

Universidad Miguel Hernández

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Estudio del efecto de la
acidificación del medio en la
bacteria *Streptococcus pneumoniae*

Lucía Bermejo Gómez

Tutor: Manuel Sánchez Angulo

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Curso 2023-2024

Grado en Biotecnología

Resumen y palabras clave

Streptococcus pneumoniae es uno de las principales patógenos humanos. Posee una gran variedad de factores de virulencia que facilitan su patogenicidad. Ejemplo de ello son las autolisinas, las cuales promueven la extensión de la infección produciendo la lisis de la bacteria y liberando componentes del interior celular. La diversidad de serotipos y el incremento de cepas resistentes a antibióticos dificultan el tratamiento de esta bacteria. Es por ello que debemos buscar tratamientos alternativos. En este presente trabajo se han evaluado los efectos producidos por la acidificación del medio en la viabilidad de *S. pneumoniae* y la implicación de la autolisina LytA. Se demostrado disminución y parada del crecimiento y efectos viabilidad celular como efecto de la bajada del pH. Estos resultados abren la posibilidad a futuras líneas de investigación.

Palabras claves: *Streptococcus pneumoniae*, LytA, acidificación, lisis, viabilidad y velocidad de crecimiento.

Abstract and keywords

Streptococcus pneumoniae is one of the major human pathogens. It has a wide variety of virulence factors, which facilitate its pathogenicity, such as autolysins. They promote the spread of the infection by producing the lysis of the bacteria and releasing components from the cell interior. The diversity of serotypes and the increase in antibiotic-resistant strains make the treatment of this bacteria difficult. For that reason, we must look for alternative treatments. In this present work, the effects produced by the acidification of the medium on the viability of *S. pneumoniae* and the involvement of the autolysin LytA have been evaluated. Decreases and arrest of growth and effects of cell viability have been demonstrated as an effect of the pH decreases. These results open the possibility of future lines of research.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, LytA, acidification, lysis, viability and growth rate.

Contenido

1.	Introducción	4
1.1.	La bacteria <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
1.2.	Efecto de la acidificación del medio en <i>S. pneumoniae</i>	5
1.3.	Autolisina Lyt A	6
2.	Antecedentes y objetivos	8
3.	Materiales y métodos	8
3.1.	Cepas utilizadas	8
3.2.	Medio de cultivo	8
3.3.	Mantenimiento de la cepa	9
3.4.	Establecimiento de cultivos exponenciales	9
3.5.	Cambios de pH en cultivos exponenciales	10
3.6.	Espectrofotometría	10
3.7.	Recuento de viables	10
3.8.	Microscopía	11
4.	Resultados	12
4.1.	Crecimiento de la cepa R6CIB17 (pH 7,44)	12
4.2.	Acidificación del cultivo de R6CIB17 a pH 6,44	13
–	Crecimiento R6CIB17 a pH 6,44	13
–	Recuento de viables R6CIB17 a pH 6,44	15
–	Microscopía óptica R6CIB17 a pH 6,44	16
4.3.	Acidificación del cultivo de R6CIB17 a pH 5,22	18
–	Crecimiento R6CIB17 a pH 5,22	18
–	Recuento de viables R6CIB17 a pH 5,22	20
–	Microscopía óptica R6CIB17 a pH 5,22	20
4.4.	Crecimiento de la cepa M32	22
4.5.	Acidificación a pH 6,44 de la cepa M32	23
–	Crecimiento M32 a pH 6,44	23
–	Recuento de viables de la cepa M32 a pH 5,22	25
–	Microscopía óptica M32	26
5.	Discusión	29
6.	Conclusiones y proyección futura	32
7.	Bibliografía	33

1. Introducción

1.1. La bacteria *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, comúnmente conocido como neumococo, es una bacteria Gram positiva anaerobio facultativa. Es uno de los principales patógenos humanos. Se transmite principalmente mediante contacto directo con las secreciones del sistema respiratorio de un portador. Inicia el proceso de infección colonizando la nasofaringe de su hospedador de forma asintomática ya que forma parte de la microbiota del tracto respiratorio superior. En este momento se considera al huésped como portador. Si el sistema inmunológico no la detecta y elimina, migra hacia las vías respiratorias inferiores y otros órganos y tejidos, y se vuelve patógena causando meningitis, neumonía y sinusitis, entre otras enfermedades (Brooks & Mias, 2018).

Su patogenicidad se ve facilitada por la gran variedad de factores de virulencia capaces de evadir el sistema inmunológico del huésped y favorecer la proliferación neumocócica. Uno de esos factores es la cápsula extracelular polisacáridica, esta lo protege de la fagocitosis y supone el inicio del proceso infeccioso dado que permite la adherencia de la bacteria a las células huésped. Otro es la toxina proinflamatoria neumolisina, que se libera tras la lisis celular y daña los tejidos del huésped generando poros en las membranas celulares. Esta toxina también está involucrada en la formación de biofilms y en el aumento de la transmisión de la infección. Además, diversas autolisinas, como LytA, liberan neumolisina y otros componentes del interior celular promoviendo la extensión de la infección (Brooks & Mias, 2018). Por otra parte, gracias a la transformación y la recombinación, la bacteria adquiere nuevo material genético y no es capaz de reparar el ADN dañado ya que carece de respuesta SOS (Brooks & Mias, 2018).

Tiene tasas de incidencia superiores en personas inmunodeprimidas, niños menores de dos años y ancianos debido a que es un oportunista que se aprovecha de huéspedes con sistemas inmunológicos debilitados. Su transmisión se combate mediante el uso de antibióticos y vacunas. Los antibióticos son esenciales para reducir la carga bacteriana, pero su mal uso puede generar resistencias. El Centro para el Control de Enfermedades de los EE. UU. (CDC) informan que la resistencia bacteriana puede provocar 1.200.000 enfermedades más y 7.000 muertes al año. En cambio, las vacunas son medios de prevención (Brooks & Mias, 2018). Su inconveniente reside en que actualmente encontramos más de 100 serotipos identificados (Ganaie et al., 2023) cada uno de los cuales es reconocido por el sistema inmunológico de manera diferente.

En definitiva, ha descendido el número de enfermedades causadas por *S. pneumoniae* como consecuencia del aumento de conocimiento sobre la especie y al desarrollo de nuevas vacunas, pero debemos buscar nuevas medidas para tratar las infecciones que no generen resistencias a antibióticos.

1.2. Efecto de la acidificación del medio en *S. pneumoniae*

S. pneumoniae puede sobrevivir en condiciones de estrés. Esta es una característica común en la inflamación aguda, resultado del metabolismo bacteriano y la producción de lactato por neutrófilos y macrófagos infiltrados en las áreas inflamatorias. En los derrames pleurales, así como en el líquido intersticial cerebral en meningitis, encontramos pH cercanos a 6,8. E incluso encontramos pH de 4,4 en las vesículas fagosómicas durante los primeros minutos tras la fagocitosis (Cortés et al., 2015). La acidificación del medio tiene un impacto significativo en la supervivencia de *S. pneumoniae*. La bacteria puede adaptarse y sobrevivir al estrés ácido mediante la respuesta de tolerancia ácida (ATR) o puede inducirse la autólisis a través de la lisis inducida por estrés ácido (ASIL). La enzima F₀F₁-ATPasa, junto con los sistemas de dos componentes ComDE y CiaRH determinan qué ruta seguirá la bacteria. Cuando LytA se transloca desde compartimento intracelular al extracelular como se observa en la ilustración 1, se activa la autólisis (Cortés et al., 2015).

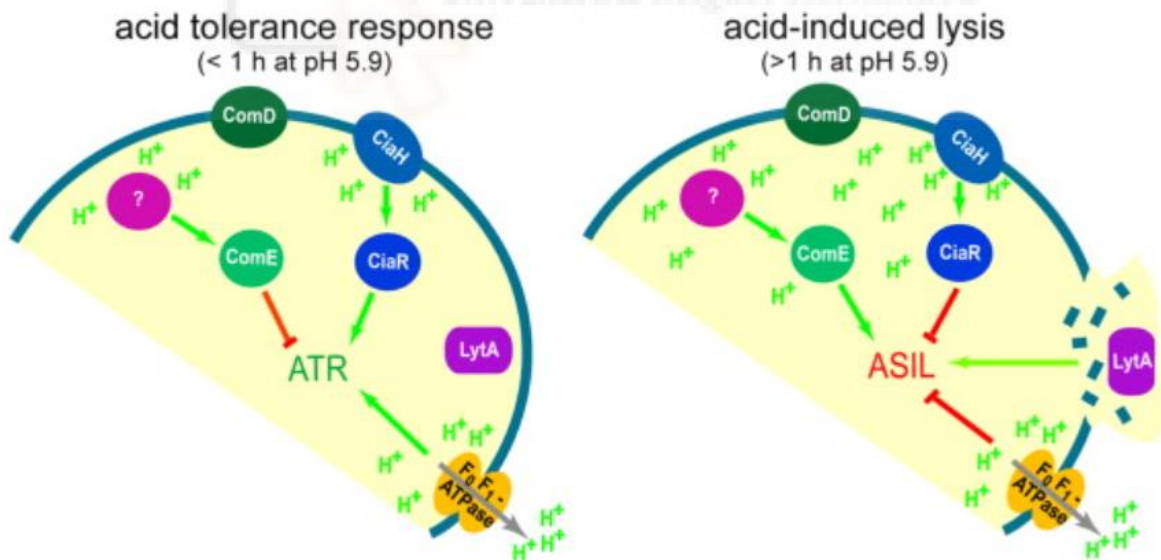


Figura 1: Modelo propuesto por Cortés et al., 2015 para explicar la determinación de los mecanismos de ATR y ASIL de *S. pneumoniae* en medio ácido. Las flechas verdes indican vías de señalización y reacciones enzimáticas que activan ATR y ASIL, y las flechas rojas el bloqueo de estos procesos.

Se ha descrito como exposiciones a pH 5,9 durante más de una hora son capaces de inducir autólisis en *S. pneumoniae*. Este proceso es conocido como lisis inducida por estrés ácido o ASIL. El estrés ácido puede representar una condición alternativa, de la competencia y los antibióticos, para asegurar la autólisis. Este mecanismo supone una herramienta de defensa ante situaciones adversas, como la falta de nutrientes, la exposición a antibióticos, o, como mostramos en el trabajo, la acidificación del medio. Al final de la fase estacionaria, la autólisis supone una ventaja ya que el ADN liberado puede usarse como donante para la transformación (Kim et al., 2017).

Gracias a un mecanismo denominado respuesta de tolerancia ácida es capaz de resistir medios con valores de pH bajos liberando por autólisis compuestos de la pared celular que han demostrado ser altamente inflamatorios en modelos animales, ADN y factores de virulencia como la neumolisina, que no se exportan activamente desde la célula (Whatmore & Dowson, 1999). La respuesta de tolerancia ácida involucra diversas estrategias que incluyen la alcalinización del medio, la expulsión de protones, la expresión de chaperonas y proteasas, la activación de mecanismos de reparación del ADN y la participación de sistemas de transducción de señales que regulan la expresión génica (Cortés et al., 2015).

1.3. Autolisina Lyt A

En *S. pneumoniae*, la autólisis la realiza principalmente la autolisina LytA (Cortés et al., 2015). Las autolisinas son enzimas que se encuentran en la envoltura celular e hidrolizan las paredes celulares liberando el contenido presente en el interior celular provocando la autodestrucción de la propia bacteria. De esta manera, activan el sistema inmunológico del huésped y contribuyen a la diseminación de material genético. Además, participan en una gran variedad de procesos biológicos, como en el crecimiento y renovación de la pared celular, en la división celular, en la lisis inducida por antibióticos β -lactámicos, la transformación genética y la extrusión de flagelos, fundamental en su movilidad (Sanchez-Puelles et al., 1986).

La autolisina LytA es una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. Degrada el peptidoglicano de la pared celular rompiendo los enlaces N-acetil-muramoil-L-alanina entre las cadenas de glicano. Por consiguiente, se produce la lisis celular y se liberan compuestos perjudiciales para el huésped, como la neumolisina, el peptidoglicano y los ácidos teicoicos, los cuales inhiben la producción de citocinas. En consecuencia, se bloquea la activación de los fagocitos, es decir, evade el sistema inmune (Brooks & Mias, 2018). Además, es una molécula clave en la patogénesis de neumococo durante la neumonía y la meningitis (Kim et al., 2017). La autolisina neumocócica tiene un dominio N-terminal, donde reside la función catalítica, y un

dominio C-terminal que actúa como brazo de unión entre el enzima y los residuos de colina de la pared celular bacteriana. Muchos bacteriófagos que infectan neumococos poseen enzimas similares a LytA. Además, *lytA* es un gen bastante conservado, a diferencia de muchos otros genes que codifican factores de virulencia en esta especie (Whatmore & Dowson, 1999). Las principales consecuencias biológicas de la ausencia de LytA son la formación de pequeñas cadenas, la ausencia de lisis durante la fase estacionaria y tolerancia frente a antibióticos betalactámicos (Sanchez-Puelles et al., 1986b). Pero su carencia no afecta a ninguna función fisiológica esencial de las células neumocócicas en la experimentación *in-vitro*, ya que las células pueden crecer, aunque de forma más lenta.



2. Antecedentes y objetivos

En estudios previos se ha analizado la relación entre el crecimiento bacteriano y los cambios de pH en cultivos de neumococos. Se ha determinado que se produce una acidificación del medio a medida que crecen los cultivos bacterianos. Así como, se definió que la lisis se produce a un rango de pH entre 6,8 y 7,0 (Ronda-Lain et al., 1977). También se ha demostrado que el estrés ácido desencadena una autólisis dependiente de LytA ya que al disminuir el pH de 7,8 a 5 se autolisaron todos los cultivos silvestres, pero el proceso se inhibió completamente en el mutante *lytA*⁻ (Piñas et al., 2008).

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la acidificación del medio en el crecimiento y supervivencia de *Streptococcus pneumoniae*.

- Objetivo 1: Determinar el efecto de diferentes niveles de acidificación en la viabilidad, morfología, velocidad de crecimiento y autólisis de la cepa R6CIB17.
- Objetivo 2: Determinar la diferencia del efecto de la acidificación del medio entre la cepa silvestre R6CIB17 y aquella que presenta mutada el gen *lytA*, M32.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas utilizadas

Se emplearon dos cepas de *S. pneumoniae*, la cepa R6CIB17 (Roig-Molina et al., 2020) y la cepa M32, la cual carece del gen de la autolisina LytA (López et al., 1986). La cepa R6CIB17 ha sido usada en investigación por su fácil manipulación genética y es de nivel de bioseguridad 1. Para evitar contaminaciones y asegurar su esterilidad, se manipularon en condiciones asépticas.

3.2. Medio de cultivo

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* hemos utilizado un medio líquido THY. Este proporcionó los recursos necesarios para un correcto crecimiento bacteriano.

Para preparar este medio se emplean 30 g/L medio Bacto Todd Hewitt (marca BD) y 2 g/L de Bacto Extracto de levadura (marca BD). Una vez mezclados, medimos su pH y obtuvimos 7,44. Reservamos una parte. Como queríamos observar el crecimiento de R6CIB17 cuando acidificamos su entorno, necesitábamos preparar medio líquido THY ácido. Partimos del preparado anterior y añadimos HCl 10 M con una pipeta Pasteur gota a gota mientras

homogeneizábamos con un agitador hasta que el pH metro marcase el pH deseado. En nuestro caso, el medio THY ácido tenía un pH de 3,7.

Finalmente, vertimos el medio en botellas y lo introducimos en el autoclave a 121 °C y 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos para esterilizarlo. Tras ello se almacenó a 4 °C.

3.3. Mantenimiento de la cepa

Incubamos un primer inóculo a 37 °C en 4 ml de medio THY. Se dejó que el cultivo creciera de manera exponencial y cuando su densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) alcanzó 0,4, punto medio de crecimiento exponencial de *S. pneumoniae*, añadimos glicerol hasta una concentración final del 10 %, homogeneizamos y repartimos la mezcla en alícuotas 400 μ L en criotubos previamente etiquetados con la fecha de preparación, DO_{600} y el tipo de cepa. Por último, congelamos los tubos empleando la técnica de la nieve carbónica y etanol y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

3.4. Establecimiento de cultivos exponenciales

Como se ha indicado en la introducción, el neumococo puede entrar en autólisis si llega a la fase estacionaria. Para evitar que el cultivo llegase a la autólisis se procedió de la siguiente manera. El día previo al experimento, introducimos 4ml de medio THY en 4 tubos de ensayo de 5 mL de capacidad y 1 cm un paso óptico de la marca SARSTEDT. Uno de los tubos lo tomamos como control de esterilidad para asegurarnos de la ausencia de contaminación y que hemos trabajado en las condiciones de asepsia adecuadas. En los tres restantes, inoculamos 50, 100 y 200 μ L de una de las alícuotas congeladas. Llamamos a estos tubos T50, T100 y T200 respectivamente. Colocamos los 4 tubos en un baño termostático con hielo, de esta forma evitamos el crecimiento de la bacteria manteniéndola en estado de latencia. Programamos la activación del termostato gracias a un temporizador para que 4h antes de iniciar la toma de medidas el baño se encontrase a 37 °C y *S. pneumoniae* comenzase a crecer.

Tras este tiempo, medimos la densidad óptica a 600 nm y utilizamos el tubo que hubiese alcanzado una DO_{600} en torno a un valor de 0,2 para realizar los inóculos. A esta densidad óptica el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento. Realizamos la dilución del cultivo para obtener una DO_{600} final de 0,05 en un tubo nuevo con medio THY precalentado a 37 °C. Además, preparamos un nuevo tubo con medio THY como nuevo control de esterilidad. Volvimos a introducir todos los tubos en el baño a 37 °C y seguimos el crecimiento del cultivo mediante medidas de densidad óptica a intervalos regulares.

3.5. Cambios de pH en cultivos exponenciales

Para observar el efecto de los cambios de pH se partió de un cultivo en crecimiento exponencial y se siguió su densidad óptica a intervalos de 30 minutos. Al mismo tiempo se prepararon dos tubos con medio precalentado a 37 °C. Uno de ellos con 2 mL de medio THY a pH 7,3 (Tubo Control) y el otro con 2 mL de medio THY ácido (Tubo Ácido). Cuando el cultivo exponencial alcanzaba una DO_{600} de 0,4 se dividía en dos alícuotas de 2 ml que se añadían a los tubos control y ácido precalentados. De esa forma se diluían ambos cultivos a una DO_{600} aproximada de 0,2 y se conseguía acidificar rápidamente el cultivo en el tubo con medio ácido. Se utilizaron dos pH distintos. En uno se diluía a la mitad con medio THY pH 3,7 con lo que el pH final era de 5,22. En otro, se diluía a la cuarta parte con lo que el pH era de 6,44. Para controlar el crecimiento medíamos la densidad óptica cada 20 minutos hasta que el cultivo control llegaba a la fase estacionaria y calculamos la velocidad de crecimiento con estos valores. Además, al finalizar el experimento, se tomaban medidas del pH de ambos tubos.

3.6. Espectrofotometría

Para medir la densidad óptica de los cultivos a 600nm se emplearon tubos de 5ml y 1cm de paso óptico de la marca SARSTEDT que se introdujeron directamente en un espectrofotómetro ZUZI modelo 4201/50.

3.7. Recuento de viables

Para cuantificar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de cultivo se tomaron muestras de 10 microlitros de los distintos cultivos a los tiempos 0, 40 y 80 minutos y se realizó una dilución seriada en placas de 96 pocillos que contenían 90 microlitros de medio THY. Los 10 microlitros del cultivo se depositaron en el primer pocillo conteniendo 90 μ L de medio THY a 4°C para detener el crecimiento. A continuación, homogeneizamos 10 veces y tomamos 10 μ L de este primer pocillo para pasarlo al siguiente. Repetimos el proceso hasta llegar al último pocillo de manera que diluimos diez veces cada vez que pasamos de un pocillo a otro. De esa manera en el primer pocillo tuvimos una dilución de 10^1 y en el pocillo número 10, una dilución de 10^{10} .

Posteriormente, se inocularon 10 μ L de cada pocillo en placas de Agar-Sangre de las marcas BD y Bioagar, desde el mayor factor de dilución al menor, en dos columnas de 5 filas. Tras 24 h de incubación a 37 °C, se contaron las colonias con la ayuda de una lupa binocular ZUZI y un contador. Por último, para calcular las UFC/ml presentes en el cultivo, se multiplicó el número de colonias encontradas por 100 (10 μ L=0,01ml) y por su factor de dilución.

En el caso del mutante M32 se repitió el mismo proceso tomando las muestras en los tiempos 0', 40', 80' y 160'. Además, fue necesario hacer la dilución 12 veces, hasta 10^{12} .

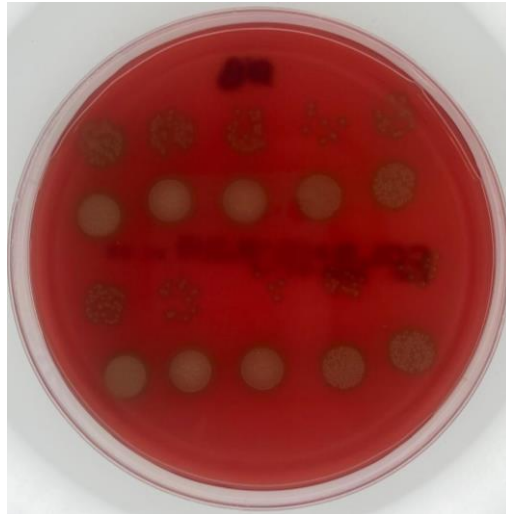


Figura 2: Fotografía ejemplo de recuento de viables en una placade Agar-Sangre. Cada gota corresponde con 10 μ L de la dilución respectiva.

3.8. Microscopía

Se tomaron muestras de microscopía cada 20 minutos. Para fijar las muestras, se extrajeron 50 μ L del cultivo y se les añadió 5 μ L de formaldehído 10 % a un tubo Eppendorf de 1,5 mL (la concentración final de formaldehído es 1%). Estos se almacenaron a 4 °C hasta su observación.

Se empleó un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX50 y una cámara OPTIKA 4083.13H que nos permitieron visualizar y fotografiar las bacterias.

4. Resultados

4.1. Crecimiento de la cepa R6CIB17 (pH 7,44)

Tal y como se explica en Materiales y Métodos se utilizaron cultivos en crecimiento exponencial. El cultivo en medio THY siguió la típica curva de crecimiento de un cultivo bacteriano (figura 3). Podemos observar tres fases diferentes:

- Fase logarítmica o exponencial: abarca las DO_{600} comprendidas entre 0,1 y 0,8. En esta fase la velocidad de crecimiento es máxima porque el metabolismo del microorganismo está destinado a la división celular.
- Fase estacionaria donde, tras alcanzar una DO_{600} de 0,8, el cultivo comienza a ralentizar su crecimiento. La concentración del microorganismo es constante en esta fase. La bacteria intenta mantenerse y sobrevivir mientras las condiciones no sean óptimas porque se acaban los nutrientes y/o se acumulan productos de desecho.
- Fase muerte: cuando el valor de la DO_{600} es aproximadamente 1 las bacterias van sedimentando debido a la agregación en forma de flóculos y finalmente acaban inutilizando. En esta fase se produce un descenso de la DO_{600} .

Una vez terminamos de anotar las densidades ópticas, procedimos a tomar valor del pH. Se produjo un descenso del pH del medio hasta 5,06.

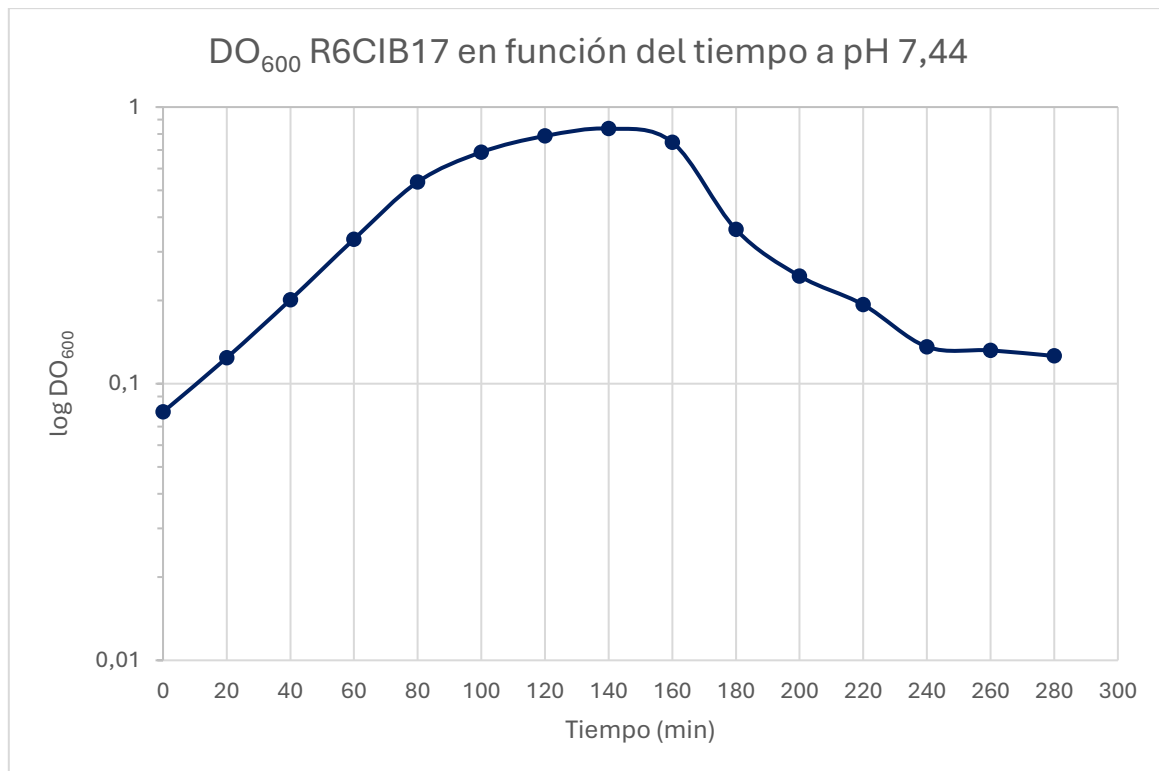


Figura 3: Representación semilogarítmica de la densidad óptica de *Streptococcus pneumoniae* en función del tiempo en medio THY con pH 7,44.

Destacamos que la gráfica de la figura 3 ha sido realizada con los resultados de un único ensayo. Se ha comprobado que se repiten los resultados en tres o más ocasiones. Esto mismo sucede con todas las gráficas del documento.

4.2. Acidificación del cultivo de R6CIB17 a pH 6,44

Tal y como se ha explicado en materiales y métodos, en los experimentos de acidificación lo que se hace es diluir a la mitad un cultivo exponencial que ha alcanzado un valor DO₆₀₀ de 0,4 en un medio THY acidificado y precalentado. De esa manera, el cultivo se mantiene en crecimiento exponencial ya que su DO₆₀₀ será de aproximadamente 0,2 y el cambio de pH será instantáneo.

– Crecimiento R6CIB17 a pH 6,44

Cuando realizamos el experimento disminuyendo el pH hasta 6,44 (figura 4) se observa como el cultivo disminuye su velocidad de crecimiento y alcanza la fase estacionaria a una DO₆₀₀ menor que la del cultivo control. Además, cuando tomamos todas las medidas de la densidad óptica medimos el pH. Se produjo una acidificación del medio, a los 280 minutos el pH medía 4,81, valor ligeramente inferior al mostrado en el cultivo control.

Una vez tomadas las DO_{600} , calculamos la velocidad de crecimiento (μ) de la cepa silvestre en ambos cultivos y en dos intervalos de tiempo. El primer intervalo, de 0 a 60 min, pertenece a la fase exponencial y el segundo intervalo, de 60 a 120 minutos, corresponde con la fase estacionaria. En las operaciones inferiores se ha ejemplificado el cálculo la velocidad de crecimiento del cultivo control en el primer intervalo. Hemos empleado la DO_{600} al inicio del experimento (X_0), a los 60 minutos (X) y el tiempo transcurrido entre esas dos medidas (t), es decir, 60 minutos.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t \qquad \ln \frac{0,629}{0,275} = \mu \cdot 60 \qquad \mu = \frac{0,827}{60} = 0,0138 \text{ min}^{-1}$$

En la figura 5 observamos que la velocidad de crecimiento es menor en el cultivo a pH 6,44 que en el cultivo control en ambos intervalos. En el intervalo de 0 a 60 min, la velocidad de crecimiento del control es $0,0138 \text{ min}^{-1}$, mientras que la del medio acidificado es de $0,0111 \text{ min}^{-1}$. En el segundo intervalo de tiempo, el control muestra una velocidad de $0,0049 \text{ min}^{-1}$ y el valor de la velocidad de crecimiento en el cultivo en medio a pH 6,44 es de $0,0012 \text{ min}^{-1}$. Aunque en la fase estacionaria la velocidad de crecimiento sea muy baja, sigue habiendo diferencias al disminuir el pH. El descenso de la DO_{600} por floculación se observa en ambos cultivos.

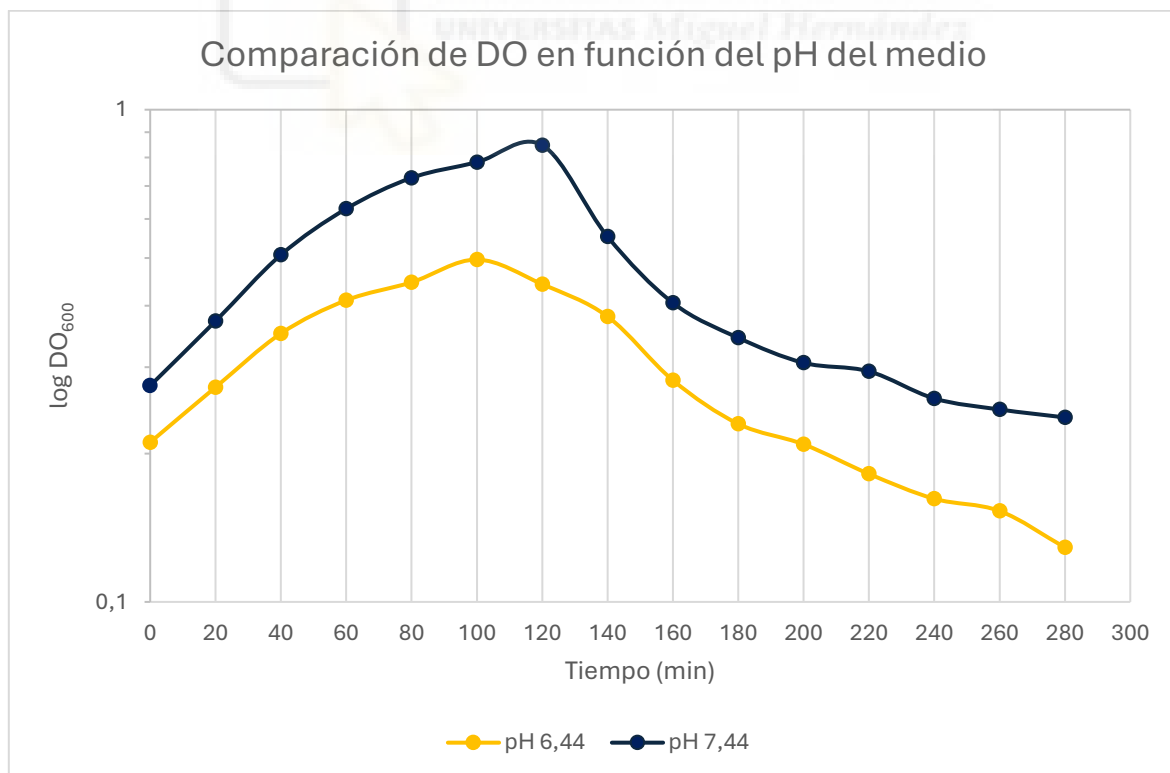


Figura 4: Representación semilogarítmica de la densidad óptica en función del tiempo de un cultivo *R6CIB17* control (azul marino) y otra acidificado hasta alcanzar un pH de 6,44 (amarillo).

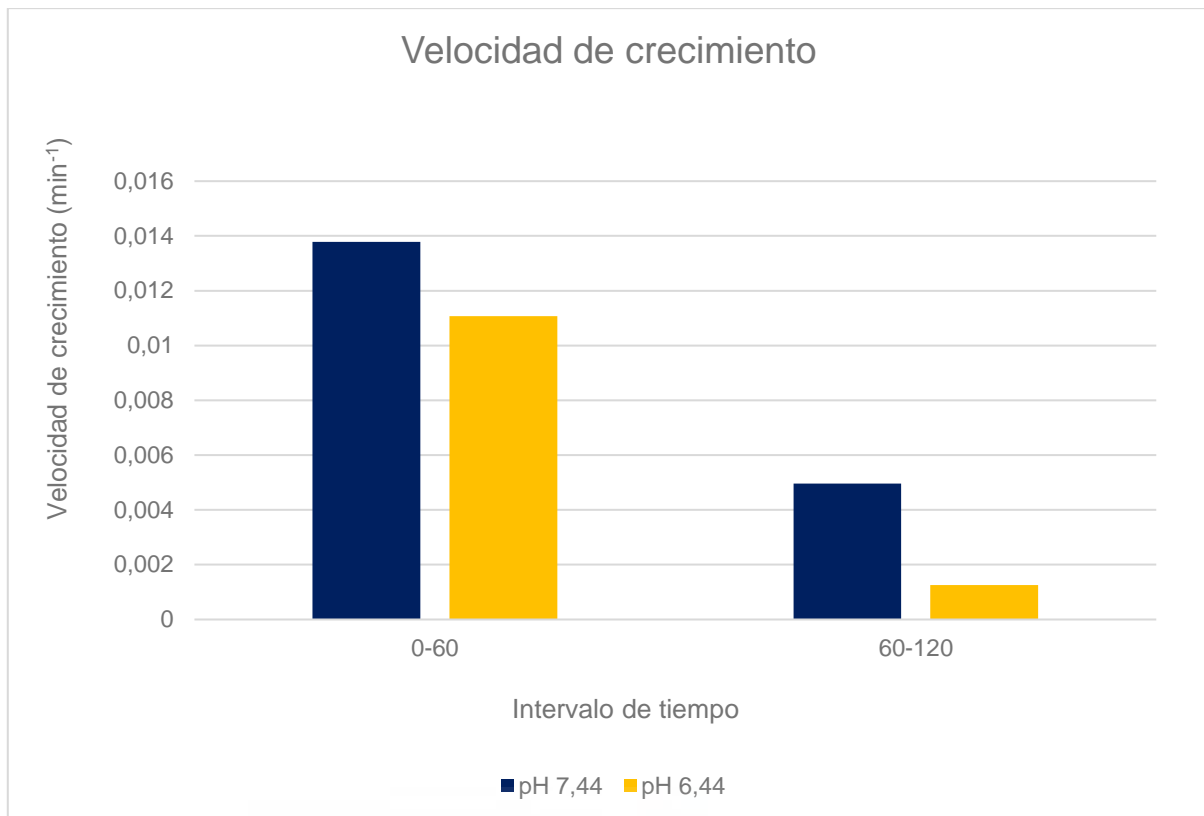


Figura 5: Gráfico que muestra la velocidad de crecimiento (min^{-1}) de la cepa R6CIB17 de 0 a 60 min y de 60 a 120 min.

– Recuento de viables R6CIB17 a pH 6,44

Para comprobar la viabilidad celular, se tomaron muestras en tres puntos (0, 40 y 80 minutos) de la fase exponencial de ambos cultivo, se realizó el recuento de viables y se plasmaron los resultado en la ilustración 6. En esta observamos que el cultivo control en el medio THY normal aumenta considerablemente el número de UFC/ml de 0 a 40 minutos, pero se mantiene constante de 40 a 80 minutos. Si observamos la gráfica de la figura 4 vemos que la DO_{600} sigue incrementándose en ese intervalo de tiempo. Recordemos que *S. pneumoniae* es un microorganismo que forma cadenas, así que esta aparente discrepancia es debida a que la masa de cultivo sigue aumentando, pero el número de células individuales no. en el cultivo a pH 6,44 el valor de UFC/ml se mantiene contante de 0 a 40 minutos y luego aumenta de 40 a 80 minutos.

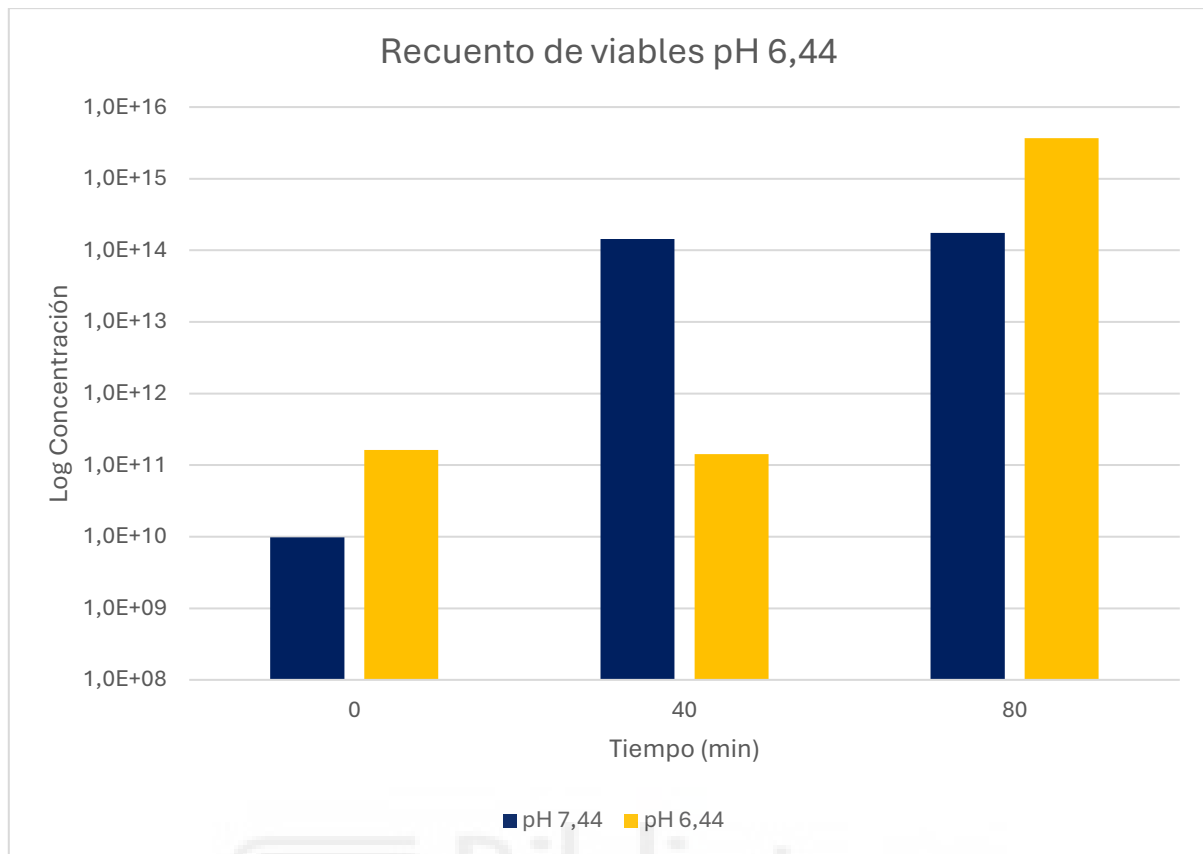
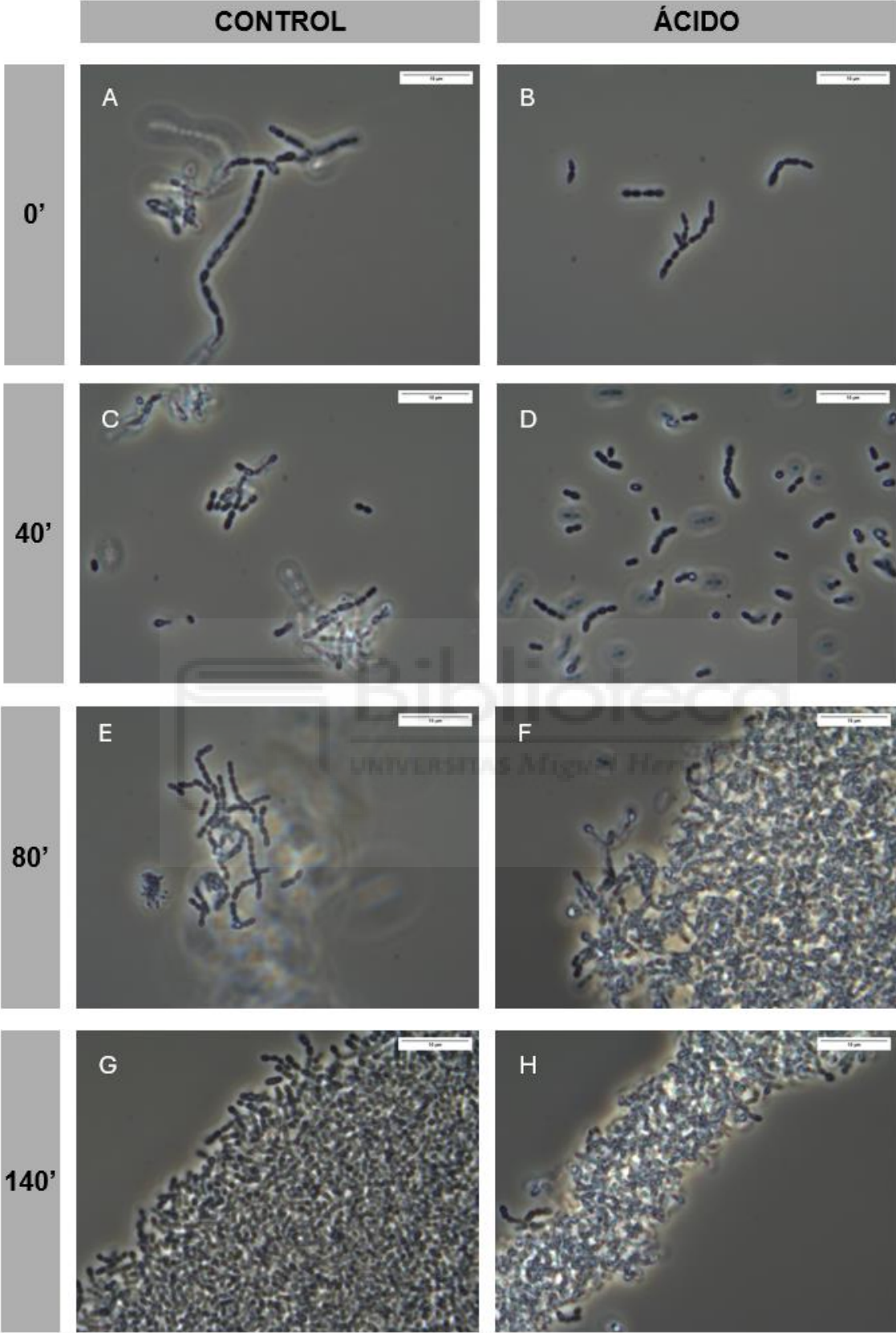


Figura 6: Gráfico comparativo de la concentración (UFC/ml) a escala semilogarítmica en los tiempos 0,40 y 80 minutos de R6CIB17 a pH 7,44 y pH 6,44.

– Microscopía óptica R6CIB17 a pH 6,44

Se tomaron muestras de los cultivos de R6CIB17 control y acidificado para microscopía en los tiempos 0, 40, 80, 140 y 180 minutos tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos. Posteriormente observamos las muestras, capturamos cinco imágenes de cada una y seleccionamos las más adecuadas (figura 7). Determinamos las características morfológicas en cada tiempo, así como, las diferencias encontradas entre el cultivo del medio control y el cultivo acidificado a pH 6,44. En la figura 7 podemos observar cómo se produce un aumento de bacterias en el medio THY normal, las cuales se van agrupando en cadenas que van aumentando su longitud a lo largo del tiempo y comienzan a flocular los 40 minutos (imagen 7C). A los 140 y 180 minutos apenas hay bacterias sueltas, todas se encuentran formando parte de grandes flóculos. Por otro lado, en el medio acidificado (pH 6,44) inicialmente (imagen 7B) vemos bacterias sueltas o formando pequeñas cadenas. En el tiempo 40 aumenta la cantidad de bacterias, pero sigue siendo menor que la del control. A los 80 minutos se comienzan a formar pequeños flóculos que van aumentando su tamaño en los siguientes tiempos como observamos en las imágenes 7H y 7J.



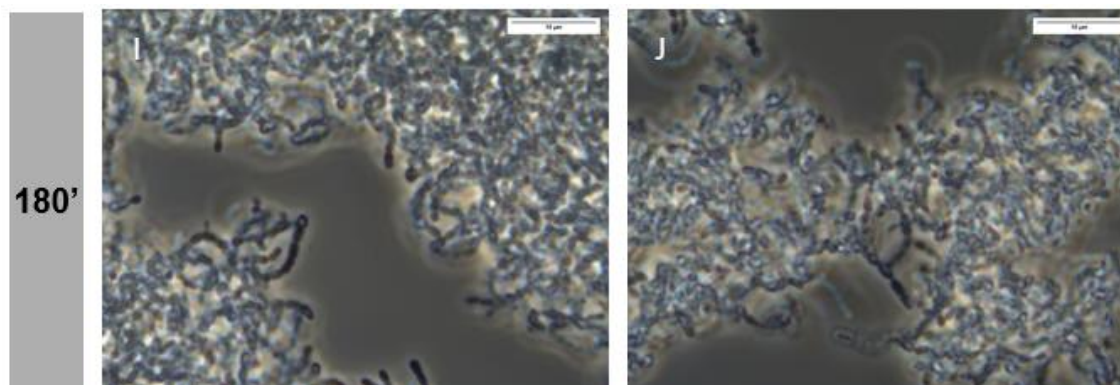


Figura 7: Imágenes de microscopía óptica de R6CIB17 en medio THY normal (pH 7,44) en los tiempos 0 min (imagen A), 40 min (imagen C), 80 min (imagen E), 140 (imagen G) y 180 min (imagen I); y en THY acidificado a pH 6,44 en los tiempos 0 min (imagen B), 40 min (imagen D), 80 min (imagen F), 140 (imagen H) y 180 min (imagen J). La barra blanca de escala de la esquina superior derecha de cada imagen equivale a 10 micrómetros.

4.3. Acidificación del cultivo de R6CIB17 a pH 5,22

A continuación realizamos una serie de experimentos en los que los cultivos se sometían un pH más ácido de 5,22 (ver Materiales y Métodos).

– Crecimiento R6CIB17 a pH 5,22

Tras anotar los datos de la DO_{600} de los cultivos en medio normal (pH 7,44) y acidificado hasta un pH 5,22 cada 20 minutos, construimos un gráfico (figura 8) donde se muestra la comparación entre las curvas de crecimiento de ambos cultivos. Observamos como al disminuir drásticamente el pH del medio, el crecimiento del cultivo se detiene completamente, pero no se observa ninguna disminución de la DO_{600} . Al final del ensayo medimos el valor del pH, el cual se encontraba en 4,77.

A continuación calculamos la velocidad de crecimiento siguiendo el ejemplo del cultivo a pH 6,44. La figura 9 nos muestra como la velocidad de crecimiento es elevada en la fase exponencial del control ($0,015 \text{ min}^{-1}$) y disminuye en la fase estacionaria hasta $0,0036 \text{ min}^{-1}$, aunque sigue siendo superior que a pH 5,22. En cambio, la velocidad de crecimiento del cultivo acidificado es muy baja en el intervalo de 0 a 60 minutos ($0,0006 \text{ min}^{-1}$) y se vuelve negativa ($-0,0002 \text{ min}^{-1}$) de 60 a 140 min. Asociamos ese valor a fluctuaciones en las medidas de la densidad óptica ya que no se trata de un medio homogéneo.

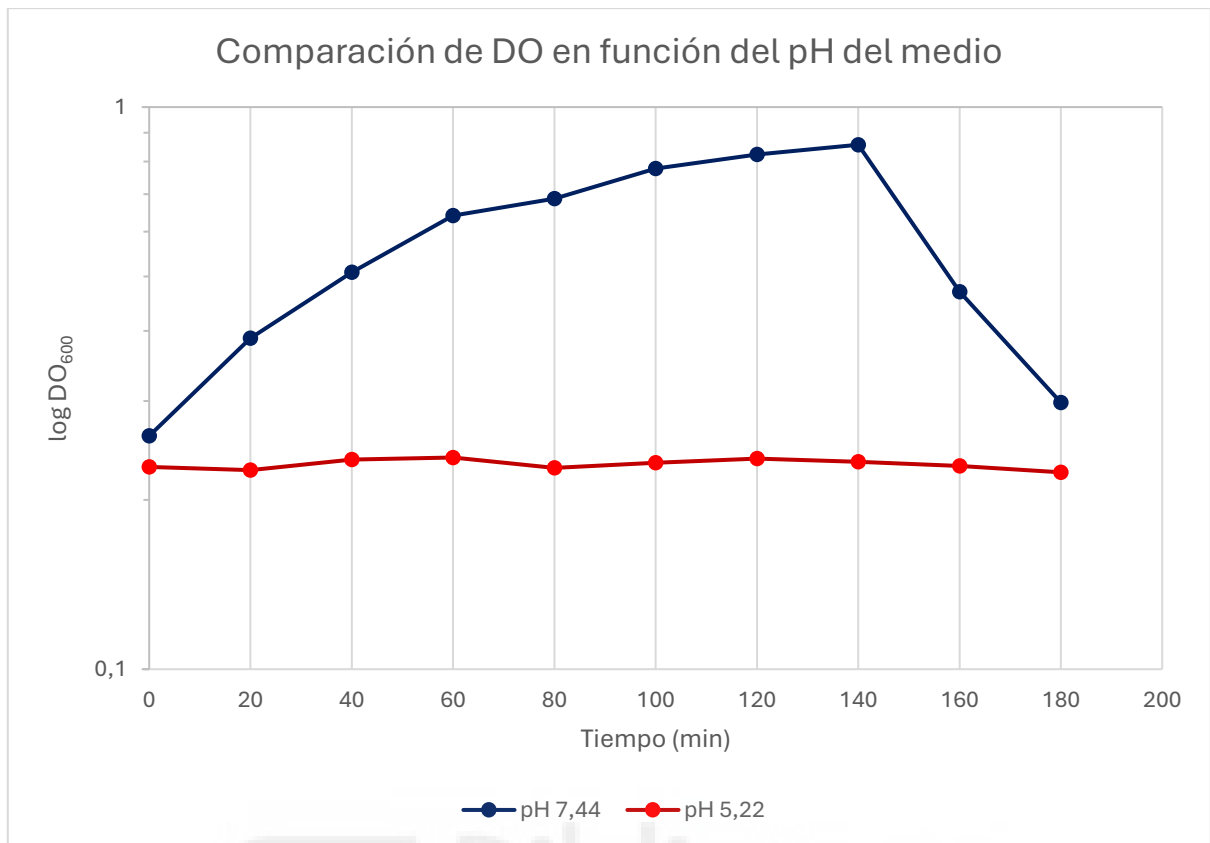


Figura 8: Representación semilogarítmica de la densidad óptica de dos cultivos la cepa R6CIB17 de *S. pneumoniae* en función del tiempo. En azul marino se muestran los resultados a pH 7,44 y en rojo se muestran los resultados a pH 5,22.

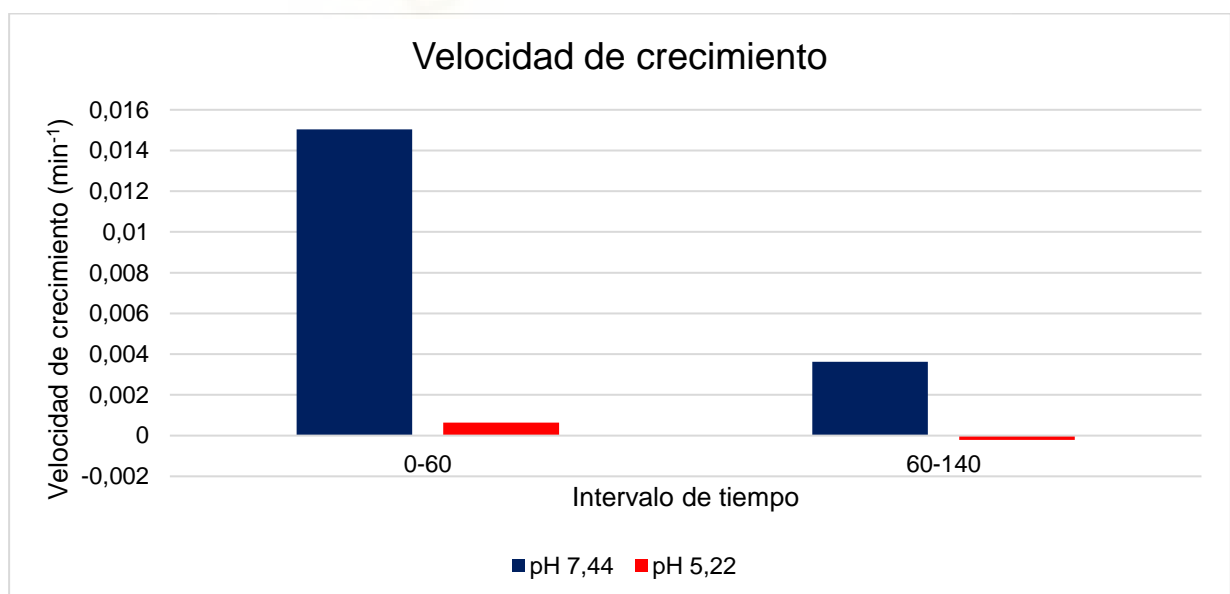


Figura 9: Representación de la velocidad de crecimiento de la cepa R6CIB17 en medio THY con pH 7,44 y 5,22. El cálculo se ha realizado en la fase exponencial, intervalo de 0 a 60 minutos, y en la fase meseta del control, desde los 60 hasta los 140 minutos.

– Recuento de viables R6CIB17 a pH 5,22

Tomamos muestras para recuento de viables en los tiempos 0, 40 y 80 minutos. Tras realizar el procedimiento explicado en materiales y métodos, obtuvimos la figura 10. En el cultivo control observamos que hay un incremento de UFC/ml entre los tiempos 0 y 40 minutos. Posteriormente, el número de UFC/ml a 80 minutos parece estabilizarse. Se repiten los resultados del control anterior. En el cultivo a pH 5,22 lo que vemos es que a pesar de que la densidad óptica sea estable esta acidificación provoca la pérdida de viabilidad celular. Destacamos que a tiempo 0, el número de UFC/ml del cultivo acidificado a 5,22 es mucho mayor que el del cultivo control.

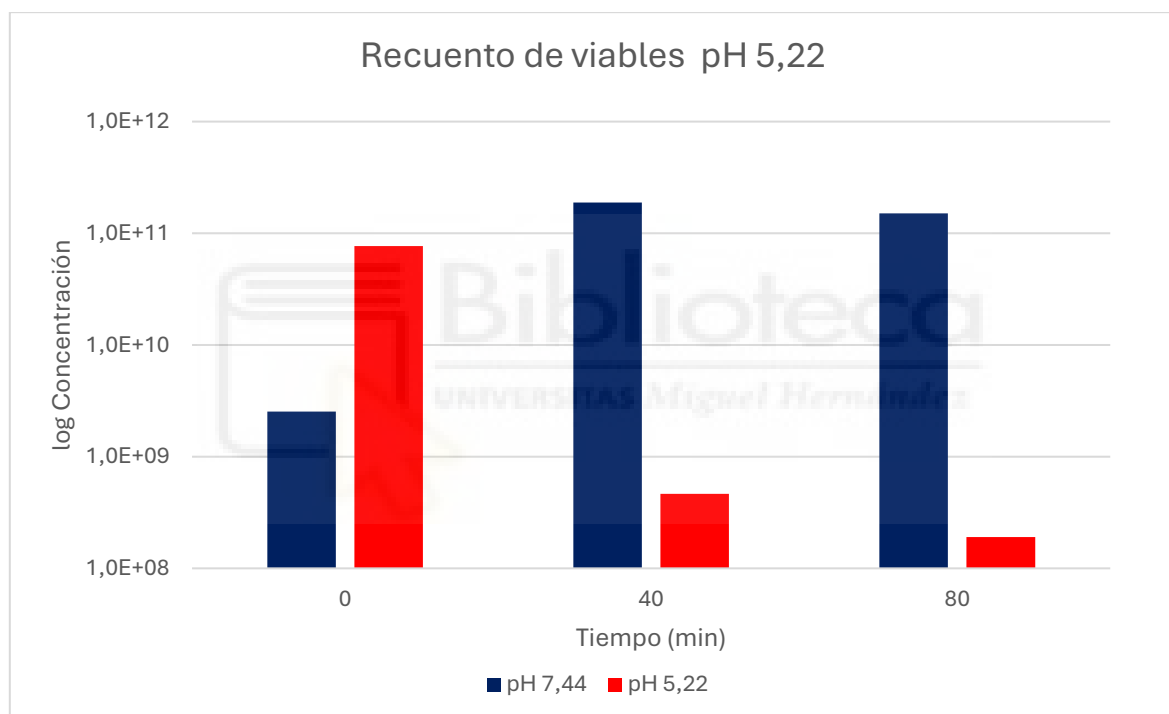
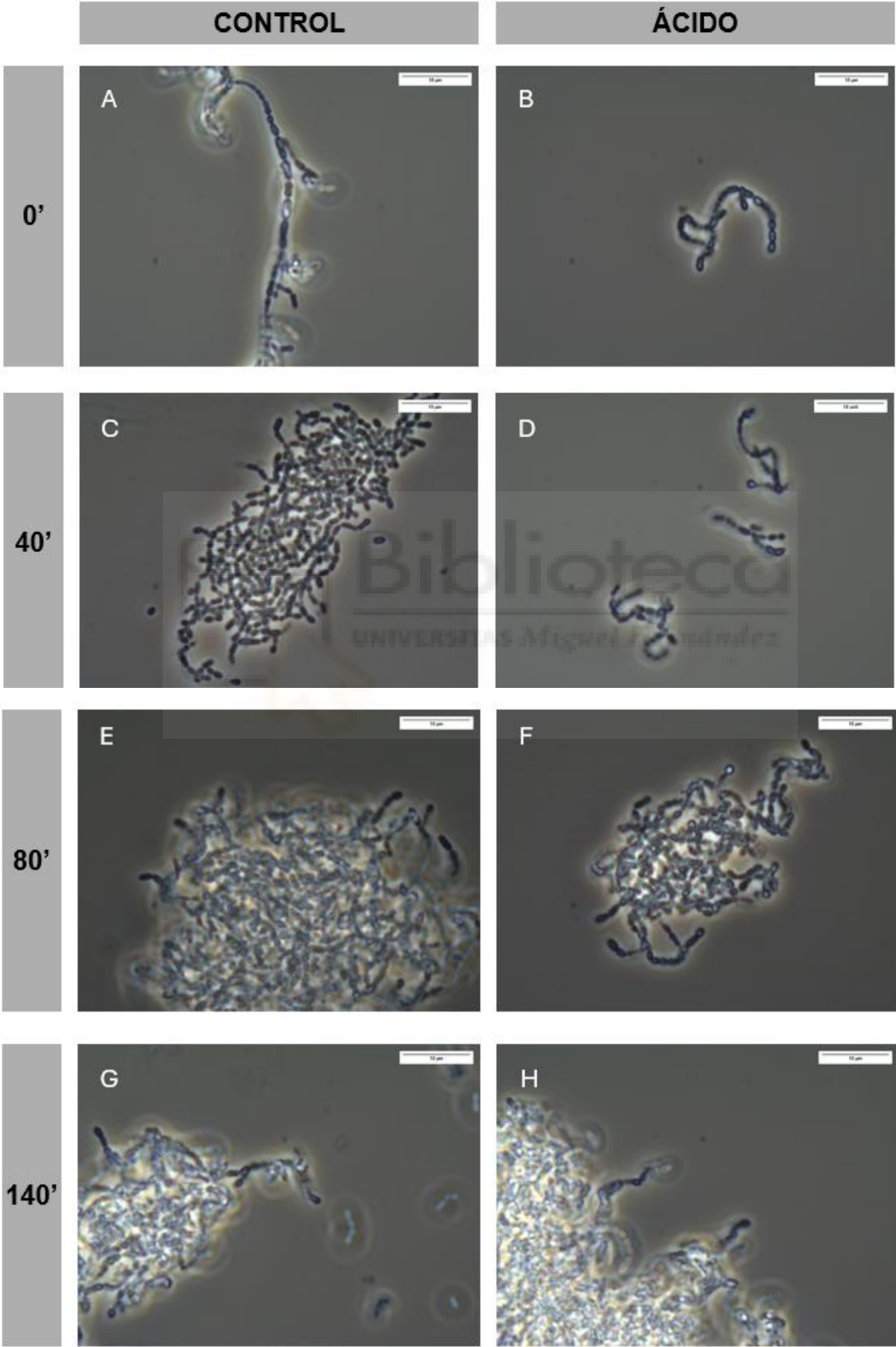


Figura 10: Gráfico comparativo de los recuentos de viables de R6CIB17 a pH 7,44 y pH 5,22 a los 0, 40 y 80 min

– Microscopía óptica R6CIB17 a pH 5,22

Se tomaron muestras para observación microscópica a los siguientes tiempos: 0, 40, 80, 140 y 180 minutos. En la figura 11 observamos las diferencias morfológicas entre el cultivo normal y a pH 5,22. A tiempo 0 las cadenas del medio a pH 7,44 (imagen 11A) son más largas que las de pH 5,22 (imagen 11B). A los 40 minutos, *S. pneumoniae* ha formado flóculos en el medio normal (imagen 11C), los cuales van aumentando su tamaño en los siguientes tiempos. Hasta los 80 minutos no observamos floculación en el cultivo a pH 5,22. Si comparamos las imágenes 11E y 11F, podemos comprobar como los flóculos en medio pH 5,22 son más

pequeños que los formados en pH 7,44. En los tiempos 140 y 180 no observamos diferencias destacables en cuanto a la morfología, pero en el cultivo acidificado hay menor densidad poblacional.



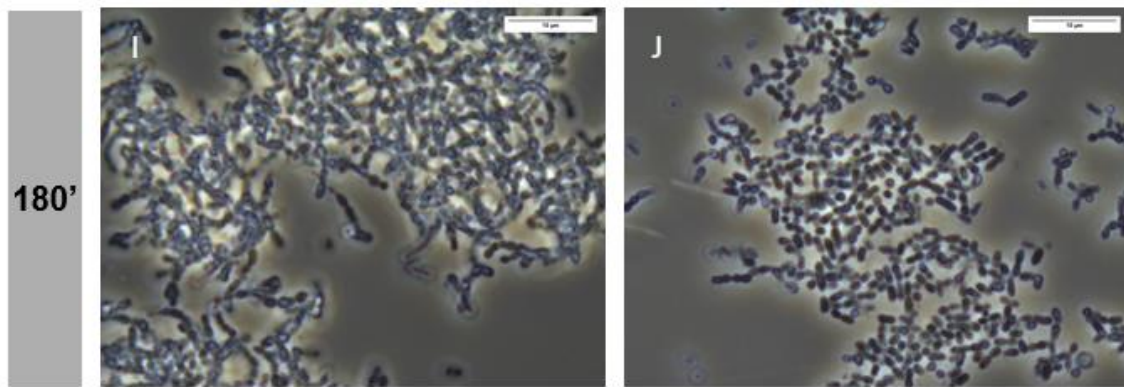


Figura 11: Imágenes de microscopía óptica de R6CIB17 en medio THY normal (pH 7,44) en los tiempos 0 min (imagen A), 40 min (imagen C), 80 min (imagen E), 140 (imagen G) y 180 min (imagen I); y en THY acidificado a pH 5,22 en los tiempos 0 min (imagen B), 40 min (imagen D), 80 min (imagen F), 140 (imagen H) y 180 min (imagen J). La barra blanca de escala de la esquina superior derecha de cada imagen equivale a 10 micrómetros.

4.4. Crecimiento de la cepa M32

Una vez comprobado que *S. pneumoniae* era capaz de crecer a pH 6,44 se planteó repetir los experimentos con una cepa mutante para el gen *lytA*. Para ello incubamos a 37°C cultivos en crecimiento exponencial y fuimos anotando las medidas de la DO_{600} cada 30 min hasta alcanzar los 390 minutos. A partir de este momento pasamos a anotar las medidas cada 20 minutos.

En la curva de crecimiento de la cepa M32 (figura 12) partimos de densidades ópticas muy bajas porque diluimos el cultivo en crecimiento exponencial. Encontramos dos únicas fases. El cultivo se encuentra en fase exponencial hasta que alcanza una densidad óptica de 0,59. En ella, el valor de la velocidad de crecimiento de la cepa mutante ($0,0102 \text{ min}^{-1}$) se encuentra por debajo de la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre. Es en esta fase, cuando la DO_{600} alcanza el valor aproximado de 0,07 (punto marcado con una flecha) donde encontramos una gran diferencia respecto a la cepa silvestre: a simple vista somos capaces de ver como sedimenta el cultivo y nos vimos en la necesidad de agitar los tubos para poder seguir el crecimiento de M32. Posteriormente, encontramos la fase estacionaria en torno a densidades ópticas de 0,59 y 0,89. En esta cepa no se observa fase muerte en el intervalo de tiempo valorado.

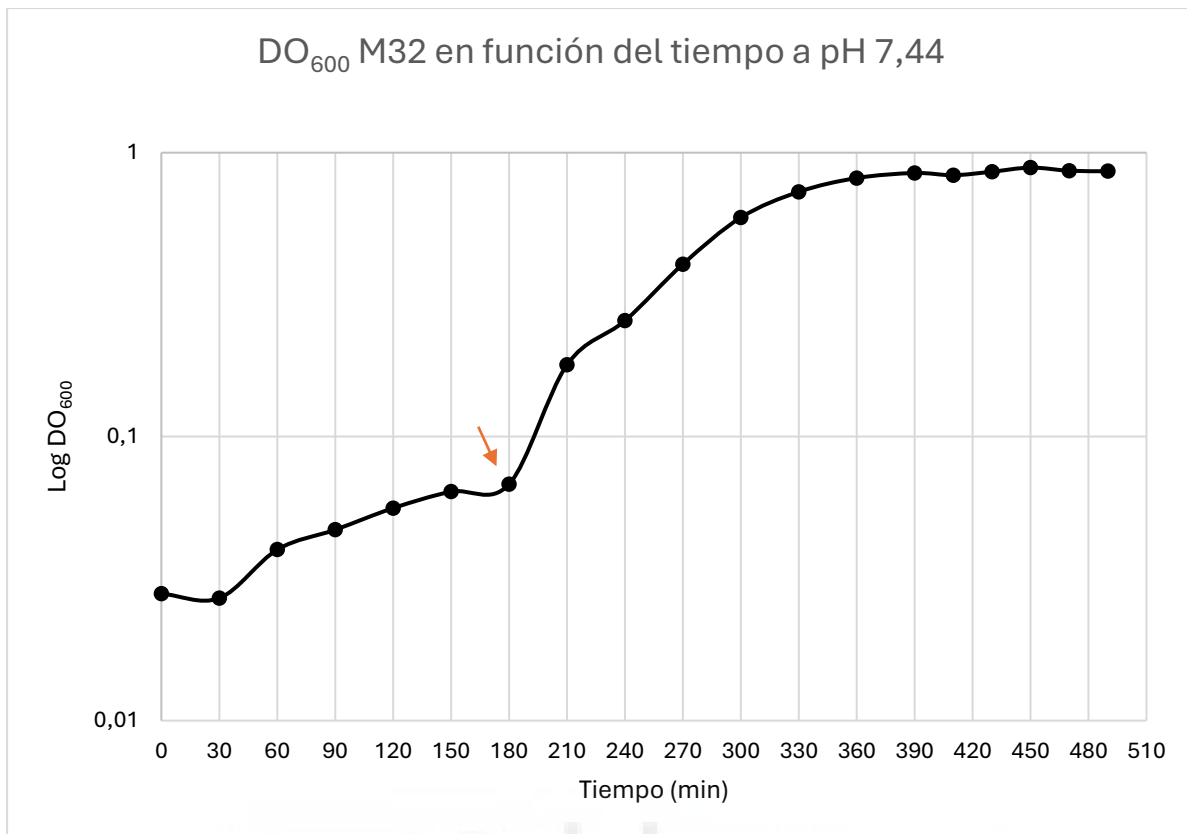


Figura 12: Representación semilogarítmica de la densidad óptica de la cepa M32 en función del tiempo en medio THY con pH 7,44. La flecha indica el punto a partir del cual se comenzó a agitar el cultivo porque comenzaba a flocular.

4.5. Acidificación a pH 6,44 de la cepa M32

– Crecimiento M32 a pH 6,44

Una vez conocido el comportamiento normal de la cepa mutante, pasamos a acidificar el medio. Para mantener el crecimiento exponencial y que el cambio de pH sea instantáneo, diluimos a la mitad un cultivo exponencial que ha alcanzado un valor DO_{600} de 0,4 en un medio THY acidificado y precalentado.

Construimos las curvas de crecimiento de la cepa M32 en medio THY normal (pH 7,44) y acidificado a pH 6,44 de la figura 13 tomando valores de la densidad óptica cada 20 minutos como detallamos en materiales y métodos. Cuando la DO_{600} del cultivo control alcanzó 0,85, comenzamos a observar que el cultivo sedimentaba. Es por ello por lo que, a partir de este punto, señalado en azul en la ilustración 13, agitamos el tubo antes de tomar la medida. Este fenómeno no se observaba en el cultivo acidificado, el cual mostraba la misma DO_{600} agitando y sin agitar.

A continuación, pasamos a describir la curva de crecimiento de ambos cultivos. El control sigue la típica curva de crecimiento bacteriano constituida por una fase de crecimiento exponencial (DO_{600} 0,2-0,8) y una fase estacionaria. En nuestro ensayo no se observa descenso de la densidad óptica hasta los 300 minutos. En contraste, cuando acidificamos el medio a pH 6,44 se observa como el cultivo disminuye su velocidad de crecimiento y alcanza la fase estacionaria a una DO_{600} de 0,5, es decir, menor que la del cultivo control, la cual se alarga hasta el momento en el que finalizamos el experimento. La figura 14 muestra un descenso de la viabilidad celular en ambos intervalos como consecuencia de la bajada del pH. En el intervalo de 0 a 100 minutos la cepa mutante muestra una velocidad de crecimiento de $0,0114 \text{ min}^{-1}$ en el control y $0,0081 \text{ min}^{-1}$ en el acidificado. En el segundo intervalo (100-180 min), muestra $0,0022 \text{ min}^{-1}$ y $0,0016 \text{ min}^{-1}$ respectivamente. Al final del ensayo medimos el pH del cultivo control, el cual alcanzó un pH de 5,01, y del acidificado, 5,10. En los dos cultivos se produjo un descenso del pH, pero el descenso fue más pronunciado en el control.

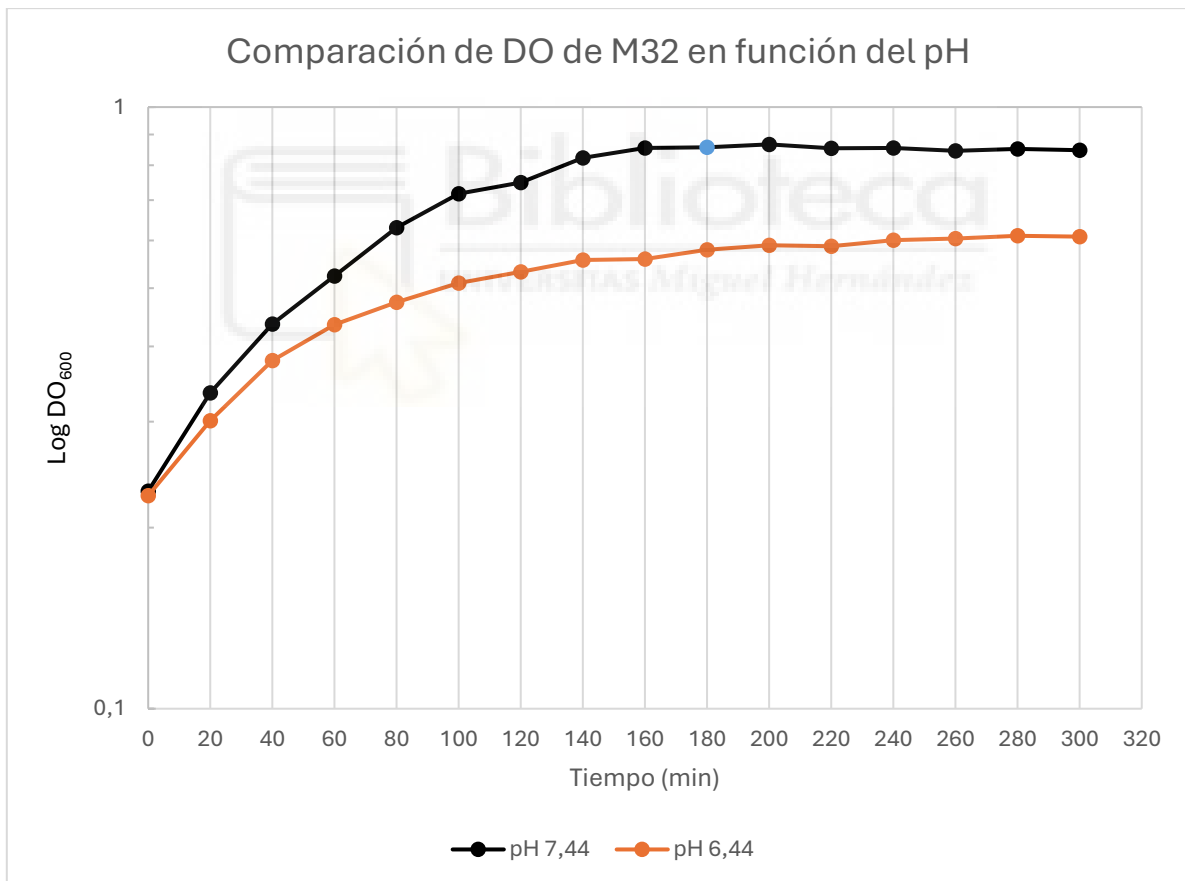


Figura 13: Representación semilogarítmica de la densidad óptica de *S. pneumoniae* M32 en función del tiempo en medio THY con pH 7,44 y 6,44. El punto azul representa la medida a partir de la cual fue necesario agitar antes de tomar la DO_{600} .

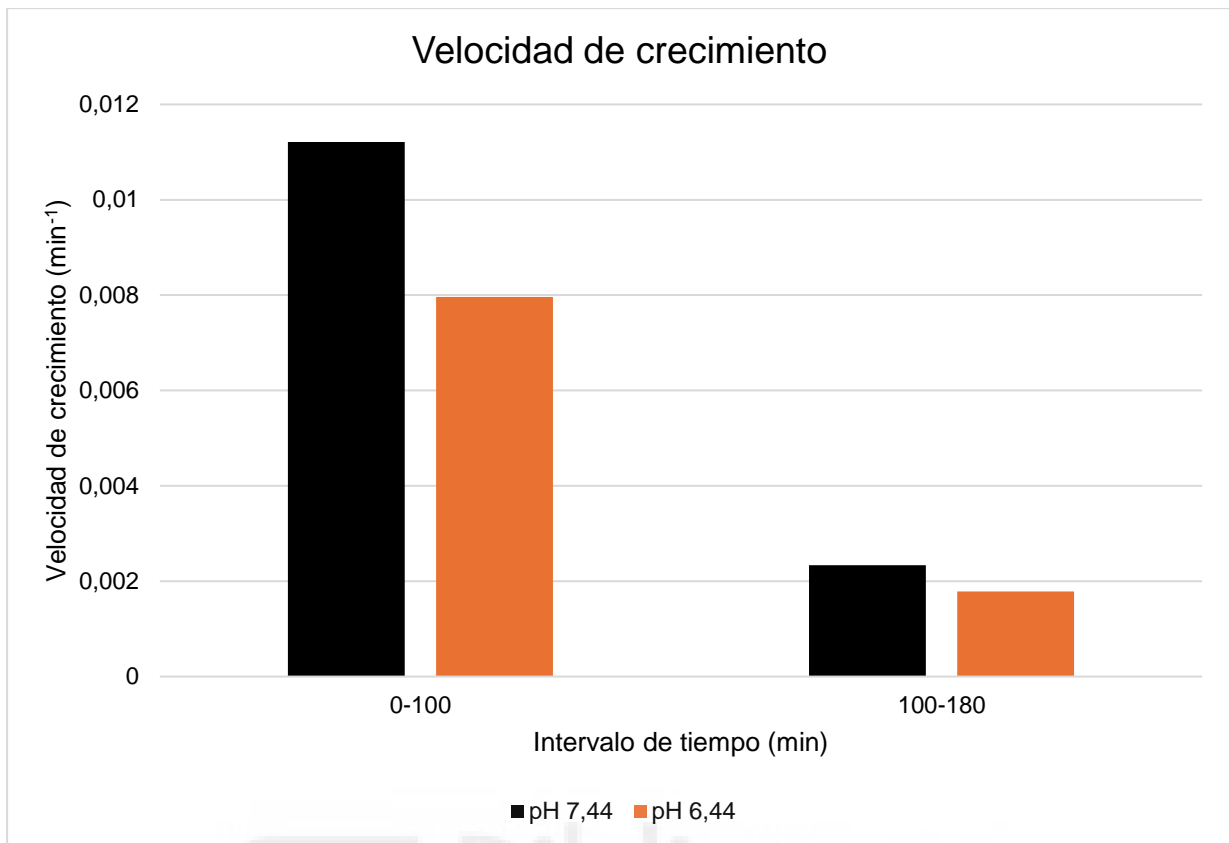


Figura 14: Representación de la velocidad de crecimiento de la cepa M32 en medio THY control y acidificando el medio a pH 6,44. Se ha calculado la velocidad de crecimiento en dos fases del control: fase exponencial de 0 a 100 y fase estacionaria de 100 a 180 minutos.

– Recuento de viables de la cepa M32 a pH 5,22

Al igual que en los ensayos anteriores tomamos muestras de los cultivos en los tiempos 0, 40 y 80 min para comprobar su viabilidad. En esta ocasión, decidimos también tomar muestras a los 160 min porque la velocidad de crecimiento de la cepa mutante es más lenta. El recuento de viables de la figura 15 nos indica que en el cultivo control hay un incremento en los tiempos 0 y 40 minutos. Posteriormente, el número de UFC/ml a 80 minutos parece estabilizarse y a los 160 min se produce un descenso de la viabilidad. En cambio, en medio THY pH 6,44 no hay diferencias notables en el recuento de viables de 0 a 40 min, que podría deberse a que el mutante se está adaptando a la acidificación y en los siguientes intervalos se produce un aumento significativo del número de UFC/ml. Aunque la DO se vea estable a partir de los 60 minutos y la velocidad se vea disminuida notablemente, la acidificación provoca el aumento de la viabilidad celular.

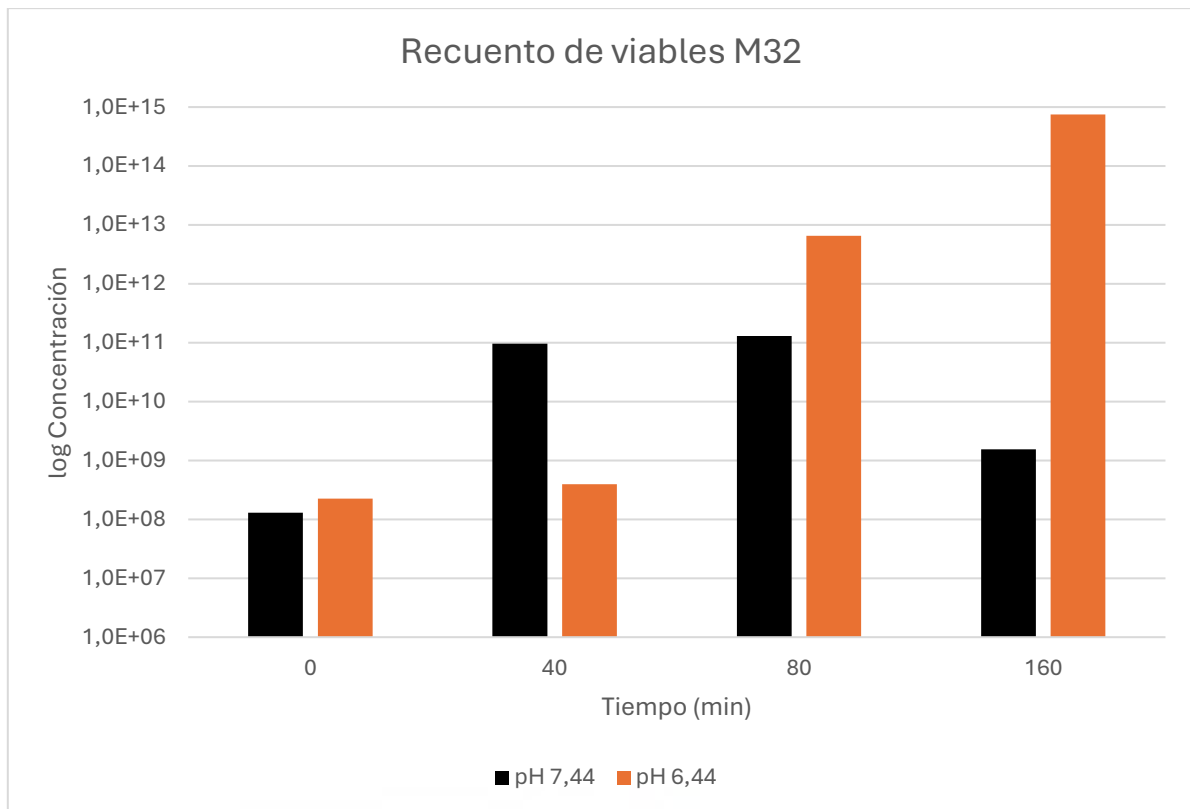


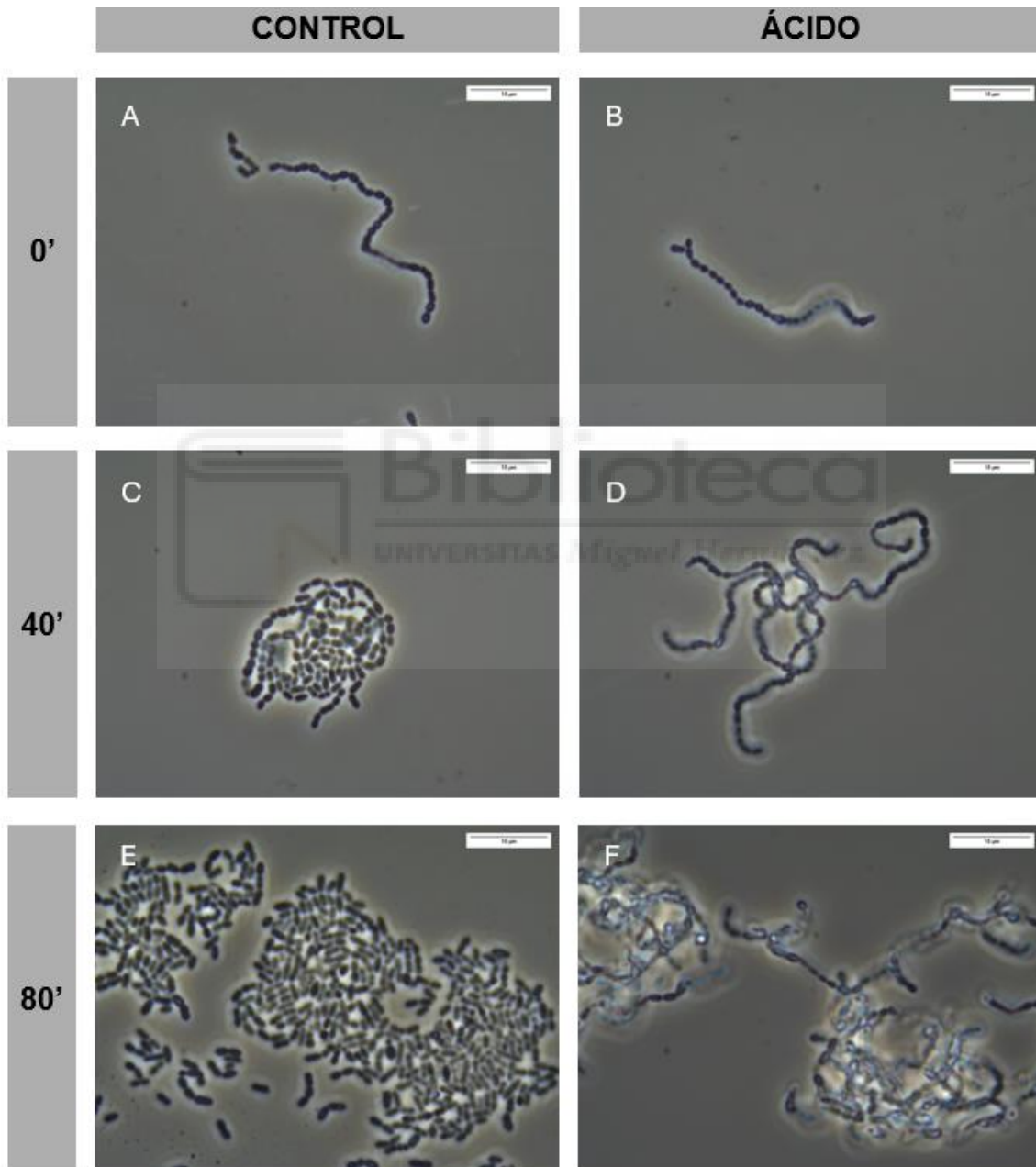
Figura 15: Gráfico comparativo de la concentración de UFC de M32 a escala semilogarítmica a pH 7,44 y pH 6,44 a los 0, 40, 80 y 160 minutos.

– Microscopía óptica M32

Para finalizar el ensayo buscamos diferencias morfológicas y estructurales entre el cultivo control y el acidificado en distintos tiempos. Para ello tomamos muestras a los 0, 40, 80, 160 y 220 min del inicio del experimento y las observamos mediante microscopía óptica (ver Materiales y Métodos). En la columna de la izquierda de la figura 16 se encuentran los resultados en medio THY normal. Inicialmente, imagen 16A, observamos cadenas de diferentes tamaños, por lo general más largas que R6CIB17 y pocos flóculos. En los siguientes tiempos, las cadenas se van alargando y se van formando flóculos. En la imagen 16G podemos ver la magnitud de los flóculos formados a los 160 min. La última muestra fue tomada a los 220 minutos, encontramos flóculos grandes y algunas cadenas cortas que podrían haberse separado del flóculo al homogeneizar para medir la densidad óptica.

En la segunda columna observamos las muestras en pH 6,44. En el tiempo 0 observamos pequeñas agrupaciones. Aumenta la agrupación a lo largo del tiempo (imágenes 16D y 16F). A los 160 minutos observamos largos flóculos como el de la imagen 16H, no los habíamos visto en el cultivo control ni en la cepa silvestre. A los 220 minutos sigue habiendo grandes flóculos y algunas bacterias sueltas, que al igual que en medio normal, parecen haber formado parte de los flóculos y haberse soltado.

Las últimas dos imágenes se corresponden al “overnight”. En el medio normal, imagen 16K vemos grandes flóculos con mal aspecto y cadenas sueltas que aparentemente debían estar vivas. En el medio pH 6,44 las bacterias tienen peor aspecto. Realizamos un recuento de viables para confirmar nuestras sospechas, pero no tuvimos ningún resultado debido a que las placas usadas estaban en mal estado.



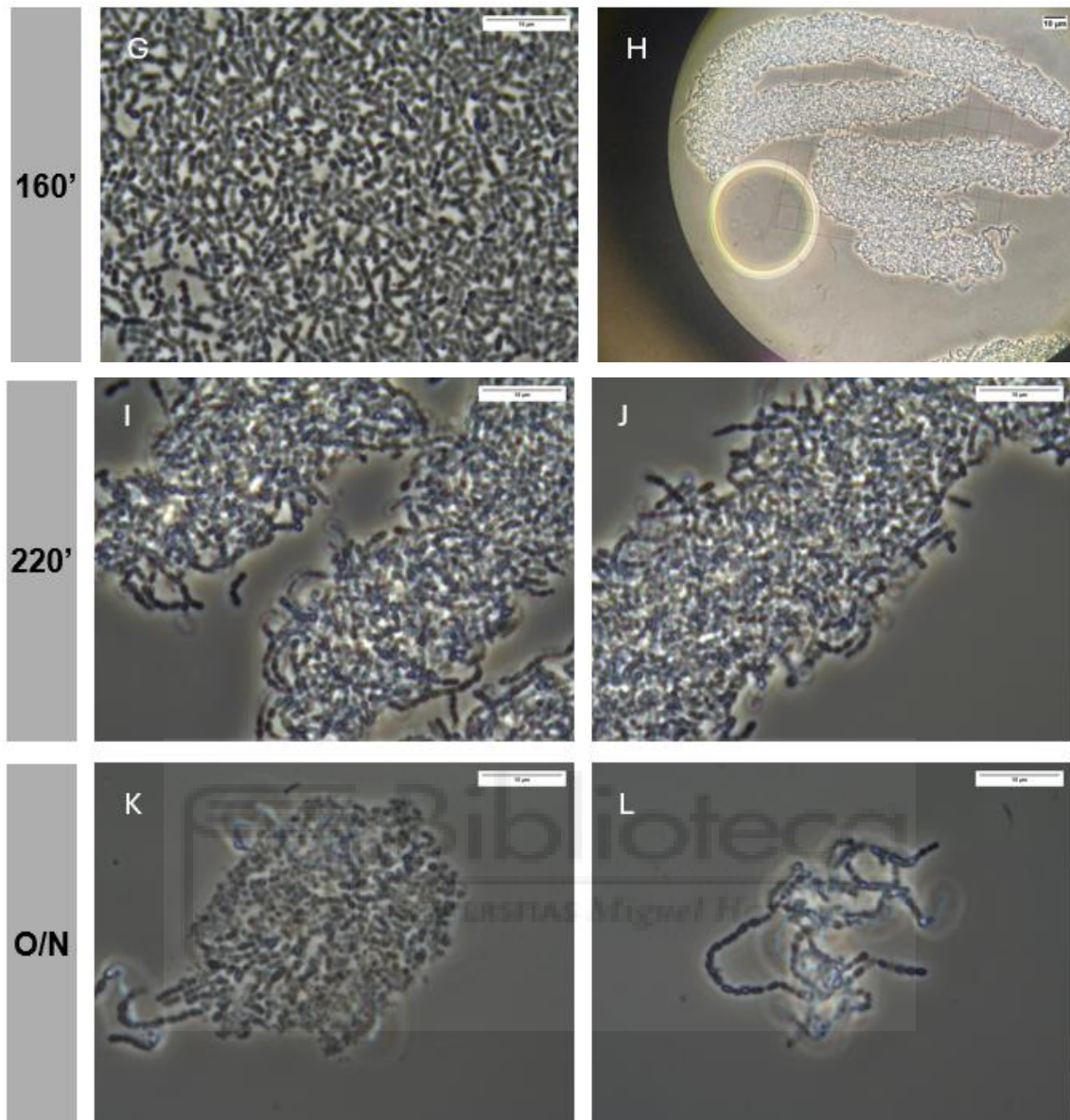


Figura 16: Imágenes de microscopía óptica de M32 en medio THY normal (pH 7,44) en los tiempos 0 min (imagen A), 40 min (imagen C), 80 min (imagen E), 160 (imagen G), 220 min (imagen I) y 24h "overnight" (imagen K); y en THY acidificado a pH 6,44 en los tiempos 0 min (imagen B), 40 min (imagen D), 80 min (imagen F), 160 (imagen H), 220 min (imagen J) y 24h "overnight" (imagen L). En cada imagen se observa una barra blanca en la esquina superior derecha, esta es equivalente a 10 micrómetros.

5. Discusión

Como ya hemos comentado, *Streptococcus pneumoniae* es una de las principales causas de infecciones graves como la neumonía, la meningitis, la sinusitis y la otitis media. La resistencia a diversos antibióticos que ha ido adquiriendo durante los últimos años, así como la dificultad de las vacunas por la variedad de serotipos complican su lucha. Es por ello por lo que es necesaria una investigación exhaustiva que permita encontrar mecanismos que frenen su acción.

En este trabajo hemos comprobado como la acidificación del medio afecta al crecimiento, morfología y viabilidad de la cepa R6CIB17 y de la cepa mutante M32. Estudiar estos efectos es crucial para comprender como se comporta y sobrevive en ambientes ácidos *S. pneumoniae*, proporcionando información sobre su fisiología y mecanismos de resistencia. Y con ello, mejorar el tratamiento y la prevención de las infecciones que causa.

Los ensayos con la cepa R6CIB17 mostraron como la acidificación a pH 6,44 provoca la disminución de la velocidad de crecimiento, pero el aumento de la viabilidad celular. Esta aparente incoherencia se puede explicar por la naturaleza de *S. pneumoniae*. Esta bacteria se agrupa formando cadenas, y gracias a las imágenes de microscopía sabemos que la acidificación del medio supone un retraso en la formación de flóculos, es decir, en el cultivo control las bacterias se agrupan a tiempos más tempranos. Por tanto, el cultivo a pH 6,44 muestra menor DO_{600} porque hay menos bacterias pero el número de células individuales capaces de formar UFC es mayor.

Cuando la bajada del pH de la cepa R6CIB17 alcanza el valor de 5,22, se detiene el crecimiento y se produce un descenso de la viabilidad celular. No se produce autólisis porque no observamos la disminución de la DO_{600} . Destacamos que al inicio (tiempo 0) de estos ensayos la cantidad de UFC/ml es mucho menor en el medio que en el cultivo acidificado. Siguiendo la línea de la explicación del párrafo anterior; la acidificación, en un primer momento, produce la separación de las bacterias, dejan de formar parte de cadenas.

Por otro lado, trabajamos con un mutante que carece de la proteína LytA para ver el efecto de la bajada del pH en ausencia de la neuroamidasa y la diferencia con la cepa silvestre. Hemos comprobado que el crecimiento de la cepa mutante es más lento y esta tiene menor viabilidad. No nos sorprenden estos resultados, ya que como hemos explicado anteriormente, LytA participa en el crecimiento y la división celular. La cepa mutante flocula y sedimenta antes que la cepa silvestre, por ello fue necesario homogeneizar para medir la densidad óptica. Cuando acidificamos el cultivo de esta cepa hasta 6,44, se produce un descenso de la

velocidad de crecimiento y un aumento de la viabilidad debido al retraso en la formación de flóculos. La figura 16 nos muestra cómo mientras que, a pH normal, el mutante M32 comienza a flocular a los 140 minutos, a pH 6,44, parece mantener su viabilidad durante el resto del experimento. Según nuestros resultados, a los 180 min el cultivo acidificado se encuentra en la fase estacionaria y sigue teniendo viabilidad celular. En medio ácido, la cepa M32 no entra en fase muerte en el tiempo medido. Sería interesante hacer un recuento de viables a las 24h del inicio del experimento, el fallo en el que realizamos ha sido una limitación de este proyecto.

Las medidas del pH al final de todos los ensayos nos confirman los resultados de Ronda-Lain et al. (1977). Se ha producido una acidificación del medio debido a que el metabolismo anaeróbico de *S. pneumoniae* produce ácidos orgánicos. Los controles de ambas cepas muestran pH similares una vez finalizado el experimento. Sin embargo, a pH 6,44, la cepa M32 ha disminuido el pH en menor medida que la cepa R6CIB17. Esto puede explicarse comparando los recuentos de viables de ambas cepas (figuras 6 y 15). El mutante tiene un menor número de UFC/ml, lo que implica menor metabolismo y, con ello, menor acidificación del medio. Por último, observamos que, a menor pH inicial, menor es el descenso producido hasta llegar al pH final, siendo la diferencia más destacable la del pH del control en ambas cepas. Además, las muestras de microscopia de las ilustraciones 7 y 11 nos indican que los flóculos se van formando en tiempos más avanzados a medida que disminuimos el pH, es decir, la acidificación retrasa el proceso de floculación. Los trabajos de Ronda-Lain et al. (1977), Piñas et al. (2008) y Cortés et al. (2015) respaldan que un pH subóptimo interfiere en procesos clave de la bacteria, como la organización celular.

Como ya sabemos, la respuesta de la bacteria al estrés ácido varía en función del pH entre mediante la respuesta de tolerancia ácida (ATR) y la autólisis inducida por estrés ácido (ASIL). Si comparamos los efectos de la cepa silvestre a diferentes pH, obtenemos diferentes resultados a los de Piñas et al. (2008), donde se propone que la acidificación del medio a pH inferiores de 5,9 durante más de 1h desencadena una señal que exporta a LytA al compartimento extracelular desencadenando la autólisis. En nuestros ensayos no se ha producido autólisis a pH 6,44 ni a pH 5,22, si no que se ha desencadenado ATR. La diferencia en los resultados puede deberse a las diferencias en la cepa empleada, ellos utilizan R801, o en los procedimientos. En el trabajo de Piñas et al. (2008) decidieron hacer crecer su cepa en el medio neutro, centrifugarla y posteriormente resuspenderla en un medio acidificado; mientras nosotros decidimos únicamente cambiar de pH y diluir. Consideramos que con nuestro método conseguimos que el cultivo siga su crecimiento exponencial, y así, lo hemos demostrado con el control, el cual sigue su crecimiento normal. Además, observamos

resultados similares al acidificar a pH 6,44 ambas cepas, muestran sensibilidades similares y no se activa la autólisis en ninguna cepa.



6. Conclusiones y proyección futura

En este trabajo se ha analizado el efecto de la acidificación del medio para la activación de la autólisis en cultivos de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Gracias a los ensayos a diferentes pH hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- La acidificación del medio hasta 6,44 supone un aumento de la viabilidad celular y una disminución de la velocidad de crecimiento la cepa R6CIB17.

- La acidificación del medio de la cepa R6CIB17 hasta 5,22 provoca la parada del crecimiento celular y la disminución de la viabilidad. Pero no la autólisis.

- Cuando acidificamos el medio de cultivo de la cepa mutante hasta 6,44, se produce un descenso de la velocidad de crecimiento. Se alcanza la fase estacionaria a menor densidad óptica y se mantiene en esta fase hasta el fin del ensayo. Además, supone un aumento de la viabilidad celular.

- La acidificación del medio implica la reducción del tamaño de las cadenas y el retraso en la formación de flóculos.

Continuando con esta línea de investigación sería interesante realizar los experimentos con cepas similares a las que han empleado otros grupos para comprobar si reproducimos los resultados son específicos de la cepa. Así como comprobar nuestra hipótesis midiendo los niveles de expresión y la localización de la proteína LytA. Agregado a lo anterior, sería interesante observar el efecto de la acidificación del medio en la virulencia, la capacidad de formación de biofilms, y la respuesta inmune del hospedador gracias a estudios *in vivo*.

En estudios futuros podrían investigarse otros mecanismos de adaptación al estrés ácido mediante estudios proteómicos y genéticos. De igual manera, podría evaluarse el uso de inhibidores de LytA o agentes acidificantes para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra infecciones por *S. pneumoniae*.

7. Bibliografía

Brooks, L. R. K., & Mias, G. I. (2018). *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Frontiers In Immunology*, 9.

Cortes, P. R., Piñas, G. E., Cian, M. B., Yandar, N., & Echenique, J. (2015). Stress-triggered signaling affecting survival or suicide of *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal Of Medical Microbiology*, 305(1), 157-169.

Ji, H., Zhou, Y., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, F., Bai, J., Li, Q., & Zhang, Z. (2023). Function analysis of choline binding domains (CBDs) of LytA, LytC and CbpD in biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 174, 105939.

Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288-301.

Kim, G., Luong, T. T., Park, S., Lee, S., Ha, J. A., Nguyen, C. T., Ahn, J. H., Park, K., Paik, M., Suhkneung-Pyo, N., Briles, D. E., & Rhee, D. (2017). Inhibition of Autolysis by Lipase LipA in *Streptococcus pneumoniae* Sepsis. *PubMed*, 40(12), 935-944.

Lopez R, Sanchez-Puelles JM, Garcia E, Garcia JL, Ronda C, Garcia P. Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet*. 1986;204(2):237-242.

Piñas, G. E., Cortes, P. R., Orio, A. G. A., & Echenique, J. (2008). Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 154(5), 1300-1308.

Roig-Molina E, Sánchez-Angulo M, Seele J, García-Asencio F, Nau R, Sanz JM, Maestro B. Searching for Antipneumococcal Targets: Choline-Binding Modules as Phagocytosis Enhancers. *ACS Infect Dis*. 2020 May 8;6(5):954-974. doi: 10.1021/acsinfectdis.9b00344. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32135064.

Ronda-Lain, C., Lopez, R., Tapia, A., & Tomasz, A. (1977). Role of the pneumococcal autolysin (murein hydrolase) in the release of progeny bacteriophage and in the bacteriophage-induced lysis of the host cells. *Journal Of Virology*, 21(1), 366-374.

Rubens López, Ernesto García, Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage, FEMS Microbiology Reviews, Volume 28, Issue 5, November 2004, Pages 553–580

Sanchez-Puelles, J. M., Ronda, C., Garcia, J. L., Garcia, P., Lopez, R., & Garcia, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *European Journal Of Biochemistry*, 158(2), 289-293.

Whatmore, A. M., & Dowson, C. G. (1999). The Autolysin-Encoding Gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* Displays Restricted Allelic Variation despite Localized Recombination Events with Genes of Pneumococcal Bacteriophage Encoding Cell Wall Lytic Enzymes. *Infection And Immunity*, 67(9), 4551-4556.

