



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

## **Producción del péptido antibiótico microcina J25 y evaluación de su efecto inhibitorio sobre las cepas de *Escherichia coli*: ATCC 10536, MG1655 y BLR(DE3) NOVAGEN®**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Hidrobiología y Pesquería

### **AUTOR**

Anderson Javier CASTILLA SEDANO

### **ASESORES**

Mg. Patricia Gloria WOLL TOSO

Dr. Daniel GUERRA GIRALDEZ

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Castilla, A. (2021). *Producción del péptido antibiótico microcina J25 y evaluación de su efecto inhibitorio sobre las cepas de Escherichia coli: ATCC 10536, MG1655 y BLR(DE3) NOVAGEN®*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5083-4589">https://orcid.org/0000-0001-5083-4589</a>
DNI o pasaporte del autor	47866835
Código ORCID del asesor	Patricia Gloria Woll Toso <a href="https://orcid.org/0000-0002-1942-0844">https://orcid.org/0000-0002-1942-0844</a> Daniel Guerra Giraldez <a href="https://orcid.org/0000-0002-2410-722X">https://orcid.org/0000-0002-2410-722X</a>
DNI o pasaporte del asesor	Patricia Gloria Woll Toso 10587728 Daniel Guerra Giraldez 10222064
Grupo de investigación	-
Agencia financiadora	Perú Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica - FONDECYT EF-041 - Proyectos de investigación básica y aplicada CONV-000114-2015-FONDECYT-DE
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martin de Porres, Lima, Perú. 12.023998376576996, - 77.05645884575543
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2019 (10 meses)
Disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a> Métodos de investigación bioquímica <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.04">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.04</a> Biología Celular, Microbiología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 17:00 horas del 31 de marzo de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/yvt-emei-own>, el jurado, formado por los profesores que suscriben, dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** de **ANDERSÓN JAVIER CASTILLA SEDANO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200038934, el titulado expuso su tesis: **“PRODUCCIÓN DEL PÉPTIDO ANTIBIÓTICO MICROCINA J25 Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO INHIBITORIO SOBRE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*: ATCC 10536, MG1655 Y BLR(DE3) NOVAGEN®”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: **APROBADO CON MENCIÓN HONROSA**

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** a **ANDERSÓN JAVIER CASTILLA SEDANO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:25 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 31 de marzo de 2021.

**Dr. DÁN VIVAS RUIZ**  
(PRESIDENTE)

**Mg. PATRICIA WOLL TOSO**  
(ASESORA)

  
**Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL**  
(MIEMBRO)

**Blgo. MIGUEL NEIRA GONZALES**  
(MIEMBRO)

## DEDICATORIA

A mi familia, por inspirarme con su sacrificio diario.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Mg. Patricia Woll, por contribuir a mi formación durante mis primeros años en el mundo de la investigación y por las revisiones del proyecto.

Al Dr. Daniel Guerra, gestor del proyecto, por incluirme en el mismo y su apoyo con el aporte de ideas a medida que transcurría el proyecto.

A los profesores Dr. Dan Vivas, Mg. Fernando Merino y Blgo. Miguel Neira por revisar el proyecto y por sus valiosas sugerencias.

A los integrantes del Laboratorio de Moléculas Individuales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por sus consejos y sugerencias.

## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT .....	III
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
a. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS .....	4
i. La crisis de la resistencia a antibióticos .....	4
ii. Efecto sobre las actividades humanas: El caso de la acuicultura y las micobacteriosis .....	4
b. DETECCIÓN DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS.....	6
i. Etapas en el descubrimiento de antibióticos .....	6
ii. Estrategias para la detección de <i>Hits</i> .....	7
c. SISTEMA DE BACTERIAS REPORTERAS .....	8
i. El uso de bacterias reporteras para diversos fines .....	8
ii. Potencial de <i>E. coli</i> como sistema reportero .....	10
d. MICROCINAS .....	11
i. Las Microcinas .....	11
ii. Microcina J25 .....	12
iii. Actividad de la Microcina J25 .....	15
iv. Aplicaciones de la Microcina J25.....	17
III. OBJETIVOS .....	18
a. OBJETIVO GENERAL.....	18
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
IV. HIPOTESIS DE INVESTIGACION .....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
a. MATERIAL BIOLÓGICO .....	19
i. Cepas bacterianas .....	19
b. MATERIAL DE LABORATORIO .....	20
i. REACTIVOS .....	20
ii. MATERIALES.....	20
iii. EQUIPOS .....	21
c. MÉTODOS.....	21

i. Adquisición del plásmido productor pJP73 y transformación del mismo en la cepa productora.....	21
ii. Expresión del péptido antibiótico Microcina J25 a partir del plásmido productor pJP73 .....	22
iii. Demostración de actividad del péptido antibiótico Microcina J25 sobre la cepa indicadora .....	23
iv. Análisis Bioinformático .....	23
VI. RESULTADOS .....	25
a. Confirmación de la presencia del péptido antibiótico Microcina J25.....	25
b. Actividad antibiótica del sobrenadante de cultivo sobre cepa indicadora <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Enteritidis .....	26
c. Prueba antibiótica sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536, MG1655 Y BLR(DE3) NOVAGEN .....	28
d. Estimación de las unidades antibióticas disponibles .....	30
e. Análisis bioinformático.....	33
i. Comparación de secuencia de aminoácidos de las proteínas fhuA, sbmA, tonB, ExbB, ExbD y ARN Polimerasa de las cepas ATCC® 10536™, BLR (DE3) Novagen y MG1655 .....	33
VII. DISCUSIÓN .....	40
VIII. CONCLUSIONES .....	44
IX. RECOMENDACIONES .....	45
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
XI. ANEXOS.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

HTS	<i>High Throughput Screening</i>
MDR	Multidrogoresistente
WHO	<i>World Health Organization</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
NTCT	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
mg	miligramo
µg	microgramo
kDa	kilodalton
AU/mL	Unidades Antibioticas por mililitro
M	Molaridad
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
UV	Ultravioleta
IPTG	Isopropil Tiogalactósido
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
pH	Potencial de hidrógeno
RPM	Revoluciones por minuto
mL	mililitro
µL	microlitro

## RESUMEN

La crisis de resistencia a antibióticos es un problema que afecta tanto el ámbito de salud como el de las actividades productivas tales como la acuicultura. Por ello, es necesario buscar nuevas moléculas inhibitoras con potencial para que sirvan de base al desarrollo de nuevos antibióticos. Una fase importante es el desarrollo de sistemas que permitan ensayar de manera rápida múltiples moléculas candidatas. La presente tesis tiene como objetivo producir el péptido antibiótico Microcina J25 y determinar la susceptibilidad de tres cepas de *Escherichia coli* a este, con el fin de establecer la idoneidad de estas cepas para la construcción de un sistema reportero. La Microcina J25 se obtuvo mediante expresión recombinante e inducción controlada. De las tres cepas evaluadas, solo la cepa ATCC 10536 mostró susceptibilidad al péptido antibiótico. El análisis bioinformático comparativo de las secuencias de las proteínas involucradas en el ingreso de la Microcina J25, FhuA, ExbB, ExbD y TonB, así como el de la subunidad  $\beta'$  de la enzima ARN polimerasa (blanco de la Microcina J25) no revelaron diferencias. Por otro lado, sí se hallaron diferencias en la secuencia de la proteína SbmA, pero la información disponible no permite concluir si estas desigualdades son la causa de la diferencia de susceptibilidad observada. Se concluye que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 10536 es la más apropiada para construir el sistema reportero.

**Palabras Clave:** Sistema Reportero, *Escherichia coli*, Microcina J25, Susceptibilidad. Proteína FhuA, ARN polimerasa.

## ABSTRACT

The antibiotic resistance crisis is a problem that affects both the health field and the productive activities such as aquaculture. Therefore, it is necessary to search for new inhibitory molecules with potential to serve as a basis for the development of new antibiotics. An important phase is the development of systems that allow multiple candidate molecules to be tested rapidly. The objective of the present thesis is to produce the antibiotic peptide Microcin J25 and determine the susceptibility of three strains of *Escherichia coli* to it, in order to establish the suitability of these strains for the construction of a reporter system. Microcin J25 was obtained by recombinant expression and controlled induction. Of the three strains evaluated, only the ATCC 10536 strain showed susceptibility to the antibiotic peptide. The comparative bioinformatic analysis of the sequences of the proteins involved in the entry of Microcin J25, FhuA, ExbB, ExbD and TonB, as well as that of the  $\beta$  'subunit of the enzyme RNA polymerase (target of Microcin J25) did not reveal differences. On the other hand, differences were found in the sequence of the SbmA protein, but the available information does not allow us to conclude whether these inequalities are the cause of the difference in susceptibility observed. It is concluded that the *Escherichia coli* ATCC 10536 strain is the most appropriate to build the reporter system.

**Keywords:** Reporter System, *Escherichia coli*, Microcin J25, Susceptibility, FhuA Protein. RNA Polimerase

## I. INTRODUCCIÓN

El surgimiento de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos se ha convertido en un problema para el tratamiento de muchas enfermedades y ha sido acelerado, en parte, por la ausencia de plataformas y/o estrategias para el descubrimiento de nuevos antibióticos (Lewis, 2013; Ventola, 2015). La consecuencia es que enfermedades antes tratadas exitosamente con antibióticos ya no lo sean. Un ejemplo de esto son las enfermedades causadas por el género de bacterias gram-positivas *Mycobacterium*, responsable de las micobacteriosis no tuberculosas, que afectan negativamente a actividades económicas, como por ejemplo, la pesca y la acuicultura (Lafferty et al., 2015) por ser una de las principales causas de mortalidad en los peces. El uso de antibióticos ha sido una de las principales estrategias para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por *Mycobacterium sp.*, aunque ha visto reducida su eficiencia por la aparición de las cepas resistentes (Gauthier & Rhodes, 2009).

Una de las primeras etapas en el desarrollo de antibióticos corresponde a la evaluación de librerías de compuestos para la obtención de “hits”, moléculas capaces de unirse a una diana molecular vital para el patógeno e inhibir su crecimiento (Hughes & Karlén, 2014). El descubrimiento de nuevos “hits” es importante, teniendo en cuenta el reducido número de moléculas que ingresan a la etapa de ensayos clínicos. Para la obtención de “hits” son necesarios: i) la disponibilidad de una gran cantidad de compuestos, potencialmente inhibidores de una diana molecular específica y ii) el desarrollo de metodologías para la rápida evaluación de estos compuestos sobre tales dianas.

Un tipo de compuestos antimicrobianos atractivo en lo referido a la primera necesidad mencionada líneas arriba son las Microcinas, pues su secuencia está codificada en genes del organismo que las produce (enterobacterias, principalmente *Escherichia coli*) (Duquesne et al., 2007). A partir de la secuencia codificante es relativamente sencillo generar mediante técnicas convencionales de biología molecular una gran cantidad de variantes. La Microcina J25 surge entonces como opción pues su diana molecular, la ARN Polimerasa, es vital en la subsistencia de la célula. Respecto a la segunda necesidad, estrategias de evaluación de moléculas “hit” potenciales que implican el diseño racional de drogas (*rational drug design*) y el barrido de compuestos de alto rendimiento (*High Throughput Screening-HTS*), basados en la identificación de inhibidores de dianas moleculares, que puede denominarse como sistema basado en enzimas libres-*in vitro*, han sido objeto de controversia tanto por su elevado costo como por la poca cantidad de antibióticos útiles obtenidos (Lewis, 2013; Payne et al., 2007).

Una alternativa de bajo costo para el cribado de compuestos consiste en utilizar un sistema de bacterias reporteras (Sergiev et al., 2016), consistiendo este en la bacteria transformada con un plásmido que exprese una diana molecular heteróloga de interés y un elemento regulador asociado (capaz de responder a la actividad de la diana) fusionado a un gen reportero. La exposición de la bacteria reportera al compuesto permitirá determinar si este último fue capaz de inhibir la diana. *Escherichia coli* parece ser adecuada para este fin por la factibilidad de expresión de dianas moleculares de *Mycobacterium* (Banerjee et al., 2014), además de su rápido crecimiento y antecedentes de herramientas de ingeniería genética.

El presente estudio ha permitido determinar si tres cepas de *Escherichia coli*, ATCC 10536, MG1655 Y BLR(DE3) NOVAGEN®, son susceptibles, y por lo

tanto, capaces de internalizar al antibiótico Microcina J25, paso necesario para la construcción de un sistema reportero. Los resultados sugieren que es la cepa *E. coli* ATCC 27853 la única susceptible de inhibición, demostrando así potencial para albergar a dicho sistema reportero.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **a. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

#### **i. La crisis de la resistencia a antibióticos**

La crisis de resistencia a antibióticos implica la aparición y diseminación de bacterias resistentes, también denominadas “multidrogoresistentes”-MDR (Davies, 1996), a los antibióticos utilizados por el ser humano y puede ocasionarse por la modificación de la diana molecular, impidiendo el ingreso del antibiótico o produciendo una enzima capaz de transformar químicamente al compuesto (Aslam et al., 2018). Entre las causas de este fenómeno podemos citar el uso excesivo por parte del ser humano, en actividades económicas y la prescripción inapropiada (Davies, 1996; Ventola, 2015). Las razones antes citadas comparten en común el hecho de que el exceso de antibiótico elimina los organismos sensibles, pero permite a los resistentes sobrevivir y diseminarse como resultado de la selección natural (Ventola, 2015). Por otro lado, este fenómeno se ve agravado por razones como la escasez de nuevas plataformas y/o estrategias para el descubrimiento de nuevos antibióticos (Lewis, 2013; Ventola, 2015).

#### **ii. Efecto sobre las actividades humanas: El caso de la acuicultura y las micobacteriosis**

La aparición de organismos resistentes a antibióticos tiene repercusiones tanto en el campo de la salud (Toner et al., 2015; World Health Organization, 2018) como en las actividades humanas. (FAO, 2016; Lewis, 2013). Por ejemplo, en el caso de la acuicultura, el uso de antibióticos para la promoción del crecimiento,

mas no para el tratamiento de alguna enfermedad, ha propiciado la aparición de patógenos resistentes (Lafferty et al., 2015; Santos & Ramos, 2018). Un caso paradigmático son las enfermedades causadas por el género bacteriano *Mycobacterium*.

El género de bacterias gram-positivas *Mycobacterium* es responsable de enfermedades que afectan poblaciones naturales de organismos marinos y de aguas continentales, denominadas colectivamente Micobacteriosis. La Micobacteriosis ataca a una gran variedad de organismos, entre los que se incluyen peces y moluscos (Gauthier & Rhodes, 2009). Es de distribución global y considerada por la FAO como una de las mayores enfermedades de origen bacteriano que afectan los cultivos de peces, tanto de mar como de agua dulce y con un gran impacto en la economía debido a las pérdidas que ocasiona (Lafferty et al., 2015). Como ejemplo, se puede mencionar el caso de *Cyprinus carpio* (FAO; (Linnaeus, 2012)).

La aparición de cepas de *Mycobacterium* resistentes dificulta el tratamiento de la enfermedad. Respecto a la Micobacteriosis en peces, no hay disponibles muchos tratamientos. El uso de antibióticos no ha tenido mucho éxito debido a la resistencia de las cepas, aunque se ha documentado alguna mejora en el *Danio rerio* (Chang et al., 2017). Debido a las limitaciones de los tratamientos, la destrucción completa de los stocks contaminados ha sido recomendada, así como la desinfección completa de los estanques (Gauthier & Rhodes, 2009).

Se han propuesto alternativas para afrontar esta crisis, tales como un mayor control en la administración de antibióticos (Lee Ventola, 2015) , y el uso de tratamientos alternativos, tales como probióticos (Cruz et al., 2012), vacunas (Somerset et al., 2005), etc. Por otro lado, la búsqueda de nuevos antibióticos sigue siendo una alternativa razonable que debe implementarse en combinación con las estrategias antes mencionadas (Lewis, 2013).

## **b. DETECCIÓN DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS**

### **i. Etapas en el descubrimiento de antibióticos**

El desarrollo pre-clínico de nuevos antibióticos involucra una serie de etapas que podemos delimitar como sigue (Hughes & Karlén, 2014):

- i) La evaluación de una librería de compuestos contra una diana molecular y la declaración del “*hit*”,
- ii) Nominación de molécula “líder” (“lead”)
- iii) Nominación de molécula “candidata” y
- iv) El desarrollo pre-clínico (Hughes & Karlén, 2014).

La primera etapa implica la obtención de una molécula “hit”, siendo ésta un compuesto capaz de unirse a una diana molecular (enzima vital) de un patógeno y potencialmente inhibir el crecimiento de éste. Los procesos de descubrimiento y detección de antibióticos terminan generalmente con un número reducido de antibióticos introducidos en el mercado, y esto se agrava debido a la ausencia de estrategias o plataformas de detección rápida y de bajo costo de moléculas capaces de inhibir dianas moleculares determinadas (Lewis, 2013).

Respecto a las moléculas candidatas a antibiótico, estas deben cumplir, además de ser un compuesto de pequeñas dimensiones, dos criterios: i) tener como diana molecular enzimas críticas en el funcionamiento de la célula, y ii) deben ser moléculas susceptibles a modificación, de manera que se puedan generar variantes con mayor capacidad de inhibición o capaces de inhibir diferentes blancos. Esta última característica permitiría otorgarle propiedades farmacocinéticas deseables o modificaciones que reduzcan su toxicidad sobre el organismo que recibe el tratamiento (Hughes & Karlén, 2014).

## **ii. Estrategias para la detección de *Hits***

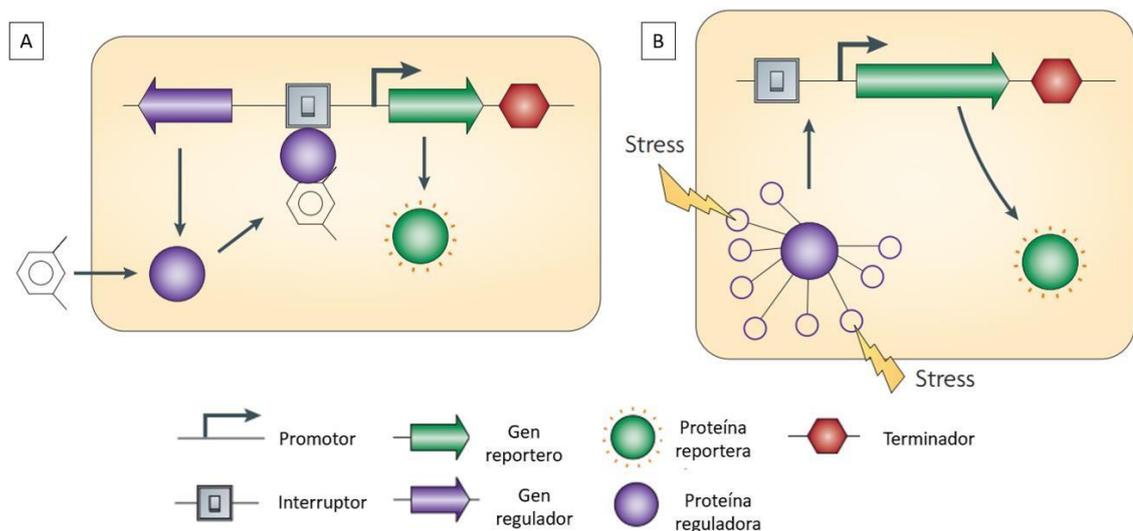
La primera plataforma de descubrimiento de antibióticos fue introducida en los años 40 por Selman Waksman y consistió en el barrido de streptomicetos con actividad antimicrobiana sobre patógenos indicadores. Esta metodología llevó al descubrimiento de la estreptomicina (Schatz et al., 1944). En los años 90, y luego del estancamiento de esta primera plataforma, un enfoque basado en a) primeros genomas secuenciados y publicados, b) la química combinatoria, que permite la obtención de una gran cantidad de moléculas derivadas a partir de un esqueleto común, c) el diseño racional de drogas (*rational drug design*) y d) el barrido de compuestos de alto rendimiento (*High Throughput Screening*-HTS), que está basado en el uso de infraestructura y tecnología para la evaluación de la capacidad inhibidora de una gran cantidad de compuestos, fue utilizado por la industria farmacéutica (Lewis, 2013) y permitió la identificación de inhibidores de dianas moleculares *in vitro*. Podemos considerar a este enfoque como un sistema de detección de antibióticos basado en enzimas “libres”.

Aunque se llegaron a identificar muchos “hits” capaces de inhibir las dianas moleculares de diversos patógenos, dichos compuestos “hit” fueron incapaces de atravesar las barreras celulares de los microorganismos evaluados (Lewis, 2013; Payne et al., 2007). Esta y otras consideraciones incrementan la complejidad del proceso de desarrollo de nuevas moléculas “lead”. La identificación de este problema conllevó a proponer sistemas de HTS basados en células (Zhang et al., 2012), que sí consideran la permeabilidad y toxicidad de los compuestos evaluados. Otras alternativas a los métodos convencionales de HTS, demandantes de gran inversión, que permitan el barrido de una gran cantidad de compuestos a bajo costo han sido propuestas y desarrolladas, dentro de las cuales tenemos a las bacterias reporteras (Sergiev et al., 2016).

### c. SISTEMA DE BACTERIAS REPORTERAS

#### i. El uso de bacterias reporteras para diversos fines

Las bacterias reporteras contienen un circuito genético construido a partir de proteínas reporteras y componentes regulatorios (tales como promotores, operadores, terminadores, etc.). Son capaces de detectar “cambios” en el entorno de la bacteria y responder a estos mediante la emisión de una señal o actividad medible (van der Meer & Belkin, 2010).

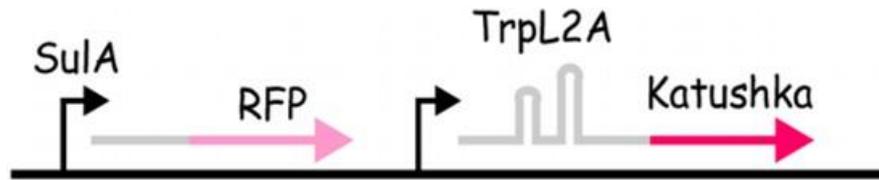


**Figura 1. Dos esquemas simples de diseño de bacterias reporteras.** A) En presencia de un compuesto deseado, una proteína reguladora se une a un interruptor (*switch*) y dirige la expresión de la proteína reportera B) Bacteria reportera capaz de responder a estímulos asociados a estrés que dirigen la expresión de proteína reportera. (Tomado y modificado de Van der Meer & Elkin, 2010).

Las bacterias reporteras se han desarrollado desde la década de los 80. El SOS *Chromotest*, desarrollado en *E. coli* (Quillardet et al., 1982), es uno de los primeros ejemplos de un sistema reportero. Este permite la identificación de compuestos que dañan el ADN, al realizar una fusión entre el promotor del gen

*sfiA* (importante inhibidor de la división celular) y el *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa). La presencia de compuestos perjudiciales para el genoma activa la respuesta SOS que tiene por finalidad la reparación del daño causado. Otra prueba similar es la prueba *Umu* (Oda et al., 1985). Esta prueba utiliza *Salmonella Typhimurium* y la  $\beta$ -galactosidasa está fusionada al promotor del gen *umu*. Es importante mencionar que esta última prueba es una de las pocas que ha alcanzado la estandarización ISO.

Una aplicación de las bacterias reporteras es la detección de compuestos antibióticos (Sergiev et al., 2016). Las bacterias reporteras representan una alternativa eficiente de barrido y detección de compuestos debido a su bajo costo. Inicialmente, fueron diseñados reporteros para la detección de tetraciclinas (Kurittu et al., 2000), macrólidos (Möhrle et al., 2007) o  $\beta$ -lactámicos (Valtonen et al., 2002). Sin embargo, estos sistemas implican el uso de proteínas reguladoras de los genes de resistencia ante las familias de antibióticos respectivos, esto conlleva a que solo sean capaces de responder a un determinado grupo y por ello podemos considerarlos de espectro corto. En *E. coli*, se ha desarrollado un doble reportero capaz de detectar potenciales antibióticos en base a su actividad molecular. Si el compuesto es activador de la respuesta SOS, se expresa el reportero RFP fusionando el promotor del gen de respuesta a SOS *sulA*. Si es un inhibidor de la traducción, se expresa la proteína reportera *katushka2S*, ubicada corriente abajo respecto a una secuencia atenuadora de triptófano modificada (Trlp2A). Tanto la secuencia atenuadora como *katushka2S* se encuentran bajo la expresión de un promotor fuerte T5 (Fig. 2). Ante el estancamiento del ribosoma (*Ribosome stalling*) a nivel de Trlp2A, la secuencia inmediata intercistronica del ARN mensajero correspondiente a *TrpL2A-Katushka* forma un anti-terminador, lo que garantiza la expresión del reportero. (Osterman et al., 2016).



**Figura 2. Esquema del reportero diseñado por Osterman et. al (2016).** Se muestran los promotores en flechas, la secuencia atenuadora de triptófano modificado (TrpL2) en gris y los genes reporteros en colores rosado (RFP) y rojo (Katushka) (Tomado de Osterman, 2016).

## ii. Potencial de *E. coli* como sistema reportero

*E. coli* se sitúa como una clara alternativa para albergar un sistema reportero de detección de inhibidores de dianas moleculares debido a, entre otras cosas, su rápido crecimiento, facilidad en cuanto a cultivo y sus amplios antecedentes de ingeniería genética. Algunas cepas modificadas de *E. coli* que se encuentran disponibles cuentan con mutaciones que incrementan la estabilidad de los plásmidos que puedan introducirse en la cepa (Blount, 2015). Gracias a la ingeniería genética, es posible expresar de manera recombinante enzimas-dianas moleculares procedentes de microorganismos patógenos y confrontarlas con potenciales moléculas inhibitoras en un entorno *in-vivo*. Podemos mencionar a modo de ejemplo las cepas de *E. coli* ATCC 10536, MG1655 y BLR(DE3).

La cepa ATCC®10536™ ha sido utilizada durante años como indicadora de compuestos antibióticos (Alanazi et al., 2016; Bucio-Villalobos & Martínez-Jaime, 2016; Janek et al., 2012; Stansly & Schlosser, 1947), así como cepas de prueba de nuevos métodos de esterilización de alimentos (Briñez et al., 2006; Park et al., 2008). Adicionalmente, el genoma de esta cepa ya ha sido secuenciado y se

encuentra disponible en el repositorio *National Collection of Type Cultures* (NTCT) con el número 10418. Por otro lado, la cepa MG 1655 es derivada de *E. coli* K-12 y que fue la primera cepa de *E. coli* en ser secuenciada (Blattner, 1997). Esta cepa cuenta con mutaciones (tales como *ilvG*, *rfb50* y *rph1*) que aunque no son esenciales, si disminuyen la tasa de crecimiento de la cepa bajo determinadas condiciones (Biryukova et al., 2010). Respecto a biotecnología en esta cepa, se ha reportado la obtención de una variante capaz de utilizar únicamente almidón como fuente de carbono (Rosales-Colunga & Martínez-Antonio, 2014).

La cepa BLR(DE3) es derivada de la BL21(DE3), y es ampliamente usada para la expresión de proteínas recombinantes debido a que posee el gen que codifica para la ARN polimerasa del fago T7 (Studier & Moffatt, 1986). Esto permite la expresión de genes controlados por el promotor T7. La BLR(DE3) cuenta con la ventaja de poseer una mutación el gen *recA* (proteína implicada en la recombinación homóloga), esto posibilita la estabilidad de plásmidos con secuencias repetidas. El genoma de esta cepa ha sido secuenciado y anotado (Goffin & Dehottay, 2017).

#### **d. MICROCINAS**

##### **i. Las Microcinas**

Las Microcinas son un tipo de compuestos de naturaleza peptídica sintetizados por bacterias gram-negativas, específicamente enterobacterias (Duquesne et al., 2007). Se les clasifica como bacteriocinas de bajo peso molecular secretadas en condiciones de estrés y suelen presentar estabilidad a condiciones de alta temperatura y pH extremo. Las Microcinas son péptidos ribosomales

modificados, es decir, mediante la traducción de los respectivos ARN mensajeros, la maquinaria ribosomal sintetiza los precursores de microcinas que son luego modificados por enzimas específicas. El precursor y las enzimas encargadas de la modificación del precursor están codificadas en operones que pueden estar en plásmidos o en el genoma. Las proteínas que confieren inmunidad a la célula productora mediante la secreción de la microcina también se encuentran codificadas en dichos operones (Duquesne et al., 2007).

Existen 15 microcinas descubiertas hasta ahora, y se ha determinado la estructura de 8 de ellas (Rebuffat, 2012). La clasificación implica dos grupos (Baquero et al., 2019):

- Una primera categoría incluye microcinas de hasta 5 kDa de tamaño y que son sometidas a modificaciones postraduccionales tales como la introducción de anillos heterocíclicos (Microcina B17), nucleótidos (Microcina C7/C51) o introducción de enlaces covalentes (Microcina J25).
- Una segunda categoría en la que se incluyen Microcinas de mayor peso molecular (hasta 10 KDa). A su vez esta categoría puede ser subdividida dependiendo si el operón se encuentra en un plásmido o en el cromosoma.

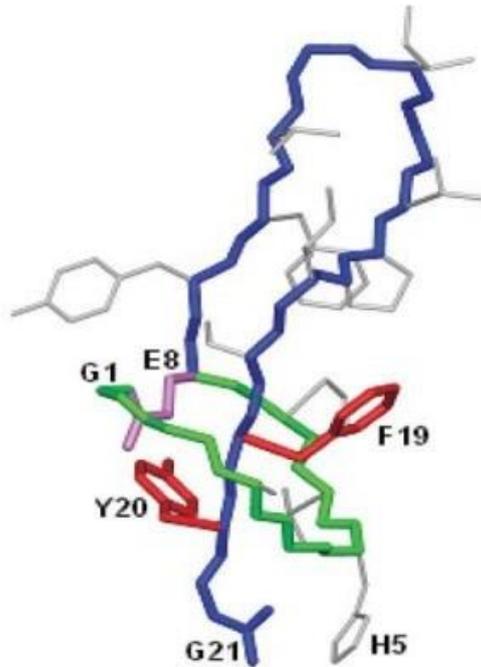
Se ha atribuido a las microcinas funciones ecológicas en el entorno del intestino, demostrándose que participan en la competición inter e intra-específica entre enterobacterias, y se ha sugerido que cumplen un papel en la inhibición de patógenos (Crunkhorn, 2016).

## ii. **Microcina J25**

La Microcina J25 es un péptido ribosomal de 21 residuos de aminoácidos y fue detectada debido a su efecto inhibitorio contra cepas filogenéticamente

relacionadas como *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. La Microcina J25 es producida por cepas de *E. coli* que contienen de manera natural el plásmido pTUC100 y es secretada al medio de cultivo, a partir del cual se purifica (Salomón & Farías, 1992). Se han identificado 4 genes involucrados tanto en la producción como en la exportación de la Microcina J25, denominados *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD* (Solbiati et al., 1996). El primer gen, *mcjA*, codifica el precursor de la Microcina J25 de 58 aminoácidos. El *mcjB* y *mcjC* son necesarios para la producción del péptido activo y maduro. El gen *mcjD* codifica para una proteína exportadora de tipo ABC, que expulsa la Microcina J25 al exterior de la célula productora, confiriéndole así inmunidad.

La Microcina J25 es, además, un péptido de tipo “lasso”, pues presenta un anillo macrolactámico en su estructura, formada por la glicina 1 y el ácido glutámico 8. El anillo es atravesado por la “cola” C-terminal y mantiene su posición debido a impedimentos estéricos (Marvin J. Bayro et al., 2003). Esta peculiar estructura de lazo le brinda a la Microcina características tales como una gran resistencia a variaciones de temperatura, proteasas y demás.



**Figura 3. Estructura tridimensional de Microcina J25.** Se muestra en verde el anillo macrolactámico, en azul los residuos que conforman el lazo y la cola, en violeta el Glutamato en posición 8 que forma el anillo al unirse covalentemente con el extremo amino terminal de la Glicina 1, y en rojo dos tirosinas que fijan la posición del lazo enhebrado en el anillo (Tomado de Duquesne, 2007).

En su ruta de acción antibiótica, la Microcina J25 ingresa del medio exterior al espacio periplásmico a través de la proteína de la membrana externa FhuA (Bonhivers et al., 1998; Destoumieux-Garzón et al., 2005; Salomón & Farías, 1993). FhuA participa en el ingreso de sideróforos tales como el ferrícromo, y también funciona como receptor de los bacteriófagos T1, T5,  $\phi$ 80, UC-1 y bacteriocinas, entre ellas la Microcina J25 (Braun, 2009; Endriß & Braun, 2004). La proteína FhuA está conformada por un monómero que consiste de 22 hojas  $\beta$  antiparalelas que dejan un poro central y el dominio N-terminal, que adopta una estructura globular (denominado 'plug domain', o dominio tapón) y que obstruye el poro (Ferguson et al., 1998). Un aspecto interesante es que la función de FhuA es dependiente de energía, y esta es aportada por el complejo de

membrana TonB-ExbB-ExbD (Killman et al., 2002). La Microcina J25 interacciona con ciertos lazos de la proteína orientados al medio extracelular (Endriß & Braun, 2004). Posteriormente, el componente TonB del complejo de membrana interacciona con el dominio globular de FhuA para desplazarlo del poro y permitir el paso de Microcina J25 al espacio periplásmico. Una vez allí, el péptido antibiótico ingresa al medio intracelular a través de la proteína SbmA.

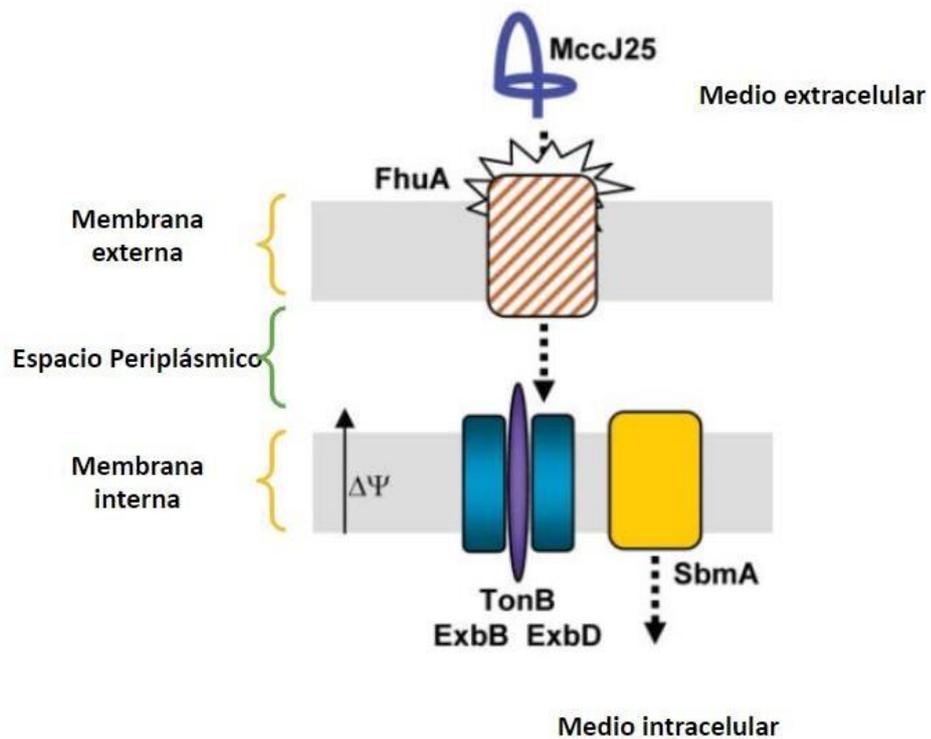


Figura 4. Ingreso de la Microcina J25. Tomado de Duquesne (2007).

### iii. Actividad de la Microcina J25

Aunque la Microcina J25 fue descubierta al evidenciarse su efecto antibiótico sobre distintas cepas de *E. coli*, las pruebas antibióticas llevadas a cabo para confirmar su presencia han sido realizadas usando como cepa indicadora *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Newport o Enteriditis debido a su mayor sensibilidad respecto a *E. coli* (Vincent et al., 2004). Sin embargo, no todas las cepas de *E. coli* utilizadas como indicador de la presencia de MicrocinaJ25 sometidas a una prueba antibiótica han sido susceptibles (Salomón & Farías, 1992).

Se han identificado dos dianas de la Microcina J25 en *E. coli*: la ARN polimerasa (Delgado et al., 2001a) y la proteínas de la cadena respiratoria (Bellomio et al., 2007). La Microcina J25 inhibe la ARN polimerasa al obstruir el canal secundario e impedir el ingreso de nucleótidos al sitio activo del enzima y así evita la transcripción (Braffman et al., 2019; Mukhopadhyay et al., 2004). A diferencia de *E. coli*, donde el blanco principal es la ARN polimerasa, en *Salmonella* Typhimurium tanto la RNA polimerasa como la respiración celular son afectadas (Vincent et al., 2004). En *E. coli*, se ha demostrado que los citocromos  $bo_3$  y bd-I son afectados por el péptido y que, en mutantes para dichos citocromos, la concentración mínima inhibitoria es similar al del *wild-type*, desprendiéndose que su contribución a la susceptibilidad es reducida (Galván et al., 2018) y habiéndose determinado la inhibición de la actividad oxidante del Citocromo bd-I in vitro (Galván et al., 2019).

#### iv. Aplicaciones de la Microcina J25

Años después de su descubrimiento, se han llevado a cabo experimentos para evaluar la funcionalidad de la Microcina J25 en diferentes campos tales como su actividad terapéutica ante cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (Sable et al., 2000; Yu et al., 2020). En otros trabajos, se han obtenido péptidos derivados de la Microcina J25 efectivos contra cepas gram negativas patógenas y baja actividad citotóxica sobre líneas celulares humanas (Tehrani et al., 2019).

La producción de Microcina J25 ha sido optimizada mediante el uso de promotores controlados por sistemas de inducción y la clonación de los genes responsables a plásmidos con diferentes números de copia (Pan et al., 2010). La producción controlada permite obtener buenos rendimientos en la obtención del antibiótico. Aprovechando la naturaleza del precursor de la Microcina J25, ha sido posible generar variantes al modificar su secuencia, obteniéndose variantes con actividad mucho mayor al de la Microcina J25 original (Pan & Link, 2011). Esto es aún una posibilidad abierta, debido al gran número de variantes hipotéticas posibles (librerías de compuestos) que podrían inhibir la ARN polimerasa u otras dianas moleculares de microorganismos patógenos de interés.

### **III. OBJETIVOS**

#### **a. OBJETIVO GENERAL**

- Producir el péptido antibiótico Microcina J25 y determinar su efecto inhibitorio sobre diferentes cepas de *Escherichia coli*.

#### **b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Producir de manera recombinante el péptido antibiótico Microcina J25
- Realizar pruebas antibióticas para determinar la susceptibilidad de tres cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 10536™, BLR (DE3) NOVAGEN y MG1655) a la Microcina J25
- Realizar comparación de secuencias de proteínas involucradas en la susceptibilidad de Microcina J25.

### **IV. HIPOTESIS DE INVESTIGACION**

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC10586, MG1655 y BLR(DE3) NOVAGEN® pueden presentar diferencias de susceptibilidad a Microcina J25.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### a. MATERIAL BIOLÓGICO

#### i. Cepas bacterianas

Las siguientes cepas son de *E. coli* y fueron compradas a New England Biolabs (NEB):

- BL21: Será utilizada como cepa productora del péptido.
- NEB Stable®: Será utilizada para almacenar de manera estable el plásmido pJP73.

Las siguientes cepas de *E. coli* fue obtenida de la empresa Novagen:

- BLR (DE3): Cepa candidata a reportero.

Las siguientes cepas fueron proporcionadas por las entidades indicadas:

- *E. coli* ATCC® 10536™, proporcionada amablemente por el laboratorio de docencia Microbiología de UPCH: Cepa candidata a reportero.
- *E. coli* MG1655, proporcionada por la Universidad de Yale: Cepa candidata a reportero.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Enteritidis (ATCC® 13076™), Propiedad del laboratorio de Moléculas Individuales: Cepa indicadora de la presencia del péptido antibiótico Microcina J25.

## **b. MATERIAL DE LABORATORIO**

### **i. REACTIVOS**

Fueron utilizados: etanol 70° y agua destilada; agar bacteriológico, Medio Luria-Bertani, Sulfato de Magnesio HeptaHidratado, Tiamina, Hidróxido de Sodio, Glucosa, Acido Clorhidrico, Bromuro de Etidio (MERCK); Sales Mínimas M9 5X, Ampicilina (SIGMA); BactoCas-aminoácidos (DIFCO); Glicerol Anhidro (J.T. BAKER); Enzimas de Restricción EcoRI, Hind III, Apal (todas adquiridas a NEW ENGLAND BIOLABS).

### **ii. MATERIALES**

#### **2.1 Para la producción de Microcina J25**

Guantes de Nitrilo, Tubos de prueba de 16\*100 mL con tapa, Gradilla, Placas Petri de vidrio, Asas de siembra, Matraces de 50mL y 250 mL de capacidad, Frascos de vidrio con tapa de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 ml y 1L de capacidad.

#### **2.2 Para la extracción del ADN plasmídico**

Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, Puntas de plástico para pipeta automática de 10, 100 y 1000 µL de capacidad, pipetas automáticas de 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, Táper de plástico, innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytik Jena)

#### **2.3 Para la prueba antibiótica**

Placas Petri, Tubos de prueba de 16x100 mL, Sistema de Baño María.  
Termómetro. Asa de disseminación.

### iii. EQUIPOS

Incubadora a 37°C con agitador, Centrífuga WiseSpin, Centrífuga Sorvall, Nanodrop THERMOFISHER, Fuente de poder, Cámara Electroforética, Transluminador UV, Congeladora -20 °C, Refrigerador 4°C, Rotavapor, Autoclave.

### c. MÉTODOS

#### i. **Adquisición del plásmido productor pJP73 y transformación del mismo en la cepa productora**

El plásmido pJP73, productor de la Microcina J25, fue donado amablemente por el Dr. A. J. Link de la universidad de Princeton (Pan et al., 2010). Fue enviado en agar semisólido y almacenado en la cepa *Escherichia coli* XL1, el cual se sembró en caldo de Luria Bertani para la extracción de plásmido. El plásmido fue extraído utilizando el kit innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytik Jena). Para la determinación de la concentración del plásmido, se utilizó un equipo Nanodrop®. La identidad del plásmido fue confirmada mediante digestión con las enzimas de restricción HindIII, EcoRI y Apa I y verificación de los fragmentos producidos mediante electroforesis. Una vez confirmada la identidad, este fue transformado en la cepa de *E. coli* NEB® Stable Competent (New England Biolabs) para su almacenamiento prolongado, siguiendo el protocolo establecido

en la página web del producto. Finalmente, se transformó el plásmido pJP73 en la cepa *E. coli* BL21 (cepa productora) (New England Biolabs), siguiendo el protocolo establecido por dicha página web.

**ii. Expresión del péptido antibiótico Microcina J25 a partir del plásmido productor pJP73**

La Microcina J25 fue expresada en la cepa productora BL21 utilizando el protocolo sugerido (Pan et al., 2010). Se picó una colonia de la placa de células transformantes BL21 con el plásmido pJP73 y se sembró en 10 mL de medio Luria Bertani con Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, durante 16 horas a 37 °C. Luego, se tomaron 100 µL de este cultivo y se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Luria Bertani y Ampicilina (100 µg /mL). Se permitió el crecimiento del cultivo hasta una densidad óptica (OD600) de 0.5 a 37°C y a 200 RPM. Una vez alcanzado la OD600 de 0.5, se procedió con la inducción, se añadió Isopropil Tiogalactósido (IPTG), para una concentración final de 1 mM. La inducción fue llevada a cabo durante 20 horas. Luego de la inducción, los matraces fueron retirados de la incubadora y el contenido se vertió a dos tubos de polipropileno de 50 ml estériles. Finalmente, estos fueron centrifugados a 7000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se autoclavó a 120 °C durante 15 min para eliminar bacterias viables presentes. Fue almacenado a 4 °C hasta su uso. Para producir un control negativo, se utilizó la misma cepa de BL21 y se la transformó con el plásmido pIA1234, portador de la misma resistencia a antibiótico. Esta bacteria fue luego sometida a todos los procedimientos anteriormente descritos para obtener un sobrenadante sin Microcina J25.

### iii. **Demostración de actividad del péptido antibiótico Microcina J25 sobre la cepa indicadora**

El ensayo utilizado para evaluar cualitativamente la actividad inhibitoria del péptido antibiótico Microcina J25 fue el Agar soft overlay test (Hockett & Baltrus, 2017). En esencia, 10 ml agar-LB semisólido (0.7%) mezclado con  $10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de la cepa indicadora *Salmonella enterica* serovar Enteriditis fueron vertidos sobre una placa que contenía una capa sólida de 20 ml de agar (1.5%)-M9. Luego de la solidificación, alícuotas de 10  $\mu$ l de los sobrenadantes obtenidos (tanto de los cultivos de la cepa transformada con pJP73 así como pIA1234) fueron depositadas sobre la superficie de la capa de agar- LB semisólido que contenía individuos de la cepa indicadora. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 16 horas, la presencia de halos de inhibición indicó la actividad de la Microcina J25. La determinación de actividad de la Microcina J25 sobre las otras cepas indicadoras, fue realizada siguiendo esta misma metodología.

### iv. **Análisis Bioinformático**

Los genomas de las cepas ATCC10536, BLR(DE3) Novagen y MG1655 fueron descargados de las páginas del repositorio ATCC y de GenBank, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas FhuA, TonB, ExbB, ExbC, TonB, Sbm y RpoC fueron identificadas a partir del genoma anotado de BLR(DE3) NOVAGEN y utilizadas para realizar un BLAST al genoma de ATCC 10536 (Altschul et al., 1990). Dado que el genoma de MG1655 ya está anotado, los genes de esta cepa fueron identificados directamente mediante búsqueda por palabra clave y similitud de secuencias.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas descargadas fueron alineadas utilizando el programa T-Coffee (Notredame et al., 2000). Para la visualización de los alineamientos, se utilizó BoxShade (*BoxShade Server*, n.d.).

## VI. RESULTADOS

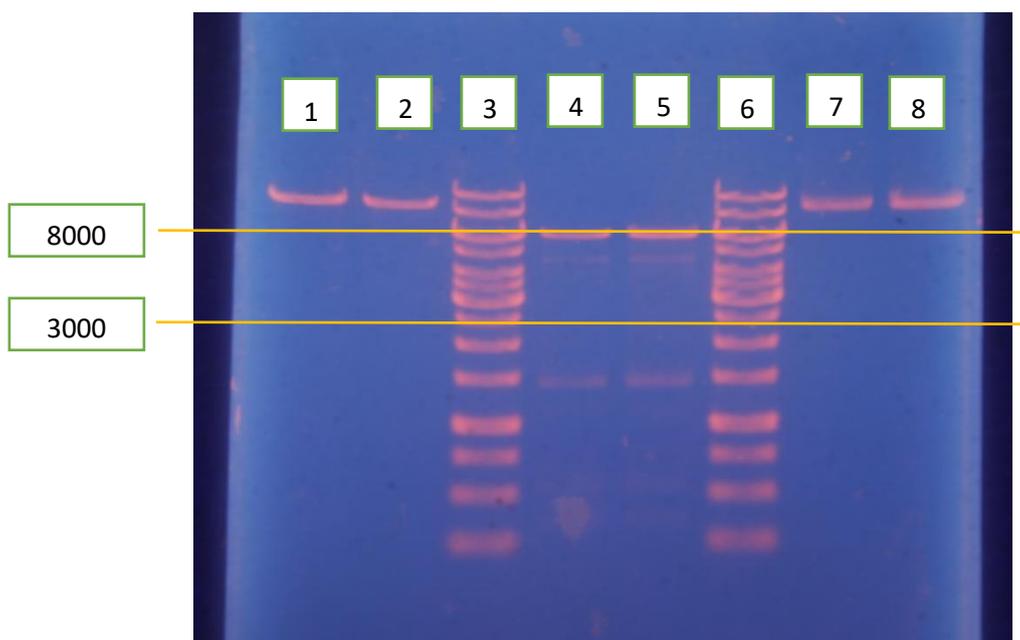
### a. Confirmación de la presencia del péptido antibiótico Microcina J25.

El plásmido productor pJP73 fue extraído de la cepa XL1 donada y se realizó la digestión con tres enzimas de restricción para confirmar la identidad del plásmido pJP73. A partir de la información de Pan (2010), se ha podido elaborar un mapa del plásmido, siendo el tamaño estimado de 8877 pares de bases (pb). (Figura A en Anexo). La digestión con las enzimas teóricamente genera los siguientes tamaños:

Tabla 1. Tamaño de fragmentos esperados de la digestión del plásmido pJP73 con las enzimas de restricción HindIII, EcoRI y Apal

Enzima de restricción utilizada	Número de sitios de corte	Tamaño de fragmentos obtenidos (pb)
HindIII	1	8877
EcoRI	4	6487
		1490
		548
		352
Apal	1	8877

La electroforesis de la comprobación es la siguiente:



**Figura 5. Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra los patrones de restricción del plásmido pJP73.** 1 y 2) Digestión con HindIII. 4 y 5) Digestión con EcoRI. 7 y 8) Digestión con ApaI. 3 y 6) Marcador (Ladder) GeneRuler 1 Kb (Thermo Fisher)

La digestión con las enzimas EcoRI y ApaI generó un fragmento con un tamaño entre 10000 y 8000 pares de bases. La digestión con HindIII generó 4 fragmentos, correspondientes a los tamaños estimados en la tabla 1 (ver tabla 1).

**b. Actividad antibiótica del sobrenadante de cultivo sobre cepa indicadora *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Enteriditis**

Los resultados de la prueba antibiótica sobre la cepa indicadora *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar enteriditis son las siguientes.

Tabla 2. Presencia de halo de inhibición sobre cultivo de cepa indicadora de sobrenadantes de BL21 productora y no productora.

Cepa productora de sobrenadante	Presencia de halo
BL21-pJP73	Si
BL21-pIA1234	No

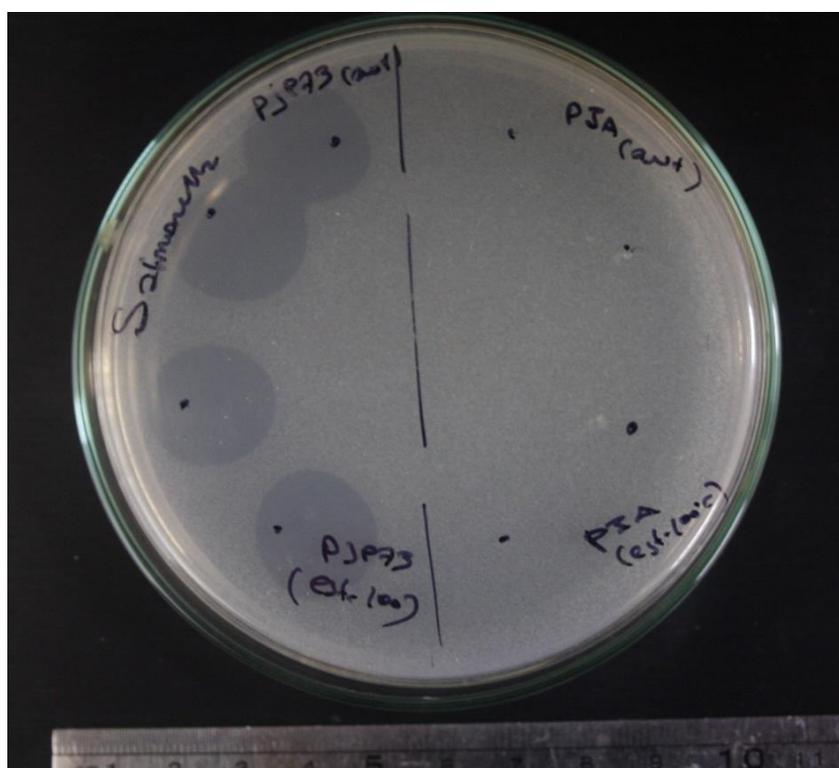


Figura 6. Prueba antibiótica sobre capa de *Salmonella enterica sub. enterica* Serovar Enteritidis ATCC 10736. Sección mitad derecha: La muestra de sobrenadante de BL21- pIA1234 no generó halos de inhibición. Mitad izquierda: La muestra de sobrenadante de BL21- pJP73 generó halos de inhibición (Muestra depositada 10  $\mu$ L)

Se observa que el sobrenadante del cultivo de BL21 transformado con el plásmido pJP73 genera halos de inhibición, en contraste con el sobrenadante de BL21 transformado con el plásmido pIA1234 (no productor).

c. Prueba antibiótica sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 10536, MG1655 Y BLR(DE3) NOVAGEN

Tabla 3. Presencia de halos de inhibición sobre cultivo de cepas de *Escherichia coli* de sobrenadantes de BL21 productora y no productora.

Cepa de <i>E. coli</i>	Presencia de halo
ATCC 10536	Si (n=3)
MG1655	No (n=1)
BLR(DE3)	No (n=1)

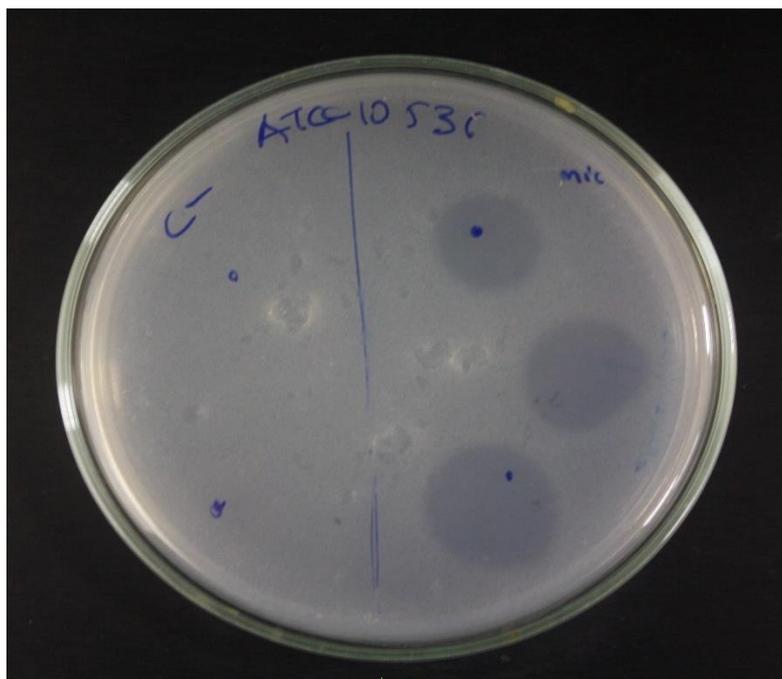
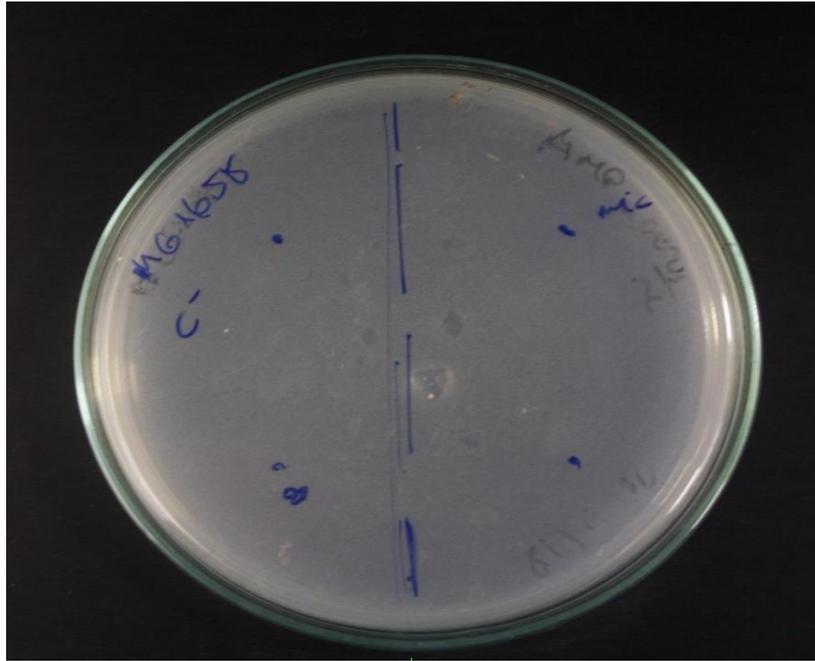
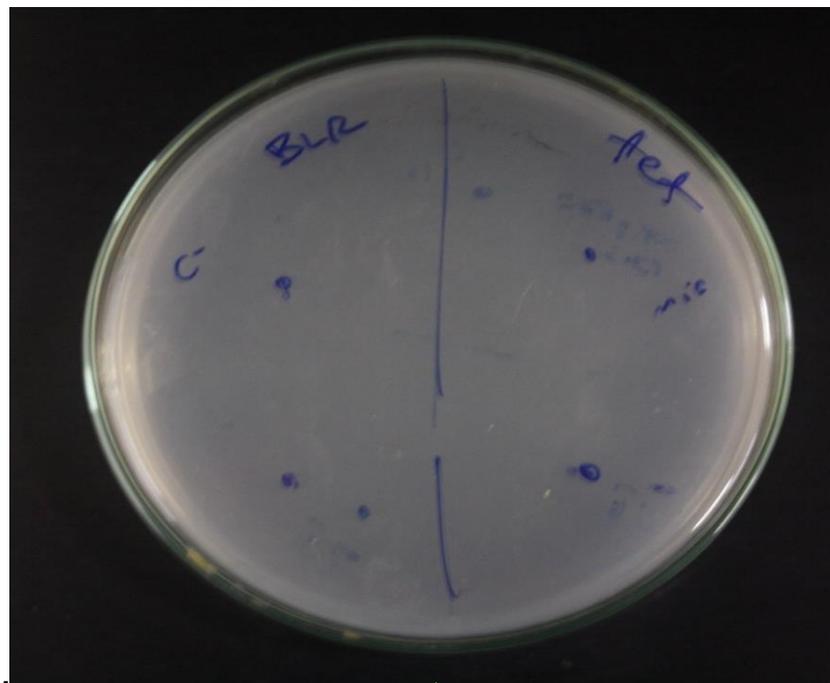


Figura 7. Prueba antibiótica sobre capa de *E. coli* ATCC 10536. Sección mitad izquierda: La muestra de sobrenadante de BL21- pIA1234 No generó halos de inhibición. Mitad derecha: La muestra de sobrenadante de BL21- pJP73 generó halos de inhibición (Muestra depositada 10  $\mu$ L).



**Figura 8. Prueba antibiótica sobre capa de *E. coli* MG1655.** Sección mitad izquierda: La muestra de sobrenadante de BL21- pIA1234 No generó halos de inhibición. Mitad derecha: La muestra de sobrenadante de BL21- pJP73 generó halos de inhibición (Muestra depositada 10 µL)



**Figura 9. Prueba antibiótica sobre capa de *E. coli* BLR(DE3) NOVAGEN.** Sección mitad izquierda: La muestra de sobrenadante de BL21- pIA1234 No generó halos de inhibición. Mitad Derecha: La muestra de sobrenadante de BL21- pJP73 generó halos de inhibición (Muestra depositada 10 µL)

d. Estimación de las unidades antibióticas disponibles.

Tabla 4. Determinación de las unidades antibióticas (AU) por mililitro utilizando como cepas indicadoras ATCC 10536 y *Salmonella enterica sub enterica* Serovar Enteriditis

<b>Cepa indicadora de</b>	<b>Títulos obtenidos</b>
<b>Actividad</b>	<b>(AU/ml)</b>
<b>ATCC 10536</b>	6400
<b><i>Salmonella enterica</i></b>	
<b><i>subp. enterica</i> Serovar</b>	1600
<b>Enteriditis</b>	

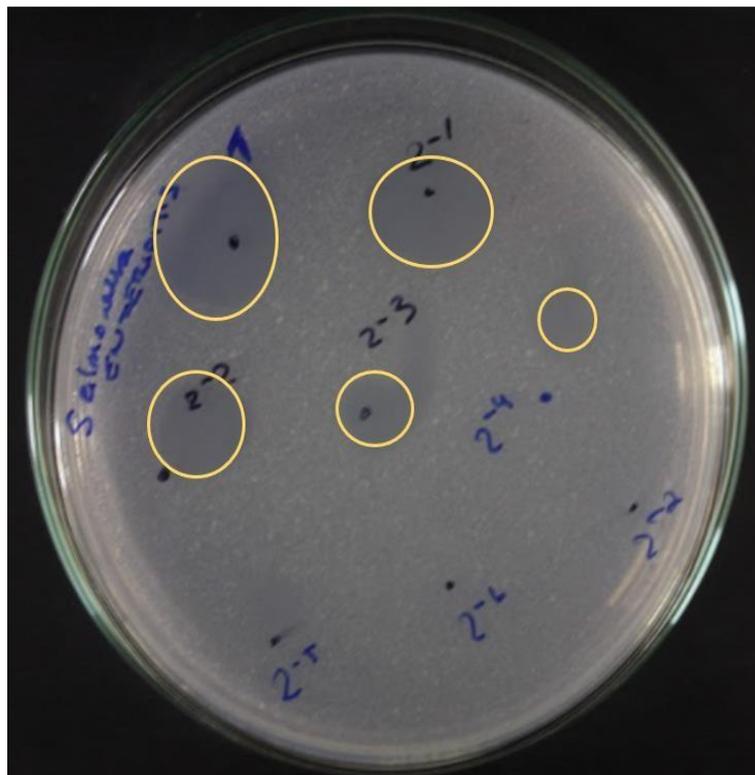
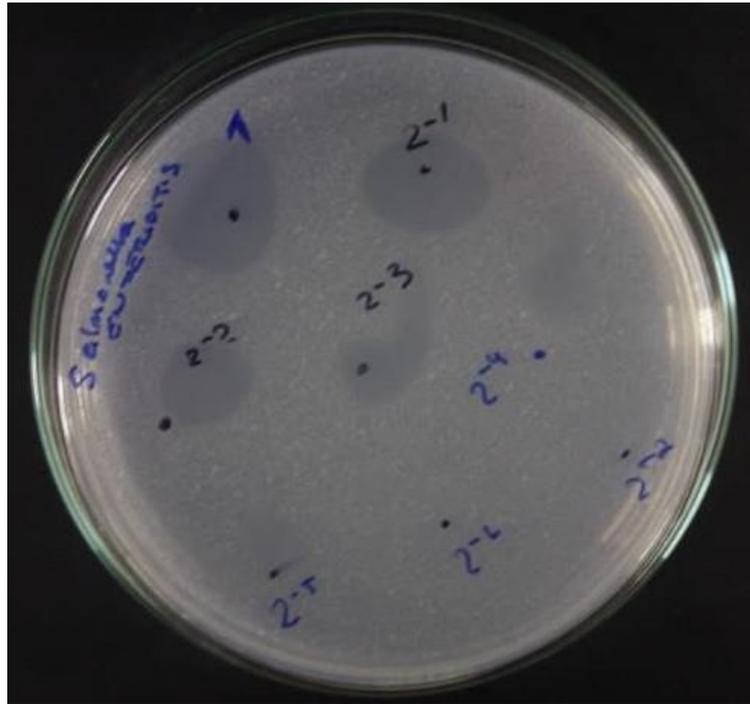
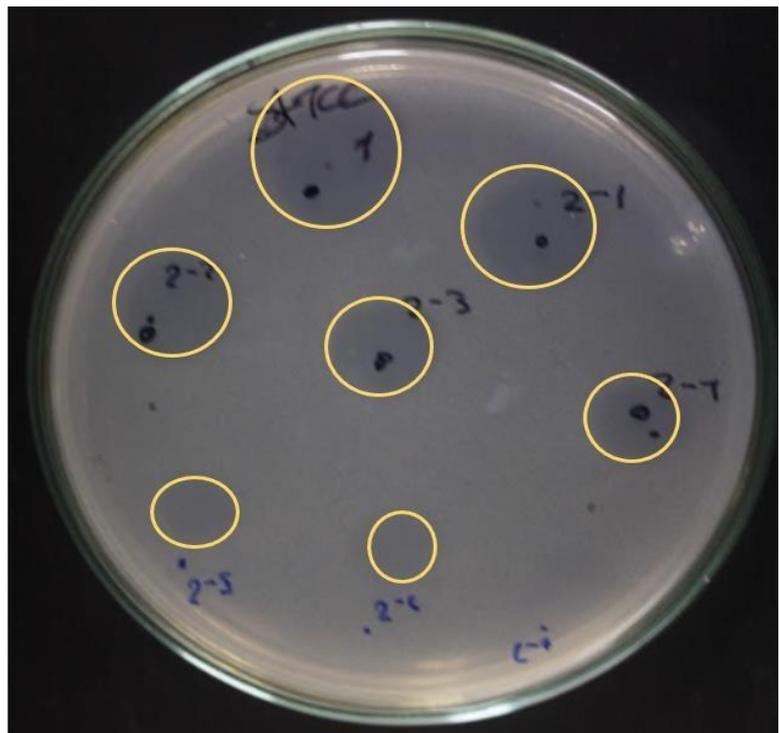
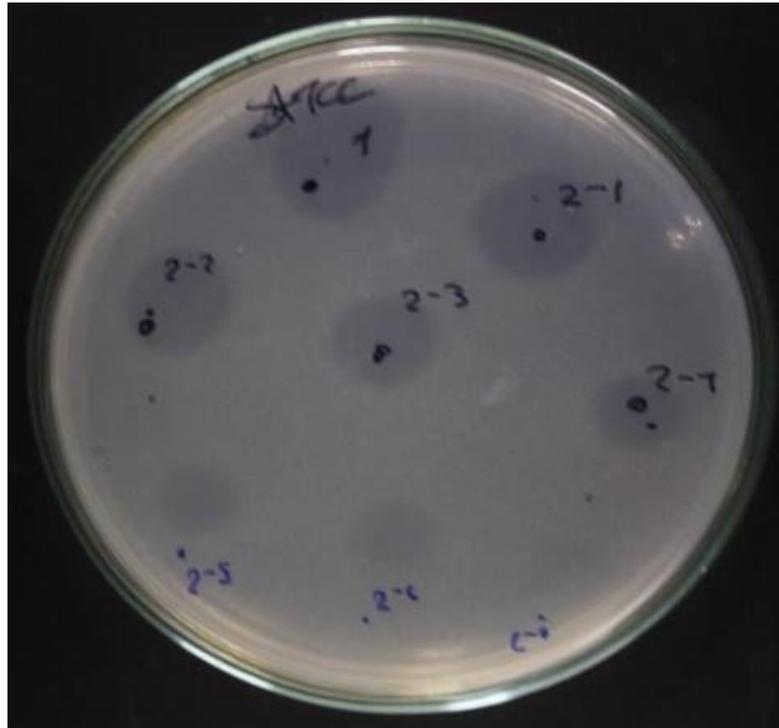


Figura 10. Prueba de determinación de títulos sobre cepa *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. A) Fotografía de prueba antibiótica B) Misma fotografía delineando los halos de inhibición considerados.



**Figura 11. Prueba de determinación de títulos sobre cepa *E. coli* ATCC 10536.** A) Fotografía de prueba antibiótica. B) Misma fotografía, resaltando en círculos los halos de inhibición considerados.

**e. Análisis bioinformático**

**i. Comparación de secuencia de aminoácidos de las proteínas fhuA, sbmA, tonB, ExbB, ExbD y ARN Polimerasa de las cepas ATCC® 10536™, BLR (DE3) Novagen y MG1655**

Con el fin de encontrar posibles explicaciones a las diferencias en susceptibilidad aquí reportadas, se compararon las secuencias de aminoácidos de las proteínas involucradas en la captación de la Microcina J25. Las secuencias pertenecen a las proteínas FhuA, SbmA, TonB, ExbB y ExbD.

• **SbmA**

ATCC10536	1	<u>MFKSFFPKPGAFFLSAFVWALIAVIFWQAGGGDWVARITGASGQIPISAARFWSLDFLIF</u>
BLR (DE3)	1	<u>MFKSFFPKPGAFFLSAFVWALIAVIFWQAGGGDWVARITGASGQIPISAARFWSLDFLIF</u>
MG1655	1	<u>MFKSFFPKPGTFFLSAFVWALIAVIFWQAGGGDWVARITGASGQIPISAARFWSLDFLIF</u>
ATCC10536	61	<u>YAYYIVCVGLFAFFWFIYSPHRWQYWSILGTALIIFVTWFLVEVGVAVNAWYAPFYDLIQ</u>
BLR (DE3)	61	<u>YAYYIVCVGLFAFFWFIYSPHRWQYWSILGTALIIFVTWFLVEVGVAVNAWYAPFYDLIQ</u>
MG1655	61	<u>YAYYIVCVGLFALEWFIYSPHRWQYWSILGTALIIFVTWFLVEVGVAVNAWYAPFYDLIQ</u>
ATCC10536	121	<u>TALSSPHKVTIEQFYREVGVFLGIALIAVVISVLNFFVSHYVFRWRTAMNEYMANWQQ</u>
BLR (DE3)	121	<u>TALSSPHKVTIEQFYREVGVFLGIALIAVVISVLNFFVSHYVFRWRTAMNEYMANWQQ</u>
MG1655	121	<u>TALSSPHKVTIEQFYREVGVFLGIALIAVVISVLNFFVSHYVFRWRTAMNEYMANWQQ</u>
ATCC10536	181	<u>LRHIEGAAQRVQEDTMRFASTLENMGVSFINAIMTLIAFLPVLVTLSAHVPELPIIGHIP</u>
BLR (DE3)	181	<u>LRHIEGAAQRVQEDTMRFASTLENMGVSFINAIMTLIAFLPVLVTLSAHVPELPIIGHIP</u>
MG1655	181	<u>LRHIEGAAQRVQEDTMRFASTLENMGVSFINAIMTLIAFLPVLVTLSAHVPELPIIGHIP</u>
ATCC10536	241	<u>YGLVIAAIVWSLMGTGLLAVVGIKLPGLEFKNQORVEAAYRKELVYGEDDATRATPPTVRE</u>
BLR (DE3)	241	<u>YGLVIAAIVWSLMGTGLLAVVGIKLPGLEFKNQORVEAAYRKELVYGEDDATRATPPTVRE</u>
MG1655	241	<u>YGLVIAAIVWSLMGTGLLAVVGIKLPGLEFKNQORVEAAYRKELVYGEDDATRATPPTVRE</u>
ATCC10536	301	<u>LFSAVRKNYFRLYFHMYFNIRILYLQVDNVFGLFLLFPSIVAGTITLGLMTQITNVFG</u>
BLR (DE3)	301	<u>LFSAVRKNYFRLYFHMYFNIRILYLQVDNVFGLFLLFPSIVAGTITLGLMTQITNVFG</u>
MG1655	301	<u>LFSAVRKNYFRLYFHMYFNIRILYLQVDNVFGLFLLFPSIVAGTITLGLMTQITNVFG</u>
ATCC10536	361	<u>QVRGAFQYLINSWTTLVELMSIYKRLRSFEHELDGDKIQEVTHTLS</u>
BLR (DE3)	361	<u>QVRGAFQYLINSWTTLVELMSIYKRLRSFEHELDGDKIQEVTHTLS</u>
MG1655	361	<u>QVRGAFQYLINSWTTLVELMSIYKRLRSFEHELDGDKIQEVTHTLS</u>

La comparación entre las secuencias de aminoácidos de la proteína SbmA evidencia que el aminoácido 11 y el aminoácido 73 son diferentes en la secuencia de SbmA de la MG1655 respecto a las dos otras (Treonina por Alanina y Leucina por Fenilalanina).

- **FhuA**

ATCC10536	1	MARSKTAQPKHSLRKIAVVVATAVSGMSVYAQAAVEPKEDTITVTAAPAPQESAWGPAAT
BLR (DE3)	1	MARSKTAQPKHSLRKIAVVVATAVSGMSVYAQAAVEPKEDTITVTAAPAPQESAWGPAAT
MG1655	1	MARSKTAQPKHSLRKIAVVVATAVSGMSVYAQAAVEPKEDTITVTAAPAPQESAWGPAAT
ATCC10536	61	IAARQSATGKTDTPIQKVPQISVVTAEEMALHQPKSVKEALSYTPGVS VGTREGASNTY
BLR (DE3)	61	IAARQSATGKTDTPIQKVPQISVVTAEEMALHQPKSVKEALSYTPGVS VGTREGASNTY
MG1655	61	IAARQSATGKTDTPIQKVPQISVVTAEEMALHQPKSVKEALSYTPGVS VGTREGASNTY
ATCC10536	121	DHLIIRGFAAEGSQNNYLNGLKLGQNFYNDVIDPYMLERAEIMRGPVSVLYGKSSPGG
BLR (DE3)	121	DHLIIRGFAAEGSQNNYLNGLKLGQNFYNDAAIDPYMLERAEIMRGPVSVLYGKSSPGG
MG1655	121	DHLIIRGFAAEGSQNNYLNGLKLGQNFYNDVIDPYMLERAEIMRGPVSVLYGKSSPGG
ATCC10536	181	LLNMVSKRPTTEPLKEVQFKAGTDSL FQTGFDFSDSLDDGGVYSYRLTGLARSANAQQKG
BLR (DE3)	181	LLNMVSKRPTTEPLKEVQFKAGTDSL FQTGFDFSDALDDGGVYSYRLTGLARSANAQQKG
MG1655	181	LLNMVSKRPTTEPLKEVQFKAGTDSL FQTGFDFSDSLDDGGVYSYRLTGLARSANAQQKG
ATCC10536	241	SEEQRYAIAPAF TWRPDDKTNFTFLSYFQNEPETGYYGWL PKEGTVEPLPNGKRLPTDFN
BLR (DE3)	241	SEEQRYAIAPAF TWRPDDKTNFTFLSYFQNEPETGYYGWL PKEGTVEPLPNGKRLPTDFN
MG1655	241	SEEQRYAIAPAF TWRPDDKTNFTFLSYFQNEPETGYYGWL PKEGTVEPLPNGKRLPTDFN
ATCC10536	301	EGAKNNTYSRNEKMGVYSFDHEFNDF TTVRQNLRF AENKTSQNSVYGYGVCS DPANAYS K
BLR (DE3)	301	EGAKNNTYSRNEKMGVYSFDHEFNDF TTVRQNLRF AENKTSQNSVYGYGVCS DPANAYS K
MG1655	301	EGAKNNTYSRNEKMGVYSFDHEFNDF TTVRQNLRF AENKTSQNSVYGYGVCS DPANAYS K
ATCC10536	361	QCAALAPADKGHYLARKYVVDDEKLQNF SVDTQLQSKFATGDI DH TLLTGVD FMRMRNDI
BLR (DE3)	361	QCAALAPADKGHYLARKYVVDDEKLQNF SVDTQLQSKFATGDI DH TLLTGVD FMRMRNDI
MG1655	361	QCAALAPADKGHYLARKYVVDDEKLQNF SVDTQLQSKFATGDI DH TLLTGVD FMRMRNDI
ATCC10536	421	NAWFGYDDSVPLLNLYNPVNTDFDFNAKDPANSGPYRILNKQKQTGVYVQDQAQWDKVLV
BLR (DE3)	421	NAWFGYDDSVPLLNLYNPVNTDFDFNAKDPANSGPYRILNKQKQTGVYVQDQAQWDKVLV
MG1655	421	NAWFGYDDSVPLLNLYNPVNTDFDFNAKDPANSGPYRILNKQKQTGVYVQDQAQWDKVLV
ATCC10536	481	TLGGRYDWADQESLNRVAGTTDKRDDKQFTWRGGVNYLFDNGVTPYFSYSESFEPSQVG
BLR (DE3)	481	TLGGRYDWADQESLNRVAGTTDKRDDKQFTWRGGVNYLFDNGVTPYFSYSESFEPSQVG
MG1655	481	TLGGRYDWADQESLNRVAGTTDKRDDKQFTWRGGVNYLFDNGVTPYFSYSESFEPSQVG
ATCC10536	541	KDGNIFAPSKGKQYEVGVKYPEDRPIVVTGAVYNLTKTNNLMADPEGSFFSVEGGEIRA
BLR (DE3)	541	KDGNIFAPSKGKQYEVGVKYPEDRPIVVTGAVYNLTKTNNLMADPEGSFFSVEGGEIRA
MG1655	541	KDGNIFAPSKGKQYEVGVKYPEDRPIVVTGAVYNLTKTNNLMADPEGSFFSVEGGEIRA
ATCC10536	601	RGVEIEAKAALSASVNVVGSYTYTDAEYTTDTTYKGNTPAQVPKHMASLWADYTFDFGPL
BLR (DE3)	601	RGVEIEAKAALSASVNVVGSYTYTDAEYTTDTTYKGNTPAQVPKHMASLWADYTFDFGPL
MG1655	601	RGVEIEAKAALSASVNVVGSYTYTDAEYTTDTTYKGNTPAQVPKHMASLWADYTFDFGPL

ATCC10536 661 SGLTLGTGGRYTGSSYGDPANSFKVGSYTVVDALVRYDLARVGMAGSNVALHVNNLFDRE  
 BLR (DE3) 661 SGLTLGTGGRYTGSSYGDPANSFKVGSYTVVDALVRYDLARVGMAGSNVALHVNNLFDRE  
 MG1655 661 SGLTLGTGGRYTGSSYGDPANSFKVGSYTVVDALVRYDLARVGMAGSNVALHVNNLFDRE

ATCC10536 721 YVASCFNLYGCFWGAERQVVATATFRF  
 BLR (DE3) 721 YVASCFNLYGCFWGAERQVVATATFRF  
 MG1655 721 YVASCFNLYGCFWGAERQVVATATFRF

La comparación entre las secuencias de aminoácidos de la proteína FhuA muestra que la cepa BLR(DE3) NOVAGEN difiere de las otras dos cepas en los aminoácidos 153 (Alanina en lugar de Valina) y 216 (Alanina en lugar de Serina)

- **TonB**

ATCC10536 1 MTLDLPRRFPWPTLLSVCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPI SVTMVAPADLEPPQA  
 BLR (DE3) 1 MTLDLPRRFPWPTLLSVCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPI SVTMVTPADLEPPQA  
 MG1655 1 MTLDLPRRFPWPTLLSVCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPI SVTMVTPADLEPPQA

ATCC1053 61 VQPPPEPVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVEKPKPKPKPKPKPKVKKVQEQPKRDIKPVESR  
 BLR (DE3) 61 VQPPPEPVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVEKPKPKPKPKPKPKVKKVQEQPKRDV KPVESR  
 MG1655 61 VQPPPEPVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVEKPKPKPKPKPKPKVKKVQEQPKRDV KPVESR

ATCC1053 121 PASPFENTAPARLTSSTATAATSKPVT SVASGPRALSRNQPOYPARAQALRIEGQVKVKF  
 BLR (DE3) 121 PASPFENTAPARPTSSTATAATSKPVT SVASGPRALSRNQPOYPARAQALRIEGQVKVKF  
 MG1655 121 PASPFENTAPARLTSSTATAATSKPVT SVASGPRALSRNQPOYPARAQALRIEGQVKVKF

ATCC1053 181 DVTPDGRVDNVQILSAKPANMFEREVKNAMRRWRYEPGKPGSGIVVNILFKINGTTEIQ  
 BLR (DE3) 181 DVTPDGRVDNVQILSAKPANMFEREVKNAMRRWRYEPGKPGSGIVVNILFKINGTTEIQ  
 MG1655 181 DVTPDGRVDNVQILSAKPANMFEREVKNAMRRWRYEPGKPGSGIVVNILFKINGTTEIQ

La comparación entre las secuencias de la proteína TonB muestra que la cepa ATCC 10536 se diferencia de las otras dos en los aminoácidos 51 (Alanina por Treonina) y 114 (Isoleucina por Valina). BLR(DE3) NOVAGEN difiere de las otras dos cepas en los aminoácidos 133 (Prolina en lugar de Leucina).

- **ExbB**

ATCC10536	1	VGNMLMQTDLSVWGMYPHADIVVKCVMIGLILASVVTWAIFFSKSVEFFNQKRLKREQQ
BLR (DE3)	1	MGNMLMQTDLSVWGMYPHADIVVKCVMIGLILASVVTWAIFFSKSVEFFNQKRLKREQQ
MG1655	1	MGNMLMQTDLSVWGMYPHADIVVKCVMIGLILASVVTWAIFFSKSVEFFNQKRLKREQQ
ATCC10536	61	LLAEARSLNQANDIAADFGSKSLSLHLLNEAQNELELSEGSDDNEGIKERTSFRLEERRVA
BLR (DE3)	61	LLAEARSLNQANDIAADFGSKSLSLHLLNEAQNELELSEGSDDNEGIKERTSFRLEERRVA
MG1655	61	LLAEARSLNQANDIAADFGSKSLSLHLLNEAQNELELSEGSDDNEGIKERTSFRLEERRVA
ATCC10536	121	AVGRQMGRGNGYLATIGAI SPFVGLFGTVWGI MNSFIGIAQTQTTNLAVVAPGIAEALLA
BLR (DE3)	121	AVGRQMGRGNGYLATIGAI SPFVGLFGTVWGI MNSFIGIAQTQTTNLAVVAPGIAEALLA
MG1655	121	AVGRQMGRGNGYLATIGAI SPFVGLFGTVWGI MNSFIGIAQTQTTNLAVVAPGIAEALLA
ATCC10536	181	TAIGLVAAIPAVVIYNV FARQIGGFKAM LGDVAAQVLL LQSRDL DLEASAAAHPVRVAQK
BLR (DE3)	181	TAIGLVAAIPAVVIYNV FARQIGGFKAM LGDVAAQVLL LQSRDL DLEASAAAHPVRVAQK
MG1655	181	TAIGLVAAIPAVVIYNV FARQIGGFKAM LGDVAAQVLL LQSRDL DLEASAAAHPVRVAQK
ATCC10536	241	LRAG
BLR (DE3)	241	LRAG
MG1655	241	LRAG

La comparación entre las secuencias de la proteína ExbB muestra una única diferencia correspondiente al aminoácido 1, en el cual la cepa ATCC 10536 presenta una Valina y las otras dos cepas (BLR(DE3) NOVAGEN y MG1655), Metionina.

- **ExbD**

ATCC10536	1	MAMHLNENLDDNGEMHDINVT PFI DVMLVLL I IFMVAAPLATVDVKVNL PASTSTPQPRP
BLR (DE3)	1	MAMHLNENLDDNGEMHDINVT PFI DVMLVLL I IFMVAAPLATVDVKVNL PASTSTPQPRP
MG1655	1	MAMHLNENLDDNGEMHDINVT PFI DVMLVLL I IFMVAAPLATVDVKVNL PASTSTPQPRP
ATCC10536	61	EKPVYLSVKADNSMFIGNDPVTDE TMI TALNALTEGKKDTT IFFRADKTVDYETLMKVMD
BLR (DE3)	61	EKPVYLSVKADNSMFIGNDPVTDE TMI TALNALTEGKKDTT IFFRADKTVDYETLMKVMD
MG1655	61	EKPVYLSVKADNSMFIGNDPVTDE TMI TALNALTEGKKDTT IFFRADKTVDYETLMKVMD
ATCC10536	121	TLHQAGY LKIGLVGEETAKAK
BLR (DE3)	121	TLHQAGY LKIGLVGEETAKAK
MG1655	121	TLHQAGY LKIGLVGEETAKAK

La comparación entre las secuencias de la proteína ExbD no muestra diferencias en la secuencia de aminoácidos de las tres cepas.

- **ARN Polimerasa**

La comparación entre las secuencias de la subunidad  $\beta'$  de la ARN Polimerasa muestra una única diferencia correspondiente al aminoácido 1, en el cual la cepa ATCC 10536 presenta una Valina y las otras dos cepas (BLR(DE3) NOVAGEN y MG1655), Metionina.

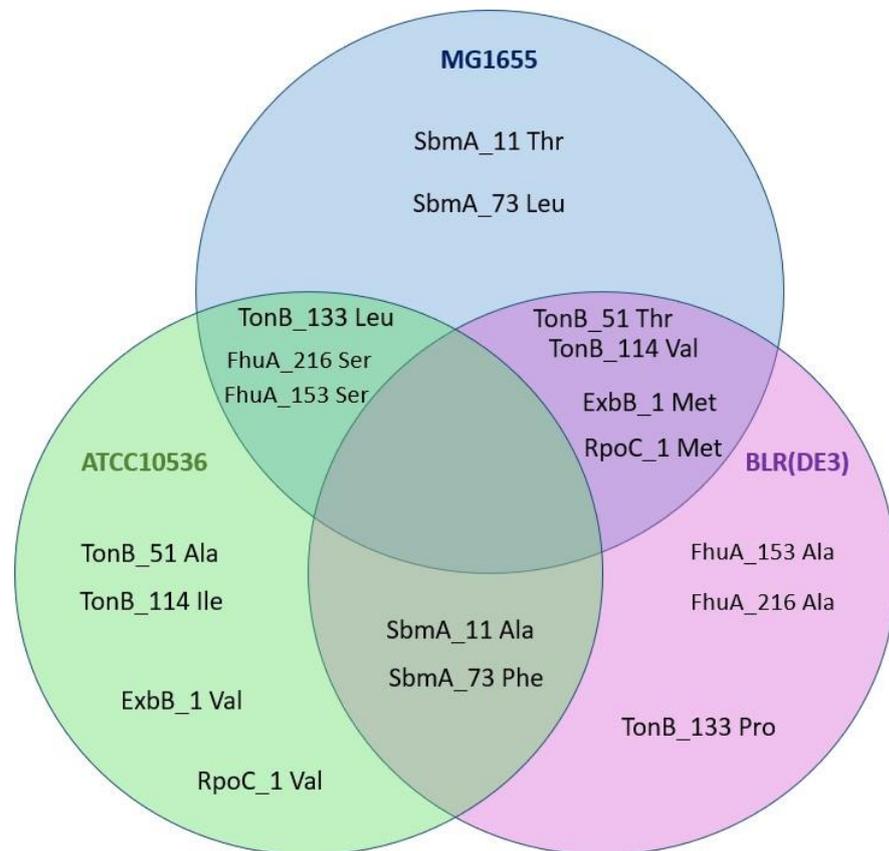
ATCC10536	1	VKDLLKFLKAQTKTEEFDAIKIALASPD MIRSWSFGEVKKPETIN YRTFKPERDGLFCAR
BLR (DE3)	1	MKDLLKFLKAQTKTEEFDAIKIALASPD MIRSWSFGEVKKPETIN YRTFKPERDGLFCAR
MG1655	1	MKDLLKFLKAQTKTEEFDAIKIALASPD MIRSWSFGEVKKPETIN YRTFKPERDGLFCAR
ATCC10536	61	IFGPVKDYECLCGKYKRLKHRGV ICEKCGVEVTQTKVRRERMGHIELASPTAH IWF LKSL
BLR (DE3)	61	IFGPVKDYECLCGKYKRLKHRGV ICEKCGVEVTQTKVRRERMGHIELASPTAH IWF LKSL
MG1655	61	IFGPVKDYECLCGKYKRLKHRGV ICEKCGVEVTQTKVRRERMGHIELASPTAH IWF LKSL
ATCC10536	121	PSRIGLLLDMP LRDIERVLYFESYVVIEGGMTNLERQQILTEEQYLDAL EEF GDEFDAKM
BLR (DE3)	121	PSRIGLLLDMP LRDIERVLYFESYVVIEGGMTNLERQQILTEEQYLDAL EEF GDEFDAKM
MG1655	121	PSRIGLLLDMP LRDIERVLYFESYVVIEGGMTNLERQQILTEEQYLDAL EEF GDEFDAKM
ATCC10536	181	GAEAIQALLKSM DLEQECEQLREELNETNSETKRKKLTKRIK LLEAFVQSGNKPEWMILT
BLR (DE3)	181	GAEAIQALLKSM DLEQECEQLREELNETNSETKRKKLTKRIK LLEAFVQSGNKPEWMILT
MG1655	181	GAEAIQALLKSM DLEQECEQLREELNETNSETKRKKLTKRIK LLEAFVQSGNKPEWMILT
ATCC10536	241	VLVLPDDL RPLVPLDGGRFATSD LNDLYRRVINRNNRLKRL LD LAAPDI I VRNEKRMLQ
BLR (DE3)	241	VLVLPDDL RPLVPLDGGRFATSD LNDLYRRVINRNNRLKRL LD LAAPDI I VRNEKRMLQ
MG1655	241	VLVLPDDL RPLVPLDGGRFATSD LNDLYRRVINRNNRLKRL LD LAAPDI I VRNEKRMLQ
ATCC10536	301	EAVDALLDNGRRGRAITGSNKRPLKSLADMIK GKQGRFRQNL LGKRV DYSGRSVITVGPY
BLR (DE3)	301	EAVDALLDNGRRGRAITGSNKRPLKSLADMIK GKQGRFRQNL LGKRV DYSGRSVITVGPY
MG1655	301	EAVDALLDNGRRGRAITGSNKRPLKSLADMIK GKQGRFRQNL LGKRV DYSGRSVITVGPY
ATCC10536	361	LRLHQCGLPKKMALELFKPF IYGKLELRGLATTIKA AKKMVEREEAVVWDI LDEVIREHP
BLR (DE3)	361	LRLHQCGLPKKMALELFKPF IYGKLELRGLATTIKA AKKMVEREEAVVWDI LDEVIREHP
MG1655	361	LRLHQCGLPKKMALELFKPF IYGKLELRGLATTIKA AKKMVEREEAVVWDI LDEVIREHP
ATCC10536	421	VLLNRAPTLHRLGIQAFEPV LIEGKAIQLHPLVCAAYNADFDGDQMAVHVP L TLEAQLEA
BLR (DE3)	421	VLLNRAPTLHRLGIQAFEPV LIEGKAIQLHPLVCAAYNADFDGDQMAVHVP L TLEAQLEA
MG1655	421	VLLNRAPTLHRLGIQAFEPV LIEGKAIQLHPLVCAAYNADFDGDQMAVHVP L TLEAQLEA
ATCC10536	481	RALMMSTNNILSPANGEP IIVPSQDVVLGLYYMTRDCVNAKGEGMVL TGPKEAERLYRSG
BLR (DE3)	481	RALMMSTNNILSPANGEP IIVPSQDVVLGLYYMTRDCVNAKGEGMVL TGPKEAERLYRSG
MG1655	481	RALMMSTNNILSPANGEP IIVPSQDVVLGLYYMTRDCVNAKGEGMVL TGPKEAERLYRSG

ATCC10536	541	LASLHARVKVRITEYEKDANGELVAKTSLKDTTVGRAILWMIVPKGLPYSIVNQALGKKA
BLR (DE3)	541	LASLHARVKVRITEYEKDANGELVAKTSLKDTTVGRAILWMIVPKGLPYSIVNQALGKKA
MG1655	541	LASLHARVKVRI TEYEKDANGELVAKTSLKDTTVGRAILWMIVPKGLPYSIVNQALGKKA
ATCC10536	601	ISKMLNTCYRILGLKPTVIFADQIMYTGFAAARSGASVGIDDMVIPEKKHEI ISEAEAE
BLR (DE3)	601	ISKMLNTCYRILGLKPTVIFADQIMYTGFAAARSGASVGIDDMVIPEKKHEI ISEAEAE
MG1655	601	ISKMLNTCYRILGLKPTVIFADQIMYTGFAAARSGASVGIDDMVIPEKKHEI ISEAEAE
ATCC10536	661	VAEIQEQFQSGLVTAGERYNKVIDIWAANDRVSKAMMDNLQTE TVINRDGQEEKQVSFN
BLR (DE3)	661	VAEIQEQFQSGLVTAGERYNKVIDIWAANDRVSKAMMDNLQTE TVINRDGQEEKQVSFN
MG1655	661	VAEIQEQFQSGLVTAGERYNKVIDIWAANDRVSKAMMDNLQTE TVINRDGQEEKQVSFN
ATCC10536	721	SIYMMADSGARGSAAQIRQLAGMRGLMAKPDGSI IETPITANFREGLNVLQYFISTHGAR
BLR (DE3)	721	SIYMMADSGARGSAAQIRQLAGMRGLMAKPDGSI IETPITANFREGLNVLQYFISTHGAR
MG1655	721	SIYMMADSGARGSAAQIRQLAGMRGLMAKPDGSI IETPITANFREGLNVLQYFISTHGAR
ATCC10536	781	KGLADTALKTANSGYLTRRLVDVAQDLVVTEDDCGTHEGIMMTPVIEGGDVKEPLRDRV L
BLR (DE3)	781	KGLADTALKTANSGYLTRRLVDVAQDLVVTEDDCGTHEGIMMTPVIEGGDVKEPLRDRV L
MG1655	781	KGLADTALKTANSGYLTRRLVDVAQDLVVTEDDCGTHEGIMMTPVIEGGDVKEPLRDRV L
ATCC10536	841	GRVTAEDVLKPGTADILVPRNTLLHEQWCDLLEENSVDVAVKVRSVVSCD TDFGVCAHCY G
BLR (DE3)	841	GRVTAEDVLKPGTADILVPRNTLLHEQWCDLLEENSVDVAVKVRSVVSCD TDFGVCAHCY G
MG1655	841	GRVTAEDVLKPGTADILVPRNTLLHEQWCDLLEENSVDVAVKVRSVVSCD TDFGVCAHCY G
ATCC10536	901	RDLARGHI INKGEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMRTFHIGGAASRAAAESSIQVKNKGS IKL
BLR (DE3)	901	RDLARGHI INKGEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMRTFHIGGAASRAAAESSIQVKNKGS IKL
MG1655	901	RDLARGHI INKGEAIGVIAAQSIGEPGTQLTMRTFHIGGAASRAAAESSIQVKNKGS IKL
ATCC10536	961	SNVKSUVNSSGKLVITSRNTLKLIDEFGRTKESYKVPYGAVLAKGDGEQVAGGETVANW
BLR (DE3)	961	SNVKSUVNSSGKLVITSRNTLKLIDEFGRTKESYKVPYGAVLAKGDGEQVAGGETVANW
MG1655	961	SNVKSUVNSSGKLVITSRNTLKLIDEFGRTKESYKVPYGAVLAKGDGEQVAGGETVANW
ATCC10536	1021	DPHTMPVITEVSGFVRFTDMIDGQTITRQTDEL TGLSSLVVLDSAERTAGGKDLRPA LKI
BLR (DE3)	1021	DPHTMPVITEVSGFVRFTDMIDGQTITRQTDEL TGLSSLVVLDSAERTAGGKDLRPA LKI
MG1655	1021	DPHTMPVITEVSGFVRFTDMIDGQTITRQTDEL TGLSSLVVLDSAERTAGGKDLRPA LKI
ATCC10536	1081	VDAQGNDVLI PGTDMPAQYFLPGKAI VQLEDGVQISSGDTLARI PQESGGTKDITGGLPR
BLR (DE3)	1081	VDAQGNDVLI PGTDMPAQYFLPGKAI VQLEDGVQISSGDTLARI PQESGGTKDITGGLPR
MG1655	1081	VDAQGNDVLI PGTDMPAQYFLPGKAI VQLEDGVQISSGDTLARI PQESGGTKDITGGLPR
ATCC10536	1141	VADLFEARRPKEPAILAEISGIVSFGKETKGKRRLVITPVDGSDPYEEMI PKWRQLNVFE
BLR (DE3)	1141	VADLFEARRPKEPAILAEISGIVSFGKETKGKRRLVITPVDGSDPYEEMI PKWRQLNVFE
MG1655	1141	VADLFEARRPKEPAILAEISGIVSFGKETKGKRRLVITPVDGSDPYEEMI PKWRQLNVFE
ATCC10536	1201	GERVERGDVISDGPEAPHDILRLRGVHAVTRYIVNEVQDVYRLQGVKINDKHIEVIVRQM
BLR (DE3)	1201	GERVERGDVISDGPEAPHDILRLRGVHAVTRYIVNEVQDVYRLQGVKINDKHIEVIVRQM
MG1655	1201	GERVERGDVISDGPEAPHDILRLRGVHAVTRYIVNEVQDVYRLQGVKINDKHIEVIVRQM
ATCC10536	1261	LRKATIVNAGSSDFLEGEQVEYSRVKIANRELEANGKVGATYSRDLLGITKASLATESFI
BLR (DE3)	1261	LRKATIVNAGSSDFLEGEQVEYSRVKIANRELEANGKVGATYSRDLLGITKASLATESFI
MG1655	1261	LRKATIVNAGSSDFLEGEQVEYSRVKIANRELEANGKVGATYSRDLLGITKASLATESFI

ATCC10536	1321	<u>SAASFQETTRVLTEAAVAGKRDELRLKENVIVGRLIPAGTGYAYHQDRMRRRAAGEAPA</u>
BLR (DE3)	1321	<u>SAASFQETTRVLTEAAVAGKRDELRLKENVIVGRLIPAGTGYAYHQDRMRRRAAGEAPA</u>
MG1655	1321	<u>SAASFQETTRVLTEAAVAGKRDELRLKENVIVGRLIPAGTGYAYHQDRMRRRAAGEAPA</u>
ATCC10536	1381	<u>APQVTAEDASASLAELLNAGLGGSDNE</u>
BLR (DE3)	1381	<u>APQVTAEDASASLAELLNAGLGGSDNE</u>
MG1655	1381	<u>APQVTAEDASASLAELLNAGLGGSDNE</u>

La comparación entre las secuencias de la subunidad  $\beta'$  de la ARN Polimerasa muestra una única diferencia correspondiente al aminoácido 1, en el cual la cepa ATCC 10536 presenta una Valina y las otras dos cepas (BLR(DE3) NOVAGEN y MG1655), Metionina.

- **Resumen de análisis de secuencias:**



**Figura 12. Resumen de la comparación de secuencias.** Cada conjunto corresponde a una de las cepas evaluadas, ATCC10536, MG1655 y BLR(DE3) y se indica en su interior las posiciones que difieren. Las mutaciones en común de las cepas resistentes, de acuerdo a los mecanismos conocidos, no ofrecen una explicación evidente para las diferencias de susceptibilidad observadas.

## VII. DISCUSIÓN

### **Producción de Microcina J25**

La producción del péptido antibiótico Microcina J25 bajo el control de un promotor inducible permite su expresión experimental de manera más sencilla que utilizando el promotor nativo. El promotor nativo dirige la expresión del péptido a partir y durante la etapa estacionaria del crecimiento bacteriano (Salomón & Farías, 1992). En cambio, el plásmido pJP73 sitúa al promotor T5 corriente arriba del primer gen estructural, *mcjA*, para dirigir la expresión del operón bajo la inducción de IPTG (Pan et al., 2010). En el presente trabajo, primero se buscó evidenciar la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa productora + pJP73 sobre la cepa indicadora *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (ATCC® 13076™), dado que fue reportada mayor actividad sobre esta especie bacteriana (Vincent et al., 2004). El método de determinación de la actividad antibiótica se realizó a partir de diluciones seriadas para determinar la última capaz de generar un halo de inhibición apreciable. Definiendo esta dilución como 1 Unidad Antibiótica (AU), establecimos que el valor obtenido fue de 1600 AU/ml. Al realizar el mismo procedimiento sobre la cepa de *E. coli* ATCC10536, se obtuvo 6400 AU/ml. Este resultado contrasta con ensayos anteriores, en los que *Salmonella* Enteritidis era más susceptible que cepas de *E. coli* (Vincent et al., 2004).

### **Comparación de secuencias de las proteínas involucradas en el ingreso de la Microcina J25**

La determinación de la susceptibilidad de tres cepas de *E. coli* estableció que solo una de las tres cepas (ATCC 10536) es susceptible a la actividad de la

Microcina J25. Planteamos la posibilidad de que la información disponible de los genomas de las cepas aquí ensayadas podría explicar las diferencias de susceptibilidad y eventualmente predecir la sensibilidad de otras cepas. Por ello se decide llevar a cabo un análisis de comparación de secuencias de las proteínas involucradas en el ingreso de la Microcina J25 a la célula. La cepa BLR(DE3) NOVAGEN está optimizada para la producción de proteínas heterólogas y el uso del sistema de inducción por IPTG, por lo que sería deseable utilizarla como cepa reportera. Con este fin, sería posible realizar pruebas de complementación para restablecer su susceptibilidad, siempre y cuando se logre identificar la mutación que la hace resistente.

La proteína FhuA es un receptor transmembrana que participa en el ingreso de hierro al interior de bacterias como *E. coli* (Bonhivers et al., 1998) y *Salmonella* (Wang et al., 2018). El receptor también es aprovechado para el ingreso de algunos fagos y péptidos antibacterianos, entre ellos la Microcina J25 (Destoumieux-Garzón et al., 2005; Salomón & Farías, 1993). Recientemente, se determinaron las bases estructurales de su interacción con Microcina J25 y se establece que los residuos aminoacídicos que participan directamente son el esqueleto carbonilo de fenilalanina (Phe 115) y la cadena lateral de tirosina (Tyr 115) (Mathavan et al., 2014). La comparación de aminoácidos de las secuencias de FhuA de las 3 cepas estudiadas demuestra que dichos residuos están conservados las tres cepas. Sin embargo, en la cepa BLR(DE3) NOVAGEN se presentan dos residuos diferentes: el aminoácido 153 (alanina en lugar de valina) y 216 (alanina en lugar de serina) (Fig 10). Dado que esta diferencia en la secuencia se ubica en posiciones diferentes a los aminoácidos críticos, no se puede afirmar que influyan en el paso de la Microcina J25 al interior celular.

La proteína SbmA es el transportador de membrana interno que permite el ingreso de la Microcina J25 (Salomon & Farias, 1995). Se ha establecido que los

residuos críticos para el transporte de Microcina J25 son la valina 102, fenilalanina 219 y lisina 176 (Corbalan et al., 2013). La comparación de secuencias de las tres cepas de *E. coli* no encontró diferencias en el tipo de aminoácido en ninguna de estas posiciones (Fig 10). Sin embargo, el trabajo realizado por Corbalán se introdujeron 15 mutaciones, por lo que no se descarta que las mutaciones encontradas tengan alguna relevancia en la susceptibilidad mostrada.

Se han identificado mutaciones que contribuyen a la resistencia a la Microcina J25 en cepas de *E. coli*, tal es el caso de las mutaciones en las proteínas importadoras antes mencionadas, así como en el complejo del complejo transductor de energía TonB-ExbB-Exb (Salomon & Farias, 1995). Este complejo proteico aprovecha la fuerza protón motriz para permitir el ingreso de sustratos del transportador fhuA (Pawelek et al., 2006). El análisis comparativo de la proteína ExbD muestra que las tres secuencias presentan una identidad al 100%. En el caso de ExbB no se ha encontrado mutaciones salvo en el primer aminoácido, que en la cepa ATCC 10536 corresponde a valina y es poco probable que esta mutación sea de relevancia. Ton B cuenta con tres dominios reconocibles, un dominio que interacciona con ExbB y ExbD, un dominio que interacciona con el dominio globular de FhuA y un dominio intermedio (Pawelek et al., 2006); las diferencias en las secuencias de aminoácidos (Fig. 10) se localizan en un dominio intermedio, por lo que no es probable que tengan un papel en el funcionamiento del complejo transductor. Finalmente, la comparación de las secuencias de aminoácidos de la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa, que es blanco de la Microcina J25 (Delgado et al., 2001b) no demuestra mutaciones, salvo el primer aminoácido de la proteína en la cepa ATCC 10536, por lo que el blanco no parece estar involucrado en la susceptibilidad diferencial.

Los resultados obtenidos nos ponen en posición de recomendar la cepa de *E. coli* ATCC 10536 para usarse como organismo reportero. A favor tenemos que la Microcina J25 puede ingresar libremente al medio intracelular. Además, el genoma de dicha cepa está completamente secuenciado y se encuentra disponible, lo que nos posibilita realizar la identificación de secuencias para inserción, etc. Como se ha mencionado, el uso de esta cepa se ha limitado a indicadora de tanto compuestos con actividad antibacteriana (Alanazi et al., 2016; Bucio-Villalobos & Martínez-Jaime, 2016; Janek et al., 2012), así como de nuevos métodos de esterilización de alimentos (Briñez et al., 2006; Park et al., 2008). Por tanto, su potencial para el desarrollo de sistemas reporteros (ingeniería genética) aún está por ser explorado.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se logró producir una cantidad de títulos de 6400 AU/ml (Unidades Antibióticas/ml) de Microcina J25, considerando cepa indicadora *E. coli* ATCC 10536.
- La cepa *E. coli* ATCC 10536 es cuatro veces más susceptible al sobrenadante con Microcina J25 que *Salmonella enterica* Serovar Enteriditis.
- Las cepas ensayadas (ATCC® 10536™, BLR (DE3) NOVAGEN y MG1655) presentan susceptibilidades distintas a Microcina J25 y presentan también diferencias en las secuencias de proteínas involucradas en el transporte de este péptido. Las diferencias aquí identificadas no coinciden con ensayos previos de mutagénesis dirigida por lo que se requeriría otros estudios para confirmar o descartar su rol en la resistencia a Microcina J25.
- La cepa *E. coli* ATCC 10536 es la recomendada para la construcción del sistema reportero, debido a que permite el ingreso de la Microcina J25.

## IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo la purificación de la Microcina J25 utilizando protocolos optimizados (extracción en fase líquida).
- Se recomienda además emplear la misma metodología con cepas filogenéticamente relacionadas a la cepa patógena que se busca inhibir, esto con la finalidad de aproximar el contexto real (esto es, membrana y entorno intracelular) a los ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede explorar la construcción de sistemas reporteros en cepas grampositivas de crecimiento rápido.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanazi, A. S., Qureshi, K. A., Elhassan, G. O., & El-Agamy, E. I. (2016). Isolation, purification and characterization of antimicrobial agent antagonistic to escherichia coli ATCC 10536 produced by bacillus pumilus SAFR-032 isolated from the soil of Unaizah, Al Qassim province of Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 19(5), 191-201. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2016.191.201>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 1645-1658). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Banerjee, R., Rudra, P., Prajapati, R. K., Sengupta, S., & Mukhopadhyay, J. (2014). Optimization of recombinant Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase expression and purification. *Tuberculosis*, 94(4), 397-404. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.008>
- Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M. R., del Campo, R., & Bravo-Vázquez, D. A. (2019). Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2261). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02261>
- Bellomio, A., Vincent, P. A., de Arcuri, B. F., Farías, R. N., & Morero, R. D. (2007). Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in Escherichia coli: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *Journal of*

- Bacteriology*, 189(11), 4180-4186. <https://doi.org/10.1128/JB.00206-07>
- Biryukova, I. V., Krylov, A. A., Kiseleva, E. M., Minaeva, N. I., & Mashko, S. V. (2010). Construction of the new *Escherichia coli* K-12 MG 1655 novel strain with improved growth characteristics for application in metabolic engineering. *Russian Journal of Genetics*, 46(3), 308-314. <https://doi.org/10.1134/S1022795410030075>
- Blattner, F. R. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bonhivers, M., Plançon, L., Ghazi, A., Boulanger, P., Le Maire, M., Lambert, O., Rigaud, J. L., & Letellier, L. (1998). FhuA, an *Escherichia coli* outer membrane protein with a dual function of transporter and channel which mediates the transport of phage DNA. *Biochimie*, 80(5-6), 363-369. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)80004-8)
- BoxShade Server*. (n.d.). Retrieved April 3, 2020, from [https://embnet.vital-it.ch/software/BOX\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., James Link, A., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(4), 1273-1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817352116>
- Braun, V. (2009). FhuA (TonA), the career of a protein. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 191, Issue 11, pp. 3431-3436). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/JB.00106-09>
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., & Guamis-López, B.

- (2006). Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation. *Le Lait*, 86(3), 241-249.  
<https://doi.org/10.1051/lait:2006006>
- Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2016). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.24253>
- Chang, C. T., Doerr, K. M., & Whipps, C. M. (2017). Antibiotic treatment of zebrafish mycobacteriosis: tolerance and efficacy of treatments with tigecycline and clarithromycin. *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1473-1485.  
<https://doi.org/10.1111/jfd.12619>
- Corbalan, N., Runti, G., Adler, C., Covaceuszach, S., Ford, R. C., Lamba, D., Beis, K., Scocchi, M., & Vincent, P. A. (2013). Functional and structural study of the dimeric inner membrane protein SbmA. *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5352-5361.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00824-13>
- Crunkhorn, S. (2016). Antibacterials: Microcins limit intestinal infection. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.270>
- Cruz, P. M., Ibáñez, A. L., Hermsillo, O. A. M., & Saad, H. C. R. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012.  
<https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. In *Microbiología (Madrid, Spain)* (Vol. 12, Issue 1, pp. 9-16). <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (2001a). *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4543-4550.

<https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4543-4550.2001>

Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (2001b). Escherichia coli RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25.

*Journal of Bacteriology*, 183(15), 4543-4550.

<https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4543-4550.2001>

Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., & Boulanger, P. (2005). The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: Role of the microcin Val11-Pro16  $\beta$ -hairpin region in the recognition mechanism. *Biochemical Journal*, 389(3), 869-876. <https://doi.org/10.1042/BJ20042107>

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 24(4), 708. <https://doi.org/10.1039/b516237h>

Endriß, F., & Braun, V. (2004). Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4818-4823. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4818-4823.2004>

FAO; (Linnaeus, 1758. (2012). *Programa de informació de espècies acuàtiques*. FAO, Pesca y Acuicultura.

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/es#tcNA002B%5Cnhttp://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es#tcNA002B%5Cnhttp://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf)

FAO. (2016). *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020*. British Medical Journal. <http://www.fao.org/fsnforum/resources/fsn-resources/fao-action-plan-antimicrobial-resistance-2016-2020>

Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound

- lipopolysaccharide. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), 2215-2220.  
<https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2215>
- Galván, A. E., Chalón, M. C., Schurig-Briccio, L. A., Salomón, R. A., Minahk, C. J., Gennis, R. B., & Bellomio, A. (2018). Cytochromes bd-I and bo3 are essential for the bactericidal effect of microcin J25 on *Escherichia coli* cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(2), 110-118.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.10.006>
- Galván, Adriana Emilce, Chalón, M. C., Ríos Colombo, N. S., Schurig-Briccio, L. A., Sosa-Padilla, B., Gennis, R. B., & Bellomio, A. (2019). Microcin J25 inhibits ubiquinol oxidase activity of purified cytochrome bd-I from *Escherichia coli*. *Biochimie*, 160, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.02.007>
- Gauthier, D. T., & Rhodes, M. W. (2009). Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal*, 180(1), 33-47. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2008.05.012>
- Goffin, P., & Dehottay, P. (2017). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BLR(DE3), a recA-Deficient Derivative of *E. coli* BL21(DE3). *Genome Announcements*, 5(22). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00441-17>
- Hockett, K. L., & Baltrus, D. A. (2017). Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *Journal of Visualized Experiments*, 119, e55064. <https://doi.org/10.3791/55064>
- Hughes, D., & Karlén, A. (2014). Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 162-169.  
<https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896437>
- Janek, T., Łukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2012). Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471->

2180-12-24

- Killman, H., Herrmann, C., Torun, A., Jung, G., & Braun, V. (2002). TonB of *Escherichia coli* activates FhuA through interaction with the  $\beta$ -barrel. In *Microbiology* (Vol. 148, Issue 11, pp. 3497-3509). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3497>
- Kurittu, J., Karp, M., & Korpela, M. (2000). Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains. *Luminescence*, *15*(5), 291-297. [https://doi.org/10.1002/1522-7243\(200009/10\)15:5<291::AID-BIO596>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1522-7243(200009/10)15:5<291::AID-BIO596>3.0.CO;2-B)
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science*, *7*(1), 471-496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Lee Ventola, C. (2015). The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. In *P and T* (Vol. 40, Issue 5, pp. 344-352). Medi Media USA Inc.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(5), 371-387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Marvin J. Bayro, †, Jayanta Mukhopadhyay, †, G. V. T. Swapna, †, Janet Y. Huang, †, Li-Chung Ma, †, Elena Sineva, †, Philip E. Dawson, ‡, Gaetano T. Montelione, \*, † and, & Richard H. Ebright\*, †. (2003). *Structure of Antibacterial Peptide Microcin J25: A 21-Residue Lariat Protoknot*. <https://doi.org/10.1021/JA036677E>
- Mathavan, I., Zirah, S., Mehmood, S., Choudhury, H. G., Goulard, C., Li, Y., Robinson, C. V., Rebuffat, S., & Beis, K. (2014). Structural basis for hijacking siderophore receptors by antimicrobial lasso peptides. *Nature Chemical Biology*, *10*(5), 340-342. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1499>
- Möhrle, V., Stadler, M., & Eberz, G. (2007). Biosensor-guided screening for macrolides.

*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5-6), 1117-1125.

<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1300-5>

Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R. M., & Ebright, R. H. (2004).

Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Molecular Cell*, 14(6), 739-751. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.010>

Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205-217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>

Oda, Y., Nakamura, S. ichi, Oki, I., Kato, T., & Shinagawa, H. (1985). Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(5), 219-229. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90062-7)

Osterman, I. A., Komarova, E. S., Shiryayev, D. I., Korniltsev, I. A., Khven, I. M., Lukyanov, D. A., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., Efremenkova, O. V., Ivanenkov, Y. A., Bogdanov, A. A., Sergiev, P. V., & Dontsova, O. A. (2016). Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7481-7489. <https://doi.org/10.1128/AAC.02117-16>

Pan, S. J., Cheung, W. L., & Link, A. J. (2010). Engineered gene clusters for the production of the antimicrobial peptide microcin J25. *Protein Expression and Purification*, 71(2), 200-206. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2009.12.010>

Pan, S. J., & Link, A. J. (2011). Sequence Diversity in the Lasso Peptide Framework: Discovery of Functional Microcin J25 Variants with Multiple Amino Acid Substitutions. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), 5016-5023.

<https://doi.org/10.1021/ja1109634>

Park, S. H., Hong, G. P., Min, S. G., & Choi, M. J. (2008). Combined high pressure and subzero temperature phase transition on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 10536. *International Journal of Food Engineering*, 4(4).

<https://doi.org/10.2202/1556-3758.1346>

Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C. M., Moiseeva, N., Allaire, M., & Coulton, J. W. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science*, 312(5778), 1399-1402.

<https://doi.org/10.1126/science.1128057>

Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 6, Issue 1, pp. 29-40). Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/nrd2201>

Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), 5971-5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5971>

Rebuffat, S. (2012). Microcins in action: Amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1456-1462.

<https://doi.org/10.1042/BST20120183>

Rosales-Colunga, L. M., & Martínez-Antonio, A. (2014). Engineering *Escherichia coli* K12 MG1655 to use starch. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 74.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-74>

Sable, S., Pons, A. M., Gendron-Gaillard, S., & Cottenceau, G. (2000). Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied*

*and Environmental Microbiology*, 66(10), 4595-4597.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4595-4597.2000>

Salomon, R. A., & Farias, R. N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the tonB pathway and the sbmA protein. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3323-3325. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3323-3325.1995>

Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(22), 7428-7435. <https://doi.org/10.1128/JB.174.22.7428-7435.1992>

Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1993). The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *Journal of Bacteriology*, 175(23), 7741-7742. <https://doi.org/10.1128/JB.175.23.7741-7742.1993>

Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 52, Issue 2, pp. 135-143). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>

Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66-69. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461>

Sergieiev, P. V., Osterman, I. A., Golovina, A. Y., Andreyanova, E. S., Laptev, I. G., Pletnev, P. I., Evfratov, S. A., Marusich, E. I., Leonov, S. V., Ivanenkov, Y. A., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2016). Application of reporter strains for screening of new antibiotics. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 10(4), 293-299. <https://doi.org/10.1134/S1990750816040065>

- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *Journal of Bacteriology*, *178*(12), 3661-3663. <https://doi.org/10.1128/JB.178.12.3661-3663.1996>
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 4, Issue 1, pp. 89-101). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Stansly, P. G., & Schlosser, M. E. (1947). Studies on Polymyxin: An Agar Diffusion Method of Assay. *Journal of Bacteriology*, *54*(5), 585-597. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561396>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113-130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Tehrani, M. M., Erfani, M., Amirmozafari, N., & Nejadsattari, T. (2019). Synthesis of a peptide derivative of microcinJ25 and evaluation of antibacterial and biological activities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *18*(3), 1264-1276. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100750>
- Toner, E., Adalja, A., Gronvall, G. K., Cicero, A., & Inglesby, T. V. (2015). Antimicrobial resistance is a global health emergency. *Health Security*, *13*(3), 153-155. <https://doi.org/10.1089/hs.2014.0088>
- Valtonen, S. J., Kurittu, J. S., & Karp, M. T. (2002). A Luminescent Escherichia coli Biosensor for the High Throughput Detection of  $\beta$ -Lactams. *Journal of Biomolecular Screening*, *7*(2), 127-134. <https://doi.org/10.1177/108705710200700205>
- van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering:

- design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7),511-522. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2392>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277-283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Vincent, P. A., Delgado, M. A., FarÃ•as, R. N., & SalomÃ³n, R. A. (2004). Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), 103-107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09634.x>
- Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., Zhu, G., White, A. P., & Köster, W. (2018). Evolution and sequence diversity of FhuA in *Salmonella* and *Escherichia*. *Infection and Immunity*, 86(11). <https://doi.org/10.1128/IAI.00573-18>
- World Health Organization. (2018). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Yu, H., Wang, Y., Zeng, X., Cai, S., Wang, G., Liu, L., Huang, S., Li, N., Liu, H., Ding, X., Song, Q., & Qiao, S. (2020). Therapeutic administration of the recombinant antimicrobial peptide microcin J25 effectively enhances host defenses against gut inflammation and epithelial barrier injury induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *The FASEB Journal*, 34(1), 1018-1037. <https://doi.org/10.1096/fj.201901717R>
- Zhang, Z., Guan, N., Li, T., Mais, D. E., & Wang, M. (2012). Quality control of cell-based high-throughput drug screening. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.03.006>

# XI. ANEXOS

## A. SECUENCIA DE PLASMIDO PRODUCTOR pJP73

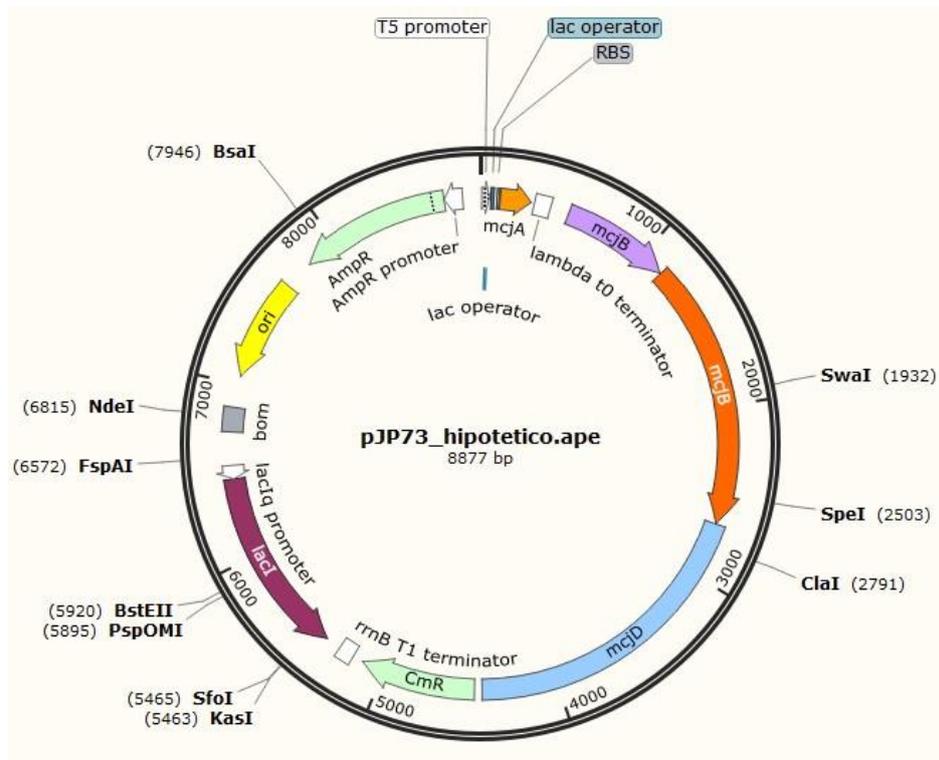


Figura S 1. Mapa del plásmido productor de Microcina J25 (donado por A. J. Link).

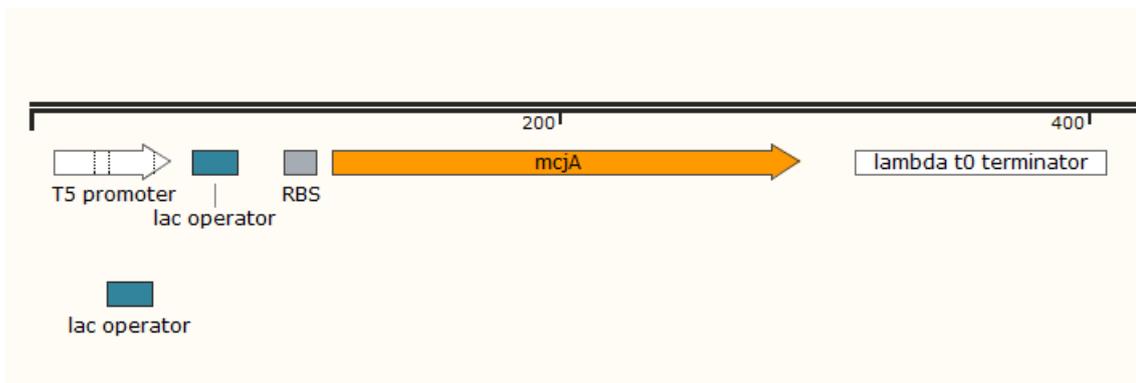


Figura S 2. Disposición de secuencias reguladoras y el gen de mcjA (que codifica para el precursor).