechas indican los lugares de los espectros EDX.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

- 5 *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 30896), aislada originalmente de aceitunas de mesa verdes aloreñas fermentadas de forma natural.

- 10 *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se cultivó de forma rutinaria a 37°C en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) en condiciones aerobias (atmosféricas) durante 24-48 h. El agar MRS, gracias a su composición, permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias acidolácticas: la proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales; el monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos; el citrato de amonio  
15 actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Los patógenos bacterianos y fúngicos se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), excepto las cepas de *Pseudomonas syringae* que fueron suministradas por el Dr. J.A. Gutiérrez (Universidad de Málaga, España). Las condiciones de crecimiento de los patógenos se muestran en la **Tabla 1**.

- 20 **Tabla 1:** Cepas patógenas y condiciones de crecimiento utilizadas en este estudio.

Cepa	Medio de cultivo	Temperatura de crecimiento (°C)	Tiempo de crecimiento (h)
<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i> UMAF0158	TSB/TSA	25	24
<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i> UMAF0294	TSB/TSA	25	24
<i>Pseudomonas fragi</i> T81	TSB/TSA	25	24
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	TSB/TSA	37	24
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	TSB/TSA	37	24
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 4465	TSB/TSA	37	24
<i>Bacillus cereus</i> LWL1	TSB/TSA	37	24

<i>Bacillus cereus</i> CECT 148	TSB/TSA	37	24
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	TSB/TSA	37	24
<i>Enterococcus faecalis</i> FI 9190	TSB/TSA	37	24
<i>Escherichia coli</i> CECT 432	TSB/TSA	37	24
<i>Salmonella enterica</i> S62	TSB/TSA	37	24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT 1171	TSB/TSA	37	24
<i>Candida albicans</i> CECT 1001	MHB/MHA	26	24
<i>Verticillium dahliae</i> CECT 2694	PDA	28	72-120
<i>Verticillium dahliae</i> CECT 2884	PDA	28	72-120

MHB/MHA: Mueller Hinton Broth/Mueller Hinton Agar; TSB/TSA: Caldo de Triptona Soja / Agar de Triptona Soja; PDA: Agar de Dextrosa de Patata.

Todas las cepas se conservaron en glicerol al 20% a -80°C para su almacenamiento a largo plazo.

#### **Extracción de ADN, secuenciación del genoma completo, ensamblaje, anotación y análisis comparativo.**

Se secuenció y analizó la secuencia del genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) como herramienta diagnóstica inequívoca de su seguridad (de acuerdo con las indicaciones del panel de EFSA- Seguridad alimentaria y autorización de productos regulados y el panel de FEEDAP-Panel Productos o Sustancias Utilizadas en la Alimentación Animal, 2018).

Las células bacterianas de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), cultivadas durante 18 h a 37°C en condiciones aeróbicas en medio líquido, se cosecharon por centrifugación y se extrajo el ADN genómico total utilizando el kit PureGene core B, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, España) y según lo descrito por **Abriouel et al. (2022)**.

La preparación de librerías, la secuenciación del genoma, el ensamblaje y la anotación se llevaron a cabo según lo descrito por **Abriouel et al. (2022)**. Brevemente, el ADN genómico purificado se cortó en fragmentos de 10 a 20 kb utilizando el protocolo diseñado para la preparación de librerías de ADN del sistema PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA) y las bibliotecas resultantes (22-24 kb) se purificaron y secuenciaron según lo descrito por **Abriouel et al. (2022)**.



Se filtraron los datos de secuencia brutos (Q20) y se obtuvo un total de 150292 lecturas con una longitud media de 12167 pb. Las lecturas resultantes se ensamblaron *de novo* siguiendo el método Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP3.0) (versión de análisis SMRT: 2.3.0, parche nº 4) para Pacific Bioscience, tal y como describen **Abriouel et al. (2022)**. A continuación, se realizó la predicción de secuencias de ADN codificante (CDS), genes de ARNt, ARNr y ARNm y péptidos señal en las secuencias ensambladas siguiendo las metodologías detalladas por **Abriouel et al. (2022)**.

La anotación de secuencias se realizó mediante el programa BLAST2GO versión 4.1.9 (<https://www.blast2go.com/>) ahora parte de OmicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox/>) (**Conesa et al., 2005**), seguido de una anotación complementaria específica para dominios proteicos mediante el programa HMMER 3.1 (julio de 2017) (<http://hmmer.org/>) y la base de datos antes conocida como Pfam (actualmente InterPro) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (**Paysan-Lafosse et al., 2022**). Blast2GO es una herramienta de software bioinformático para la anotación funcional automática y de alto rendimiento de nuevos datos de secuencias (genes, proteínas). Utiliza el algoritmo BLAST para identificar secuencias similares y, a continuación, transfiere la anotación funcional existente de secuencias ya caracterizadas a la nueva secuencia. La información funcional se representa mediante la Ontología Genética (GO), una importante iniciativa bioinformática para unificar la representación de los atributos de genes y productos génicos en todas las especies. Por su parte, HMMER es un programa que se utiliza para buscar secuencias homólogas en bases de datos y para realizar alineaciones de secuencias. Implementa métodos que utilizan modelos probabilísticos denominados modelos de Markov ocultos de perfiles (HMM de perfiles). HMMER se utiliza a menudo junto con una base de datos de perfiles, como Pfam o Interpro. Pfam es una base de datos que reúne una amplia colección de alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos de Márkov que cubre buena parte de dominios proteicos y familias comunes. Para cada familia en Pfam se pueden ver alineamientos múltiples, revisar las arquitecturas y organización de los dominios proteicos, examinar la distribución de especies, seguir enlaces a otras bases de datos y ver estructuras proteicas conocidas.

Además, se realizó una voladura de genes contra Clusters of Orthologous Groups (COGs) de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) utilizando el servidor WebMGA (<http://weizhongli-lab.org/metagenomic-analysis>) (**Wu et al., 2011**) y la base de datos Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG). La base de datos COGs es un intento de clasificación filogenética de las proteínas codificadas en genomas completos. Cada COG incluye proteínas que se deduce que son ortólogas (homólogas evolutivas directas). La base de datos COG se actualiza

periódicamente a medida que se dispone de nuevos genomas. Los COGs pueden aplicarse a la tarea de anotación funcional de genomas recién secuenciados. Por su parte, WebMGA, es un servidor web personalizable para el análisis metagenómico rápido que incluye más de 20 herramientas de uso común agrupación de secuencias, control de calidad de lecturas en bruto, eliminación de artefactos de secuenciación y contaminaciones, análisis taxonómico, anotación funcional, etc. proporcionando un rápido análisis de datos metagenómicos. KEGG es una colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos.

La secuenciación, el ensamblaje y la anotación del genoma se realizaron en Biopolis-ADM (Valencia, España). Se realizó un análisis genómico comparativo utilizando las secuencias genómicas completas disponibles de *Lactiplantibacillus* spp. en la base de datos del NCBI y de *L. pentosus* CF-6HA (la cepa CECT 30896 objeto de la presente invención). En primer lugar, se exploró el parentesco filogenético entre *L. pentosus* CF2-10N (número de acceso ERR11550479), *L. pentosus* MP-10 (número de acceso GCA\_900092635.1), *L. pentosus* DSM 20314 (número de acceso GCA\_003641185.1), *L. pentosus* KCA1 (número de acceso GCA\_000271445.1) y *L. pentosus* CF-6HA (la cepa CECT 30896 objeto de la presente invención).

El análisis de la sintenia entre especies se realizó mediante alineación MAUVE (DNASTAR LASERGENE v17.4.2) (Darling et al., 2004). A continuación, se construyó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud: RAXML Randomized Axelerated Maximum Likelihood (Stamatakis, 2014) utilizando el alineamiento MAUVE (DNASTAR LASERGENE v17.4.2). La fiabilidad estadística del árbol se evaluó mediante un análisis bootstrap de 1000 réplicas. El bootstrap es un método de remuestreo que se utiliza para aproximar la distribución en el muestreo de un estadístico. Se usa frecuentemente para aproximar el sesgo o la varianza de un análisis estadístico, así como para construir intervalos de confianza o realizar contrastes de hipótesis sobre parámetros de interés.

Además, se utilizó NDtree 1.2 (Qian et al., 2003) para construir árboles filogenéticos a partir de archivos FASTQ Single-End o Pair-End de *Lactiplantibacillus* spp. (último acceso en marzo de 2023) (Kaas et al., 2014; Leekitcharoenphon et al., 2014) y el visor de árboles Tree Viewer del NCBI (Tree Viewer 1.19.4 disponible como aplicación del NCBI) para la visualización gráfica de árboles filogenéticos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/treeviewer/>).

La secuencia genómica completa de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) tiene un tamaño de 4.148.739 pb y un contenido estimado de mol% G+C del 45,7%. La secuencia genómica

contiene un único cromosoma circular de 3.764.590 pb y un contenido estimado de mol% G+C del 46,19% similar al de sus cepas homólogas como *L. pentosus* MP-10 (3.698.214 pb; contenido de GC del 46,32%) y *L. pentosus* CF2-10N (3.645.747 pb; contenido de GC del 46,42%) (**Abriouel et al., 2016, 2022**) y 6 plásmidos de 38,5-74,5 kb, a saber, pLPE6-1 (38.502 pb), pLPE6-2 (73.263 pb), pLPE6-3 (72.520 pb), pLPE6-4 (62.787 pb), pLPE6-5 (74.498 pb) y pLPE6-6 (61.672 pb) a diferencia de los cinco presentes en *L. pentosus* MP-10 (29-46,5 kb) y los cuatro en *L. pentosus* CF2-10N (58-120 kb) (**Abriouel et al., 2016, 2022**). Estos plásmidos pueden desempeñar un papel clave en el proceso de fermentación y adaptación al ecosistema (suelo, planta y salmuera), incluyendo la detoxificación de metales pesados (**Abriouel et al., 2019**).

Además, se han predicho 16 genes de ARNr y 84 secuencias codificantes de ARNt en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) utilizando RNAmmer (versión 1.2). El servidor RNAmmer 1.2 predice el ARN ribosómico 5s/8s, 16s/18s y 23s/28s en secuencias genómicas completas (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/RNAmmer-1.2/>).

En cuanto a la clasificación funcional, la secuencia genómica anotada reveló 3.960 marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales el 73,3% (2.902) se atribuyeron a una familia COG (Cluster of Orthologous Groups) y/o recibieron una descripción funcional. Además, el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) contiene 1.245 asignaciones de ortología KEGG (KO), principalmente enzimas (699 genes) y transportadores (212 genes). La frecuencia de anotaciones funcionales KEGG obtenida por BlastKOALA (herramienta KEGG; última actualización 15 de mayo de 2019; **Kanehisa et al., 2016**), que asignó aproximadamente la mitad (47.4%) de los genes a anotaciones KEGG correspondientes a procesamiento de información genética (248 genes), metabolismo de carbohidratos (244), señalización y procesamiento celular (214 genes), procesamiento de información ambiental (193 genes), procesamiento de información genética (165 genes), sin clasificar: metabolismo (113 genes), sin clasificar: procesamiento de la información genética (106 genes), metabolismo de aminoácidos (100 genes), metabolismo de nucleótidos (69 genes), metabolismo de cofactores y vitaminas (68 genes) y metabolismo (49 genes) entre otros (**Figura 1**).

El análisis genómico comparativo de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) y otras cepas de *L. pentosus* aisladas del mismo nicho ecológico (aceituna de mesa aloreña), como las cepas *L. pentosus* MP-10 y CF2-10N, *L. pentosus* DSM 20314 (cepa tipo) aislada de ensilado de maíz y *L. pentosus* KCA1 aislada del tracto vaginal, se llevó a cabo mediante la alineación de secuencias utilizando el algoritmo MAUVE. El enlace de sintenia de *L. pentosus* CF-6HA

(CECT 30896) frente a otras cepas de *L. pentosus* reveló la presencia de bloques sinténicos altamente conservados, aunque se produjeron inversiones y reordenamientos entre todas las cepas de *L. pentosus* incluso entre las aisladas del mismo nicho ecológico (aceituna de mesa aloreña; cepas de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), MP-10 y CF2-10N). Para resaltar esta relación, se construyó un árbol del genoma central de máxima verosimilitud (RaxML) y los resultados revelaron que *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) compartía en general un 97% de identidad (distancia evolutiva "ED", ED=0,02) con las cepas de *L. pentosus* MP-10 (97,62%), CF2-10N (97,62%) y *L. pentosus* DSM 20314 (97,53%), mientras que *L. pentosus* KCA1 sólo presentaba un 92,16% de identidad (ED=0,08).

- 10 El análisis filogenético realizado con la herramienta NDtree, basada en el número de diferencias nucleotídicas entre cepas, y el visor de árboles del NCBI mostró una clara distinción entre las 48 cepas de *Lactiplantibacillus* spp. agrupadas en cepas pertenecientes a la misma especie (**Figura 2**).

#### 15 **Análisis genómico de aspectos de seguridad y resistencia antimicrobiana de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896).**

- Además de la anotación global mediante el programa BLAST2GO, también se examinaron los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) utilizando el software Resistance Gene Identifier (RGI 6.0.1) como parte de las herramientas CARD "The Comprehensive Antibiotic Resistance Database" (<https://card.mcmaster.ca/>) (Alcock et al., 2023), empleando los modelos de detección de AMR (resistencia a los antimicrobianos) curados de CARD (último acceso en febrero de 2023). RGI se utiliza para predecir resistomas a partir de datos de proteínas o nucleótidos basados en modelos de homología y sustituciones de un nucleótido (SNP). CARD es una base de datos que recoge y organiza información de referencia sobre genes, proteínas y fenotipos de resistencia a los antimicrobianos. La base de datos abarca todo tipo de clases de fármacos y mecanismos de resistencia y estructura sus datos basándose en una ontología. Permite encontrar posibles genes de resistencia a los antibióticos en genomas recién secuenciados.

- La predicción mediante la anotación BLAST2GO reveló la presencia de varios mecanismos de resistencia antimicrobiana no específicos que dependen de transportadores de flujo o proteínas transmembrana implicadas en la respuesta a fármacos, incluidos los antibióticos, como el transportador multidroga MFS (codificado por el gen *KCA1\_0967*); proteína de la familia TIGR00374 (codificada por el gen *mprF*); proteína transportadora de múltiples fármacos (codificada por los genes *FD24\_GL001667*, *LPENT\_02485* y *LPE\_01285*);

proteína efluente de cationes (codificada por el gen *FD24\_GL002035*); transportador ABC, proteína de unión a ATP y permeasa (codificada por los genes *LPENT\_00563*, *LPENT\_02775*, *LPENT\_02344* y *LPENT\_02438*); permeasa del transportador de casetes de unión a ATP Superfamilia ABC Familia MutG protección lantibiótica (codificada por el gen *LPENT\_00532*); transportador de casetes de unión a ATP Superfamilia ABC, proteína ABC (codificada por el gen *LPE\_00726*); proteína de unión a ATP del transportador ABC (codificada por *LPENT\_00338*, *FD24\_GL000723*, *LPENT\_02848*, *N692\_09400*, *LPE\_02094*, *LPE\_00791*, *FD24\_GL003445*, *FD24\_GL002415*, *LPENT\_02562*, *LPE\_01544*, *LPENT\_02495*, *KCA1\_2339*, *LPENT\_02440*, *gen\_2043*, *LPENT\_02320*, *gen\_2108*, *LPE\_01165*, *FD24\_GL000926*, *FC82\_GL001371*, *FD47\_GL001009*, *LPENT\_01461* y *FD24\_GL002891* genes); proteína permeasa del transportador ABC (codificada por los genes *FD24\_GL000827*, *LPENT\_02885*, *FD24\_GL003057* y *LPE\_01349*); proteína de unión a ATP del transportador ABC de múltiples fármacos (codificada por el *gen\_1153*); permeasa del transportador ABC de múltiples fármacos (codificada por el gen *LPE\_02342*); transportador putativo ABC, proteína de unión a ATP (codificada por el gen *LPENT\_03065*); proteína integral de membrana (codificada por los genes *LPENT\_02708*, *LPENT\_02080* y *LPENT\_01044*); sistema de transporte multidroga de tipo ABC, componente ATPasa y permeasa (codificado por el gen *LPENT\_02699*); transportador (codificado por el gen *FD24\_GL003458*); bacitracin transportador ABC de proteína de unión a ATP (codificado por el gen *FD24\_GL002522*); DMT transportador de superfamilia de metabolitos (codificado por el gen *LPENT\_02520*); proteína hipotética (codificada por los genes *gene\_1979* y *gene\_2937*); proteína de membrana (codificada por el gen *KCA1\_2377*); EamA familia de transportadores (codificado por el gen *LPE\_02249*); transportador ABC multicompuesto, de unión a ATP y permeasa de proteína (codificado por el gen *LPENT\_02375*); transportador ABC (codificado por el gen *LPE\_03175*); transportador SMR de compuestos eflujo de amonio cuaternario de la familia QacE (codificado por el gen *FD24\_GL003284*); MULTISPECIES: amonio cuaternario (codificado por el gen *N692\_04340*); proteína transportadora (codificado por el gen *LPE\_01191*); MULTISPECIES: undecaprenil-difosfatasa (codificada por el gen *uppP*); proteína de la familia VanZ (codificada por el gen *LPE\_02604*); transportador de la familia EamA/RhaT (codificado por el gen *KCA1\_0065*); transportador de eflujo de la familia MATE (codificado por el gen *LPE\_00986*); Superfamilia ABC transportador de casetes de unión a ATP, proteína ABC (codificado por el gen *LPENT\_01629*); relacionado con el transportador ABC (codificado por los genes *LPENT\_01583* y *LPENT\_01583*); MULTISPECIES: transportador ABC proteína de unión a ATP (codificado por el gen *KCA1\_0270*); transportador ABC, componentes de ATPasa y permeasa (codificado por el gen *LPENT\_01451*); transportador de la familia EamA

(codificado por el gen *LPENT\_01209*); proteína transportadora de múltiples fármacos, superfamilia del facilitador principal (MSF) (codificado por el gen *KCA1\_0714*); groel proteína supresora suge (codificado por el gen *FD24\_GL000282*); y proteína de superficie celular (codificado por los genes *gene\_3573* y *gene\_3843*). Todos los genes están localizados cromosómicamente excepto el *gen\_3843* que codifica para la proteína de la superficie celular en el plásmido pLPE6-1.

Mediante RGI sólo se detectó una coincidencia estricta, que se definió dentro de los límites de similitud de los modelos individuales de detección de AMR y representaba homólogos probables de genes AMR según **Alcock et al. (2023)**. En este sentido, la RGI reveló que el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) contenía un gen *vanY* en un clúster *vanB* que confería resistencia a los glicopéptidos (100% de identidad con el gen *vanZ* de otras cepas de *L. pentosus* que estaba localizado en el cromosoma) y varios mecanismos de resistencia antimicrobiana no específicos que dependen de transportadores de flujo o proteínas transmembrana implicadas en la respuesta a fármacos, incluidos los antibióticos.

Por otro lado, la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos adquiridos/mutaciones cromosómicas mediadoras de la resistencia a los antimicrobianos en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se realizó utilizando el software ResFinder, un recurso abierto en línea para la identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos en datos de secuenciación de nueva generación y la predicción de fenotipos a partir de genotipos (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) versión 4.1 (**Bortolaia et al., 2020; Camacho et al., 2009; Zankari et al., 2020**), con un umbral de % identidad (ID) seleccionado del 90% y una longitud mínima seleccionada del 60% (último acceso en febrero de 2023).

ResFinder no detectó ningún gen de resistencia antimicrobiana adquirido por transferencia horizontal de genes para aminoglucósido, betalactámico, colistina, desinfectante, fluoroquinolona, fosfomicina ácido fusídico, glucopéptido, serie MLS (macrólido, lincosamida y estreptogramina B), nitroimidazol, oxazolidinona, fenicol, ácido pseudomónico, rifampicina, sulfonamida, tetraciclina y trimetoprima.

El cribado de los factores de virulencia (FV) se llevó a cabo mediante la anotación de las regiones de codificación (CDS) predichos utilizando BLAST recíproco contra la base de datos de Factores de Virulencia de Patógenos Bacterianos (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) considerando los aciertos como positivos cuando los resultados de BLAST recíproco eran similares y utilizando un corte de similitud de secuencia del 80% (**Liu et al., 2019**).

No se identificaron factores de virulencia (FV) conocidos, incluidas toxinas.

Estos datos confirman el estado de seguridad de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896). También confirman que una resistencia antimicrobiana intrínseca no es transferible horizontalmente, como se solicita en las cepas probióticas, aunque contribuye a la defensa y la aptitud frente a los fármacos (Tóth et al., 2021).

### **Análisis *in silico* de seguridad y resistencia antimicrobiana de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896)**

Una vez confirmada la inocuidad de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), se exploró la secuencia del genoma en busca de determinantes implicados en la robustez y la funcionalidad que permiten a esta cepa soportar diversas tensiones en su hábitat, durante la fermentación y también en el tracto gastrointestinal.

#### Análisis del mobiloma

El mobiloma (conjunto de elementos genéticos móviles) de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se analizó en relación con la presencia de plásmidos conjugativos, transposasas, transposones, secuencias de inserción (IS) y genes codificantes de profagos en la secuencia genómica anotada, tal y como detallan Abriouel et al. (2022). Para ello, la búsqueda de secuencias de inserción (IS) se realizó utilizando la herramienta de búsqueda ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>) una base de datos dedicada a las secuencias de inserción (IS) bacterianas, que es el repositorio de las IS que se indexa junto su secuencia de ADN y marcos de lectura abiertos o posibles secuencias codificantes, la secuencia de los extremos del elemento y los sitios diana, su origen y distribución, etc. (Zhang et al., 2004).

Con respecto a los elementos IS, se detectaron 17 CDS en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) pertenecientes a nueve familias y distribuidos en 12 bacterias diferentes, con IS3 como la familia más originaria de *Acinetobacter baumannii*/A. *lwoffii*.

Para el análisis de profagos dentro del genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se utilizó la versión de PHASTER (<https://phaster.ca/>; PHAge Search Tool Enhanced Release, última actualización de marzo de 2016; correspondiente a la base de datos actualizada de profagos/virus PHAST "PHAge Search Tool"). PHASTER permite la identificación y anotación de secuencias de profagos en genomas y plásmidos bacterianos (Arndt et al., 2016; Zhou et al., 2011).

Además, se obtuvo información complementaria de la secuencia genómica anotada para el profago y el transposón/transposasa.

En cuanto a las transposasas, el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) albergaba 98 transposasas, de las cuales 31 transposasas putativas y 67 transposasas pertenecen a 10 familias IS (2 IS3, 1 IS4/IS5, 8 IS5, 23 IS30, 25 ISL3, 1 IS200/IS605, 2 IS256, 1 IS1380, 2 familia Mutator, 2 superfamilia mule). Las transposasas de las familias ISL3 e IS30 fueron las más prevalentes. Estas transposasas estaban distribuidas por igual tanto en cromosomas (50 CDS) como en plásmidos (48 CDS en pLPE6-3, pLPE6-4, pLPE6-5 y pLPE6-6), principalmente en pLPE6-6, y aparecían como copias múltiples.

Los resultados de la búsqueda de profagos muestran la presencia de 13 regiones de fagos templados dentro del genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) utilizando la herramienta bioinformática de PHASTER. Siete de ellas estaban intactas (Regiones 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 13; puntuación > 90), una era dudosa (Región 12; puntuación 70±90) y las otras cinco estaban incompletas (Regiones 4, 5, 6, 10 y 11; puntuación < 70). Las regiones profágicas intactas de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) estaban relacionadas principalmente con Lactob\_Sha1\_NC\_019489 (Regiones 1, 2, 7, 8 y 9; contenido de GC, 30,30-42,12%; longitud de la región, 27,1-46 kb), mientras que las regiones profágicas incompletas estaban asociadas con diferentes fagos como Lactob\_Sha1\_NC\_019489 (Región 6, 17.2 Kb), Lactob\_phig1e\_NC\_004305 (Región 4, 15,7 Kb), Erwini\_pEp\_SNUABM\_01\_NC\_048807 (Región 10, 12 Kb), Photob\_PDCC\_1\_NC\_048821 (Región 5, 7,6 Kb) y Paenib\_Tripp\_NC\_028930 (Región 11, 5,5 Kb). Determinamos que Lactob\_Sha\_1 mostraba la mayor coincidencia proteica entre los profagos identificados. En cuanto a las regiones cuestionables de los profagos, solo identificamos una que mostraba similitud con Staphy\_SPbeta\_like\_NC\_029119 (Region 12, 4.9 Kb). Sólo cinco regiones profágicas tienen secuencias attL/attR e integrasa, como las regiones 1, 2, 4, 6 y 7 localizadas en el cromosoma bacteriano, e identificadas en regiones intactas e incompletas.

### CRISPR

Por otra parte, los genes codificantes CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) se examinaron en la secuencia genómica anotada de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) y la localización de las dianas de los ARN CRISPR se determinó utilizando el programa CRISPRDetect versión 2.4 ([http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict\\_crispr\\_array.html](http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html)) (Biswas et al., 2016).



En el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se identificaron los sistemas CRISPR I y II (ambos genes característicos de los sistemas tipo I "cas3" y tipo II "cas9") como mecanismos de defensa frente a elementos genéticos móviles (es decir, virus, elementos transponibles y plásmidos conjugativos. En este sentido, se detectaron 12 genes, cinco de ellos exclusivos de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896). Estos son responsables de la síntesis de proteínas asociadas a CRISPR, y están organizados en dos operones (CRISPR-I y CRISPR-II). En cuanto a los conjuntos CRISPR (CR), identificamos tres conjuntos CRISPR incuestionables mediante el programa CRISPRDetect, localizados de forma dispersa en el cromosoma (678102-2943655).

Con respecto a la adaptación del estilo de vida de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) a diferentes estreses, la exploración *in silico* de la secuencia del genoma muestra la frecuente diversificación genética inferida por el mobiloma (17 elementos ISI, 98 transposasas, 13 regiones de fagos templados) y elementos CRISPR (sistemas CRISPR I y II). El elevado número de elementos genéticos móviles en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) es comparable al de otras cepas de *L. pentosus* también aisladas de aceitunas de mesa alcoreñas, es decir, *L. pentosus* MP-10 (29 transposasas, 5 regiones de fagos templados) y *L. pentosus* CF2-10N (66 transposasas, 45 elementos IS y 8 regiones de fagos templados) (Abriouel et al., 2012, 2017, 2022). Sin embargo, el número superaba con creces a otras cepas de *L. pentosus* aisladas de otros nichos ecológicos, como *L. pentosus* IG1 (fermentaciones de aceitunas verdes al estilo español; 5 genes que codifican transposasas), *L. pentosus* KCA1 (vagina; 25 genes que codifican transposasas) y *L. pentosus* DSM 20314 (ensilado de maíz; 14 genes que codifican transposasas) (Abriouel et al., 2017). Estas características indicaron que las cepas de *L. pentosus* aisladas de aceituna de mesa alcoreña poseen un gran número de elementos, específicos de la cepa en cuestión, con función adaptativa que juegan un papel importante en su hábitat mediante reordenamientos cromosómicos, con especial atención a *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896).

Además, otras ventajas selectivas para la supervivencia de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) son conferidas por 13 regiones de profagos detectadas en su genoma, siete de las cuales estaban intactas y son principalmente profagos de lactobacilos, aunque los otros profagos dudosos e incompletos estaban relacionados con otras bacterias (*Erwinia*, *Photobacterium*, *Paenibacillus* o *Staphylococcus*). De hecho, *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) posee la maquinaria capaz de hacer frente al riesgo de infección por fagos en diferentes ecosistemas como algunos lactobacilos (Sun et al., 2015).

El sistema CRISPR (CRISPR-I y CRISPR-II) como otro mecanismo de defensa también se detectó en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896). En particular, se detectaron 12 genes que proporcionan protección contra los elementos genéticos móviles de forma similar a *L. pentosus* CF2-10N y *L. pentosus* MP-10. Sin embargo, tanto los genes como su organización eran específicos de la cepa, lo que sugiere que la adaptación y la aptitud pueden depender de la cepa específica (Abriouel et al., 2017, 2022).

### Funcionalidades probióticas de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896)

#### Análisis *in silico* de la actividad antimicrobiana

Se analizó la secuencia genómica anotada de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) para detectar la presencia de genes que codifican proteínas/péptidos antimicrobianos y se examinaron los genes que codifican la producción de bacteriocinas utilizando el servidor web BAGEL 4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>), que permite extraer ADN (meta)genómico bacteriano en busca de bacteriocinas y péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente (RiPPs), al contar con bases de datos y un BLAST contra las bases de datos de péptidos principales (van Heel et al., 2018).

A continuación, cada miembro de los grupos de genes predichos se confirmó mediante Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas, comparando secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calculando la significación estadística.

Además, se utilizó antiSMASH versión 7.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) (Blin et al., 2021) para buscar clústeres de genes de metabolitos secundarios. antiSMASH permite la rápida identificación, anotación y análisis de grupos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en genomas de bacterias. Se integra y cruza con un gran número de herramientas de análisis *in silico* de metabolitos secundarios que se han publicado anteriormente.

Tanto BAGEL como antiSMASH se utilizaron para la detección de marcos de lectura abiertos (ORF) implicados en la producción de compuestos antimicrobianos.

Los RiPPs y las bacteriocinas (no modificadas) se cotejaron en el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) con la base de datos BAGEL (BAGEL4). Los resultados obtenidos mostraron el clúster de genes responsable de la biosíntesis de bacteriocinas y consta de 26 genes con una longitud total de aproximadamente 20 kb localizados en el cromosoma (Figura 3A). En este clúster de genes, sólo se detectó un gen de bacteriocina biosintética

que codifica la pediocina, bacteriocina de clase IIa (péptido central, pediocina; localización 2.511.611-2.511.967 pb) (**Figura 3A**), sin embargo no se identificaron genes de inmunidad/transporte de pediocina aunque sí se detectaron varios genes que codifican otros transportadores o genes de resistencia como el transportador MFS, la ATPasa transportadora de cadmio de la familia P o el regulador transcripcional de la familia MerR.

Además, el análisis *in silico* del genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) mediante el programa BLAST2GO mostró la presencia de un gen putativo (*LPENT\_01393*) que codifica la biosíntesis de Plantaricina Y, bacteriocina de clase IIId (PlnY; localización 3.248.967-3.249.260 pb).

Por otro lado, el análisis del genoma mediante la herramienta de software antiSMASH mostró la presencia de genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano relacionados con la T3PKS (sintasa de policétidos de tipo III) (**Figura 3B**). En este sentido, una región 2.1 (localización:1.169.377-1.210.546 nt): T3PKS fue identificada dentro del cromosoma. Este clúster estaba representado por un gen biosintético central (*ctg2\_1084*) que codificaba la hidroximetilglutaril-CoA sintasa; seis genes biosintéticos adicionales (*ctg2\_1067*, *ctg2\_1074*, *ctg2\_1076*, *ctg2\_1079*, *ctg2\_1087* y *ctg2\_1105*) que codificaban la peptidasa\_M50, la SMCOG1115:hidrolasa de la superfamilia HAD, la SMCOG1072 deshidrogenasa, SMCOG1141:aciltransferasa, SMCOG1123: poliprenol-monofosfomanosa sintasa ppm1 y SMCOG1001:deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR, respectivamente; un gen transportador (*ctg2\_1100*) que codifica un transportador MFS y otros genes (**Figura 3B**). Los resultados de AntiSMASH blastp indican el compuesto más cercano de la base de datos MiBIG y mostraron las mejores coincidencias correspondientes a terpeno, sintasa de policétidos de tipo III (T3PKS), policétidos (PKS), péptido no ribosomal (NRP), los productos híbridos péptido-policétido (PK+NRP), péptido modificado postraduccionalmente (RiPP) y otros, siendo NRP y PKS las clases más abundantes de grupos de genes biosintéticos (**Figura 3B**).

El interés de estos metabolitos secundarios, incluyendo bacteriocinas y exopolisacáridos, se basó en su diversa estructura y bioactividades específicas que valorizan el prometedor potencial probiótico de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) como fuente de compuestos antimicrobianos y bioactivos.

Cabe destacar la capacidad de algunas bacterias lácticas para producir una amplia gama de metabolitos secundarios beneficiosos como bacteriocinas, diacetilo, acetoina, exopolisacáridos, vitaminas (grupo B), dipéptidos cíclicos, ácido mevalónico,

mevalonolactona y butanediol, entre otros, con actividad antimicrobiana, antioxidante, interacción con el hospedero, inmunomodulación, etc. (Crowley et al., 2013; Mora-Villalobos et al., 2020). Sin embargo, sólo unas pocas cepas son capaces de producir metabolitos secundarios, mientras que sólo algunos de ellos son secretados externamente o se producen en baja concentración.

#### Análisis *in vitro* de la actividad antimicrobiana

Para complementar los resultados obtenidos mediante el análisis *in silico*, se examinó *in vitro* la actividad antimicrobiana frente a los patógenos enumerados en la **Tabla 1**, incluidos los fitopatógenos (responsables de la peste). Se evaluó así la expresión de genes que codifican bacteriocinas en *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), para confirmar la presencia de bacteriocinas en el sobrenadante libre de células y su actividad antimicrobiana frente a varios patógenos.

Para ello, se extendieron 10 µl de un cultivo de una noche de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en agar MRS y se incubaron durante 24 h; a continuación, se cubrieron las placas con Agar blando de Infusión de Corazón-Cerebro tamponado (SF-BHA; a pH 7,0, 0,1 M) inoculado con cepas indicadoras (**Tabla 1**) cultivadas durante 24 h.

Además, se probó la actividad antimicrobiana del sobrenadante producido por *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en caldo MRS utilizando la difusión en pocillos de agar como se ha descrito anteriormente. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo el diámetro de las zonas de inhibición desde el borde del pocillo. En el caso de *V. dahliae*, la actividad antifúngica de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se realizó en placas de agar de dextrosa de patata (PDA) según **Mohamad et al. (2018)** evaluando la inhibición del crecimiento mediante la siguiente fórmula:  $100 \times [C-T]/C$ , donde, C es el crecimiento radial del hongo en el control y T es el mismo en el cultivo dual (**Aeron et al., 2011**).

Los resultados de la actividad antimicrobiana de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) frente a fitopatógenos fueron prometedores (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Actividad antimicrobiana de *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA (CECT 30896) contra fitopatógenos y otros patógenos.

Cepa indicadora	Actividad antimicrobiana de <i>L. pentosus</i> (CECT 30896) contra cepa indicadora (zona de inhibición)	
	Bacteria	Sobrenadante libre de células
<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i> UMAF0158	+	12 mm
<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i> UMAF0291	+	12 mm
<i>Pseudomonas fragi</i> T81	+++	12 mm
<i>Listeria innocua</i> CECT	+++	débil
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	+++	10 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 4465	+++	10 mm
<i>Bacillus cereus</i> LWL1	+++	14 mm
<i>Bacillus cereus</i> CECT 148	+++	11 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	+++	débil
<i>Enterococcus faecalis</i> FI 9190	++	débil
<i>Escherichia coli</i> CECT 432	+++	10 mm
<i>Salmonella enterica</i> S62	+++	débil
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT 1171	-	-
<i>Candida albicans</i> CECT 1001	+	9 mm
<i>Verticillium dahliae</i> CECT 2694	36%*	8%*
<i>Verticillium dahliae</i> CECT 2884	9%*	0%*

(+), el diámetro de la zona de inhibición desde el borde de crecimiento es < 10 mm. (++) , el diámetro de la zona de inhibición desde el borde de crecimiento está en el rango de 10-13 mm. (+++), el diámetro de la zona de inhibición desde el borde de crecimiento es > 14 mm.

\* % de inhibición del crecimiento según **Aeron et al. (2011)**.

- 5 En este sentido, las cepas *P. syringae* subsp. *syringae* UMAF0291 y UMAF0158 y las cepas *Verticillium dahliae* CECT 2694 y CECT 2884 fueron sensibles a las sustancias antimicrobianas producidas *ex-situ* por *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), ya que el sobrenadante de esta cepa fue activo frente a fitopatógenos bacterianos y fúngicos. En la cepa CECT 2884 de *Verticillium dahliae* no se observa este efecto posiblemente porque
- 10 requerirá mayores cantidades del antimicrobiano que está presente en el sobrenadante que la cepa CECT 2694 de esta misma especie.

Además, otros patógenos también fueron sensibles a las sustancias antimicrobianas producidas por *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896), como la bacteria de la descomposición *P. fragi* T81 y otros patógenos humanos/animales, es decir, cepas de *Bacillus cereus*, cepas de *Staphylococcus aureus*, cepas de *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Candida albicans*, sin embargo no se detectó actividad contra *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1171. Aunque *P. fragi* no es un patógeno humano representa un reservorio de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos a otras bacterias patógenas incrementando así su peligrosidad. Por tanto, se trata de un agente de alteración de la cadena alimentaria y también de un reservorio de genes de resistencia a antibióticos según Elbehiry et al. (2022).

Esta actividad antimicrobiana permite a esta cepa superar con éxito a especies microbianas indeseables y patógenas en su hábitat y también en el intestino.

#### Búsqueda de otras propiedades probióticas

Para determinar las características probióticas relacionadas con las adhesinas, los exopolisacáridos, las enzimas, los antioxidantes y el metabolismo del selenio, se examinó la secuencia genómica anotada de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en busca de los genes codificantes correspondientes.

El análisis *in silico* de la secuencia genómica anotada de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) reveló la presencia de un arsenal de genes que codifican proteínas relacionadas con funciones probióticas.

Algunas de estas proteínas son multifuncionales, también participan en otras funciones como la supervivencia, la exclusión competitiva del patógeno a las células epiteliales, la respuesta al estrés, el eflujo de fármacos y otros.

Aunque **Abriouel et al. (2016, 2017, 2022)** informaron de que las cepas *L. pentosus* MP-10 y CF2-10N poseen en su genoma varias proteínas pluriempleadas responsables de su funcionalidad, no se trata de las mismas proteínas y en caso los casos en los que se trata de la misma proteína, las funciones desempeñadas son distintas en cada cepa y en función de las condiciones del entorno.

En cuanto a las proteínas implicadas en la adhesión, se identificaron 20 genes que codifican proteínas de adhesión, 7 proteínas de la superficie celular; 4 proteínas de unión a mucosa; 1 proteína de adhesión; 1 transportador ABC de metales permeasa; 1 transportador ABC de manganeso proteína de unión a sustrato; 1 transportador ABC, proteína de unión a ATP y

permeasa; 1 transportador de casetes de unión a ATP de la superfamilia ABC, proteína de unión; 1 transportador ABC de metales proteína de unión a sustrato; 1 beta-fructosidasa y 2 proteínas hipotéticas.

En cuanto a la biosíntesis de exopolisacáridos, se asoció a cuatro genes codificantes.

- 5 En cuanto a las enzimas implicadas en las propiedades probióticas clave (como las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas y translocasas) se identificó la presencia de 1 gen codificante de hidrolasa de sales biliares, 2 genes codificantes de tanasa, 1 gen codificante de alfa-amilasa, 1 gen codificante de amilopululanasa, 1 gen codificante de catalasa y 23 genes codificantes diferentes de lactasa  
10 (beta-galactosidasa o beta-glucosidasa).

- Con referencia a los antioxidantes, se identificaron 11 genes codificantes para la biosíntesis del glutatión, 4 genes codificantes para la 4-carboximeuconolactona descarboxilasa, 1 gen codificante para la 2-Cys peroxiredoxina, 1 gen codificante para la NAD(FAD)-deshidrogenasa dependiente, 1 gen codificante para la peroxidasa putativa dependiente del  
15 hierro y 1 gen codificante para la Halo peroxidasa.

Por último, se examinó el genoma de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en busca de genes implicados en el metabolismo del selenio y se identificaron 4 genes codificantes: serina-ARNt ligasa, homocisteína metiltransferasa, cisteína sulfinato desulfinaasa y MULTISPECIES: serina-ARNt ligasa.

## 20 Análisis *in vitro* de capacidad para crecer y biotransformar selenito

Además, se probó *in vitro* la capacidad para crecer y biotransformar selenito ( $\text{Na}_2 \text{SeO}_3$ ) de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) midiendo espectrofotométricamente el Se residual en el sobrenadante tras 24 h de crecimiento en caldo MRS suplementado con Se.

- Las células se cultivaron en 5 ml de caldo MRS o MRS-Se suplementado con 20 ppm de Se  
25 (como  $\text{Na}_2 \text{SeO}_3$ ) a 37°C durante 24 h tal y como describen **Martínez et al. (2020)**. La concentración de  $\text{SeO}_3^{2-}$  remanente en los sobrenadantes se determinó espectrofotométricamente mediante el método modificado de Brown y Watkinson (**Kessi et al., 1999**) utilizando un ensayo de microplaca (**Martínez et al., 2020**). Los resultados obtenidos mostraron su capacidad de crecimiento produciendo una eliminación del 100% de  
30 Se ya que no se registró Se detectable.

Por otro lado, se examinó la capacidad de biosorción de selenio sobre la superficie de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en forma de nanopartículas (SeNPs) mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) acoplado a espectroscopia de dispersión de energía de rayos X en presencia y ausencia de Se en caldo de cultivo.

- 5 Para ello, *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) se cultivó en caldo MRS o MRS-Se suplementado con 5 ppm de Se (como  $\text{Na}_2 \text{SeO}_3$ ) a 37°C durante 24 h (**Martínez et al., 2020**). Una gota del sedimento bacteriano se dispuso sobre los stubs de muestras SEM (ANAME, España), se secó y después se deshidrató en una serie de soluciones de etanol al 20, 40, 60, 80 y 100% (15 min cada una) antes de la suspensión en acetona durante 1 h.
- 10 Después de esto, los stubs se sometieron a un secado en punto crítico antes de la obtención de imágenes por SEM (FESEM, MERLIN de Carl Zeiss, Oxford) equipado con un analizador de rayos X de energía dispersiva (EDX). Se visualizó y confirmó la presencia de Se en la superficie celular de *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) en forma de nanopartículas blancas (SeNPs) (**Figura 4**). Además, no se observó ninguna transformación de la forma celular tras
- 15 el crecimiento en presencia de Se y la posterior formación de SeNPs.

Esta cepa tolera el selenio en el caldo de cultivo y metaboliza el selenio de acuerdo con la presencia de genes codificantes relevantes (serina-ARNt ligasa, homocisteína metiltransferasa, cisteína sulfinato desulfinaasa y MULTISPECIES: serina-ARNt ligasa) para proteínas capaces de biotransformar y reducir el selenito tóxico ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) en selenio

20 elemental ( $\text{Se}^0$ ). Así pues, la cepa puede eliminar completamente el Se del sobrenadante del cultivo.

Otros lactobacilos pertenecientes a otras especies aisladas de plantas o de otros alimentos fermentados (chucrut) fueron capaces de reducir el selenito, como *L. plantarum* CRL 2030 (**Martínez et al., 2020**) y *L. casei* ATCC 393 (**Qiao et al., 2023**).

- 25 Esta importante y eficaz aproximación para la biorremediación de la contaminación por selenio mediante *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) presenta un atractivo adicional que podría ser explotado en alimentación, agricultura y medio ambiente donde la acumulación de este micronutriente altamente soluble y biodisponible puede suponer un gran reto. Por otra parte, como cultivo iniciador, *L. pentosus* CF-6HA (CECT 30896) también podría utilizarse
- 30 para el bioenriquecimiento de alimentos fermentados con selenio.



## Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos) para determinar las medias y las desviaciones estándar. El análisis bioinformático se realizó con el paquete R.

## Referencias

- 5 Abriouel et al., **2012**. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. Food Microbiol. 32, 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.006>
- 10 Abriouel et al., **2016**. Complete genome sequence of a potential probiotic, *Lactobacillus pentosus* MP-10, isolated from fermented Aloreña table olives. Genome Announc. 4, e00854–e00816. <https://doi.org/10.1128/genomea.00854-16>
- Abriouel et al., **2017**. Insight into potential probiotic markers predicted in *Lactobacillus pentosus* MP-10 genome sequence. Front. Microbiol. 8, 891. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00891>
- 15 Abriouel et al. **2019**. New insights into the role of plasmids from probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 in Aloreña table olive brine fermentation. Sci. Rep. 9, 10938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47384-1>
- Abriouel et al., **2022**. *In silico* genomic analysis of the potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* CF2-10N reveals promising beneficial effects with health promoting properties. Front. Microbiol. 13, 989824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.989824>
- 20 Aeron et al., **2011**. Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). Eur. J. Plant Pathol. 131, 81–93. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9789-z>
- Alcock et al., **2023**. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Nucleic Acids Res. 51(D1), D690-D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- 25 Arndt et al., **2016**. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 44, W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Darling et al. **2004**. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004 Jul;14(7):1394-403. doi: 10.1101/gr.2289704
- 30 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.004>

- Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L., Langella, P., Martín, R., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F. N., 2020. Probiotic Properties of *Lactobacillus* strains isolated from Table Olive Biofilms. *Probiotics and Antimicrob. Proteins*, 12(3), 1071-1082. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09604-y>
- 5 Biswas et al., **2016**. CRISPR Detect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genom.* 17, 356. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2627-0>
- Blin et al., **2021**. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* 49(W1), W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bortolaia et al., **2020**. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- 10 Camacho et al., **2009**. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Chen, Y. S., Wang, Y. C., Chow, Y. S., Yanagida, F., Liao, C. C., Chiu, C. M., 2014. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by
- 15 *Lactobacillus plantarum* 510. *Arch. Microbiol.* 196(3), 193-9. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0958-2>
- Conesa et al., **2005**. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinform.* 21, 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- 20 Crowley et al., **2013**. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>
- Elbehiry et al., **2022**. Pseudomonas species prevalence, protein analysis, and antibiotic resistance: an evolving public health challenge. *AMB Expr* 12, 53.
- 25 <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01390-1>
- Kaas et. al., **2014**. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* 9(8), e104984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>

- Kanehisa et al., **2016**. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428, 726-731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- 5 Kessi et al.**1999**. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4734–4740. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4734-4740.1999>
- Leekitcharoenphon et al., **2014**. Evaluation of Whole Genome Sequencing for Outbreak Detection of *Salmonella enterica*. *PLoS ONE* 9(2), e87991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087991>
- 10 Liu et al., **2019**. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 47, D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Martínez et al., **2020**. Biotransformation of Selenium by Lactic Acid Bacteria: Formation of Seleno-Nanoparticles and Seleno-Amino Acids. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 506. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00506>
- 15 Mohamad et al., **2018**. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Front. Microbiol.* 9, 924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00924>
- Mora-Villalobos et al., **2020**. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Ferment.* 6, 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- 20 Paysan-Lafosse, et al., **2022** InterPro in 2022 *Nucleic Acids Research*, Nov, (doi: 10.1093/nar/gkac993
- Pérez-Díaz, et al., **2021**. Genotypic and phenotypic diversity among *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from industrial scale cucumber fermentations. *Food Microbiol.* 94, 103652. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103652>
- 25 Pérez Montoro, et al., **2016**. Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Front. Microbiol.* 7, 1583. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01583>

Qian et al., **2003**, The ND-Tree: A Dynamic Indexing Technique for Multidimensional Non-ordered Discrete Data Spaces, Proceedings 2003 VLDB Conference, Morgan Kaufmann, 620-631, <https://doi.org/10.1016/B978-012722442-8/50061-6>

Qiao et al. **2023**. Selenite Bioremediation by Food-Grade Probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 393: Insights from Proteomics Analysis. Microbiol. Spectr. e00659-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00659-23>

Stamatakis, A., **2014**. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinform. 30(9), 1312-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

Sun et al., **2015**. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nat. Commun. 6, 8322. <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>

Tenea, G. N., Ascanta, P., 2022. Bioprospecting of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides Through Genome Characterization of a Novel Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* UTNGt21A Strain: A Promising Natural Antimicrobials Factory. Front. Microbiol. 13, 868025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868025>

Tóth et al., **2021**. Mobile Antimicrobial Resistance Genes in Probiotics. Antibiotics 10(11), 1287. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111287>

van Heel et al., **2018**. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic Acids Res. 46(W1), W278-W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

Wu et al., **2011**. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. BMC Genom. 12, 444. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-444>

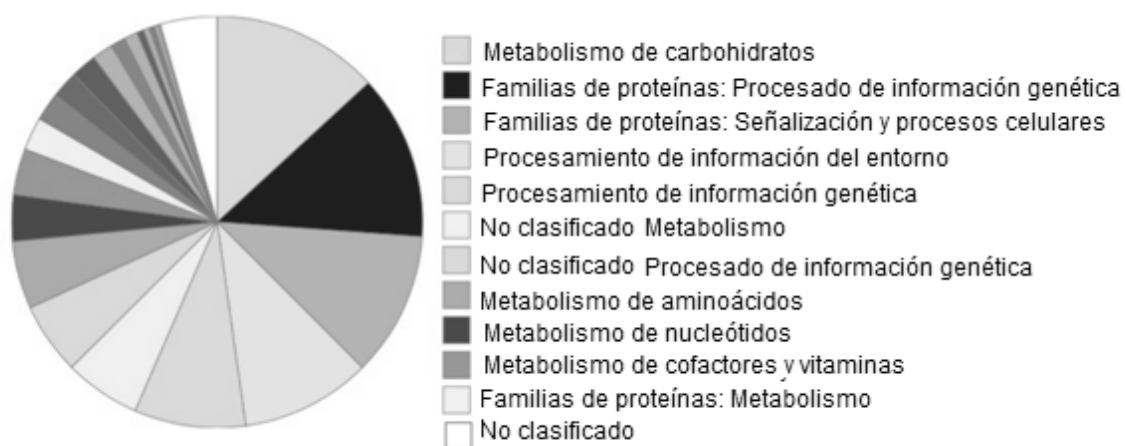
Zankari et al., **2020**. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J. Antimicrob. Chemother. 72(10), 2764-2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>

Zhang et al., **2004**. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Zhou et al., **2011**. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res. 39, W347–W352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

## REIVINDICACIONES

1. Cepa *Lactiplantibacillus pentosus* CF-6HA depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 30896.
2. Cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo aislado de la cepa de la reivindicación 1.
3. Composición que comprende el cultivo, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2.
4. Uso de la cepa según la reivindicación 1, el cultivo puro bacteriano según la reivindicación 2, y/o la composición que comprende el cultivo según la reivindicación 3 como probiótico para humanos, mamíferos no humanos y plantas.
5. Uso de la cepa según la reivindicación 1, el cultivo puro bacteriano según la reivindicación 2, y/o la composición que comprende el cultivo según la reivindicación 3 como agente antimicrobiano contra *Pseudomonas fragi*.
6. Uso según la reivindicación anterior caracterizado por que además actúa de forma simultánea contra uno o más de los microorganismos que se seleccionan de la lista que consiste en: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*, *Pseudomonas syringae* y *Verticillium dahliae*.
7. Uso del extracto o compuesto bioactivo aislado según la reivindicación 2, y/o la composición que comprende el extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 3 como compuesto o composición antimicrobiana contra *Pseudomonas syringae*, *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y/ o *Candida albicans*.
8. Uso de la cepa según la reivindicación 1 para la obtención de pediocina y Plantaricina Y.
9. Uso de la cepa según la reivindicación 1 para biorremediación de medios contaminados con selenio.
10. Uso de la cepa según la reivindicación 1 para el bioenriquecimiento de alimentos fermentados con selenio.



**FIG. 1**

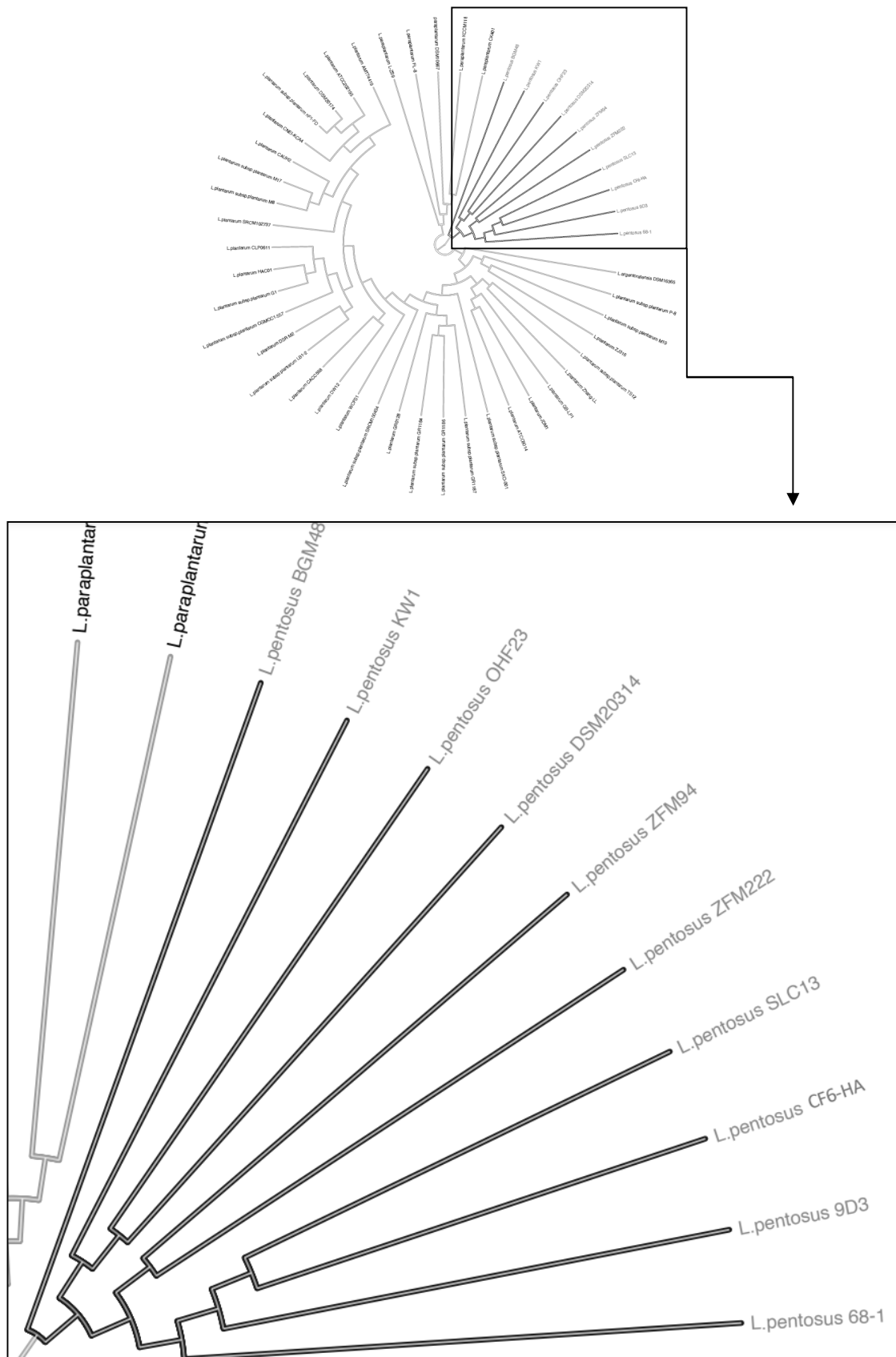


FIG. 2

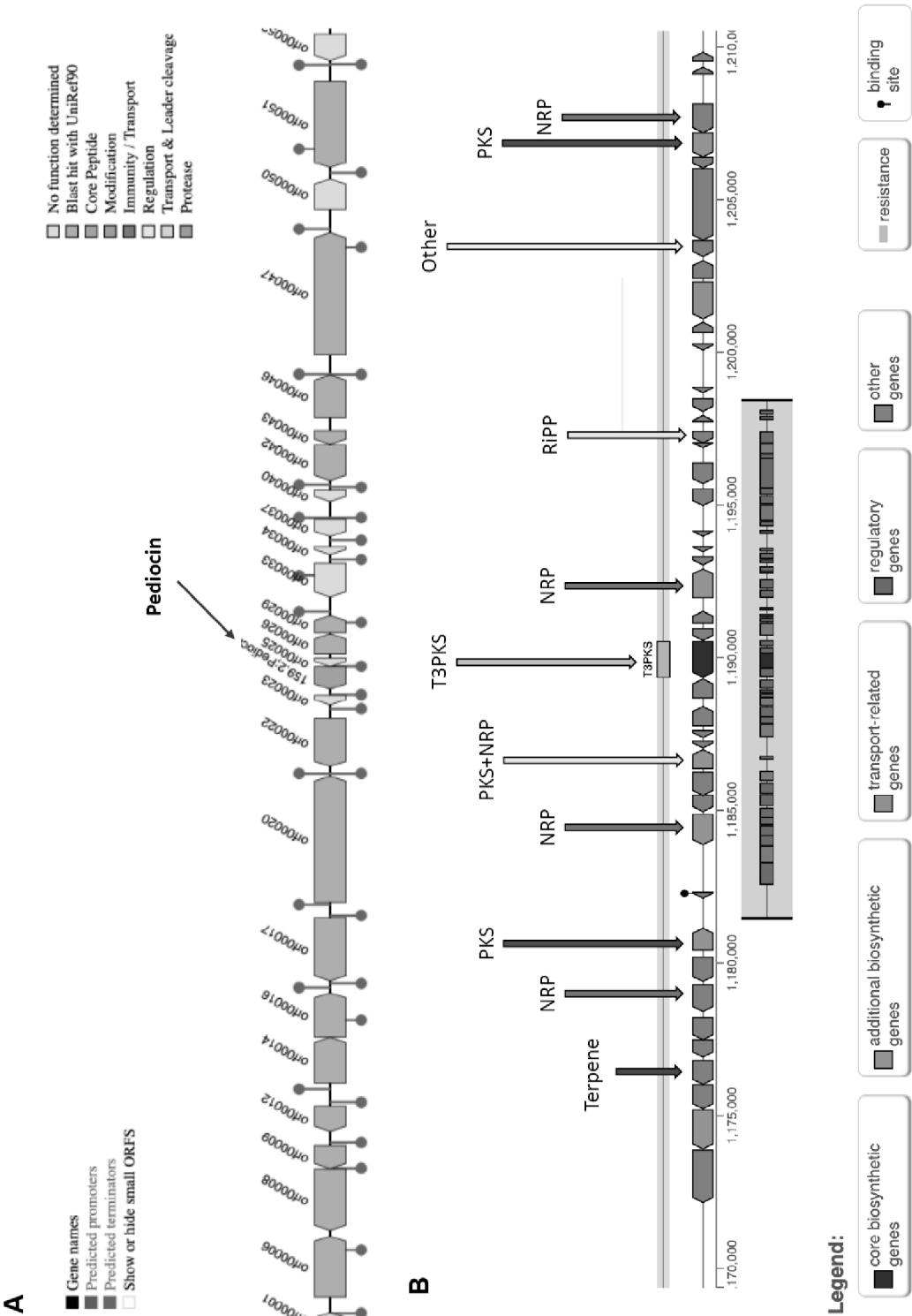
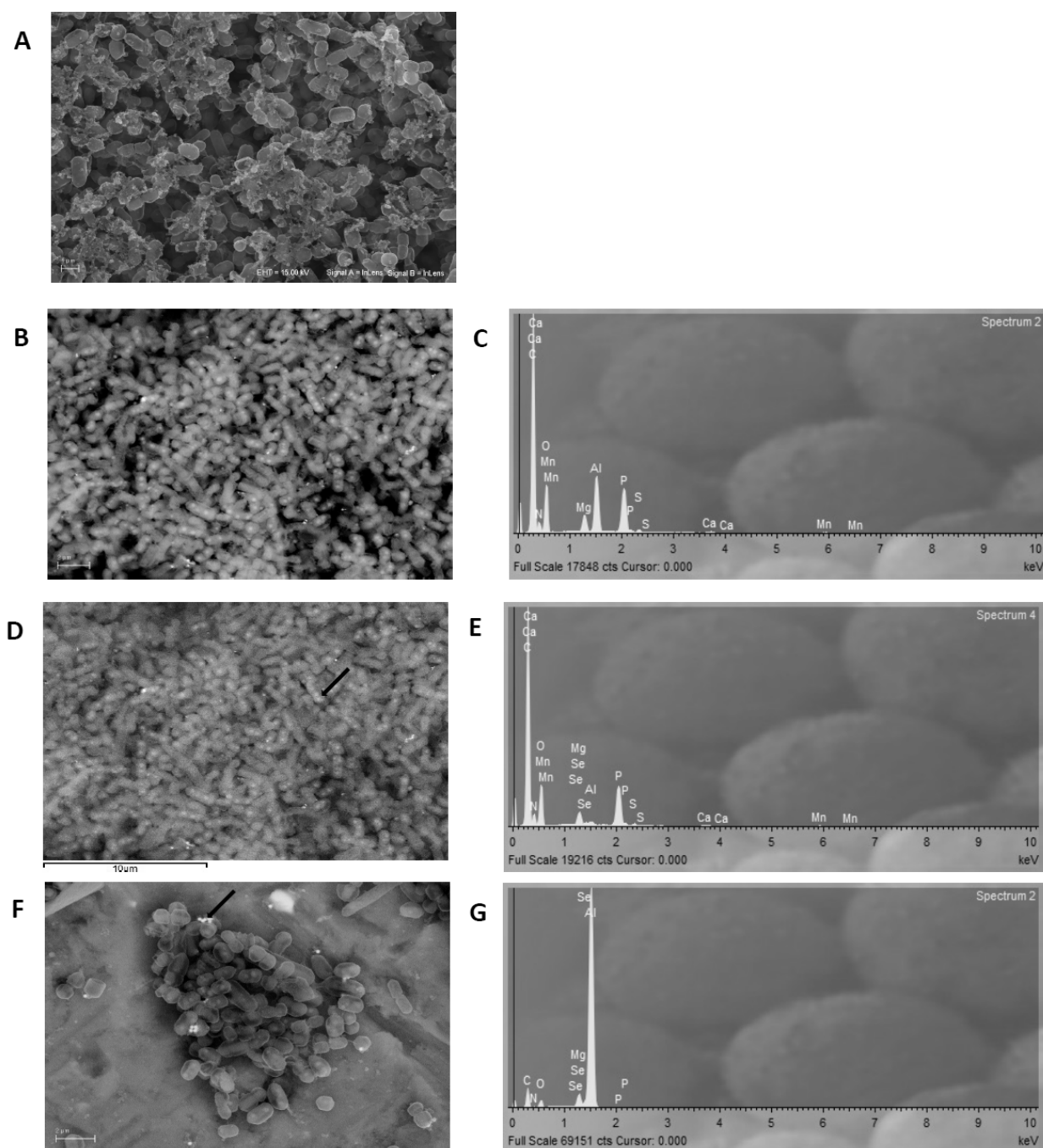


FIG. 3





**FIG. 4**



- ②① N.º solicitud: 202330818  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2023  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LÓPEZ-GARCÍA, E. et al. In silico evidence of the multifunctional features of <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> LPG <sub>1</sub> , a natural fermenting agent isolated from table olive biofilms. Foods. Febrero 2023, vol. 12 (5), artículo nº: 938 ISSN 2304-8158 (print), DOI: 10.3390/foods12050938	1-8
A	KIOUSI DESPOINA E. et al. Genetic and phenotypic assessment of the antimicrobial activity of three potential probiotic lactobacilli against human enteropathogenic bacteria. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Febrero 2023, vol. 13, artículo nº: 1127256, ISSN 2235-2988 (print) ISSN 2235-2988 (electronic), DOI:10.3389/fcimb.2023.1127256	1-8
A	PÉREZ MONTORO, B. et al. Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic <i>Lactobacillus pentosus</i> strains. Frontiers in Microbiology, Octubre 2016, vol. 7, artículo nº: 1583, ISSN 1664-302X (print) ISSN 1664-302X (electronic), DOI: 10.3389/fmicb.2016.01583	1-8
A	WO 2010136891 A1 (PROBIOTICAL SPA et al.) 02/12/2010, reivindicaciones, tabla 1.	1-8
A	MARTINEZ, F. G. et al. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: Formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Junio 2020, vol. 8, artículo nº: 506, ISSN 2296-4185 (print) ISSN 2296-4185 (electronic), DOI:10.3389/fbioe.2020.00506	1-10
A	KHERADMAND, E. et al. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against <i>Candida albicans</i> . DARU-Journal of Pharmaceutical Sciences, Junio 2014, vol. 22, artículo nº: 48, ISSN 1560-8115 (print) ISSN 1560-8115 (electronic), DOI:10.1186/2008-2231-22-48	1-10
A	CN 110747140 A (UNIV JIANGNAN) 04/02/2020, reivindicaciones, ejemplos.	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.05.2024

Examinador  
A. I. Polo Díez

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)  
**A01N63/20** (2020.01)  
**A61K35/747** (2015.01)  
**A23K10/18** (2016.01)  
**A23L33/135** (2016.01)  
**A23L33/16** (2016.01)  
**C12P13/00** (2006.01)  
**B09C1/10** (2006.01)  
**C12R1/225** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01N, A61K, A23K, A23L, C12P, B09C, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, COMPENDEX, BD-TXTE, INTERNET