



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

DOCTORADO EN BIOCENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS
ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE
CEPAS DEL GÉNERO *STREPTOMYCES*
PARA SU PRODUCCIÓN, ANÁLISIS Y
CARACTERIZACIÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN BIOCENCIAS**

**PRESENTA:
M. EN. B. OSCAR FELIPE HERNÁNDEZ
SALDAÑA**

**DIRECTORA:
DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ**

**CODIRECTOR:
DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA**

IRAPUATO, GTO., ENERO 2020

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

**“Identificación de péptidos antimicrobianos a partir
de cepas del género *Streptomyces* para su
producción, análisis y caracterización.”**

TESIS

QUE PRESENTA

Oscar Felipe Hernández Saldaña

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOCENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

CODIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

Irapuato, Gto., Enero de 2020.

**CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0028/2020.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

C.

DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación del C. **Oscar Felipe Hernández Saldaña**, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

“Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de cepas del género *Streptomyces* para su producción, análisis y caracterización.”

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

Dra. Luz Edith Casados Vázquez
Dr. Gilberto Velázquez Juárez
Dra. Varinia López Rodríguez
Dr. Gustavo Hernández Guzmán
Dra. María Cristina Del Rincón Castro

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
“LA VERDAD OS HARA LIBRES”
Irapuato, Gto., 15 de Enero de 2020.

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311 , Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0029/2020.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 17 de Enero de 2020.

C.

DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis del Pasante C. Oscar Felipe Hernández Saldaña,

Titulada:

“Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de cepas del género *Streptomyces* para su producción, análisis y caracterización.”

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

DIRECTOR

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

SINODAL

DR. GILBERTO VELÁZQUEZ JUÁREZ

SINODAL

DRA. VARINIA LÓPEZ RODRÍGUEZ

REVISOR

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN

REVISOR

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311 , Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx



C.

DR. JOSÉ MARIO MENDOZA CARRILLO,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación del C. Oscar Felipe Hernández Saldaña, nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: "Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de cepas del género *Streptomyces* para su producción, análisis y caracterización." que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Luz Edith Casados Vázquez en codirección con el Dr. José Eleazar Barboza Corona, ambos profesores de la División de Ciencias de la Vida, ha sido terminado. El escrito fue revisado por el Dr. Gilberto Velázquez Juárez, la Dra. Varinia López Rodríguez, el Dr. Gustavo Hernández Guzmán y la Dra. María Cristina Del Rincón Castro y se autorizó la impresión del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

Dr. Gustavo Hernández Guzmán	PRESIDENTE
Dr. Gilberto Velázquez Juárez	SECRETARIO
Dra. Varinia López Rodríguez	VOCAL
Dr. María Cristina Del Rincón Castro	VOCAL
Dra. Luz Edith Casados Vázquez	VOCAL

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 20 de Enero de 2020.

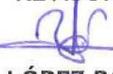

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ
DIRECTOR


DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA
CODIRECTOR

REVISOR

REVISOR


DR. GILBERTO VELÁZQUEZ JUÁREZ


DRA. VARINIA LÓPEZ RODRÍGUEZ

REVISOR

REVISOR


DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN


DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 01 (462) 624 18 89.

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE
REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LUZ EDITH
CASADOS VÁZQUEZ Y LA CODIRECCIÓN DEL DR. JOSÉ
ELEAZAR BARBOZA CORONA EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE
LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA, DEL CAMPUS
IRAPUATO-SALAMANCA, DE LA UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO.**

Resumen

Streptomyces spp. Es un género de bacterias gram positivas conocidas por su capacidad de producir antibióticos y otros metabolitos, pero se han reportado pocos estudios sobre bacteriocinas producidas por estas bacterias. En este estudio probamos ocho cepas de *Streptomyces* contra diferentes bacterias patógenas, y seleccionamos *S. griseus*, *S. nigrescens*, *S. bottropensis* y *S. violaceoruber* como los modelos de estudio basados en sus efectos inhibitorios contra las bacterias, incluidos los patógenos de humanos. *S. bottropensis* alcanzó su mayor actividad antimicrobiana a las 312 h de cultivo, y fue mayor que las actividades de *S. violaceoruber* y *S. nigrescens*. La mejor condición para la precipitación de bacteriocinas fue usar sulfato de diamonio a una saturación del 50%. Las bacteriocinas fueron susceptibles a los tratamientos con proteinasas pero estables a altas temperaturas (hasta 100°C). Las actividades inhibitorias más altas se observaron entre pH 5 y 6. Los ensayos de actividad cruzada indicaron que cada cepa de *Streptomyces* producía una diferente bacteriocina. Cuando las producciones de *S. griseus* y *S. nigrescens* se sometieron a SDS-PAGE, se observaron bandas de inhibición en el ensayo de sobrecapa en gel en una posición correspondiente a ~2 y 3 kDa, respectivamente, lo que sugiere que ambas cepas son fuentes potenciales para nuevas bacteriocinas.

Palabras clave: *Streptomyces*, bacteriocinas, péptidos antimicrobianos

ABSTRACT

Streptomyces spp. are Gram-positive bacteria well known for their ability to produce antibiotics and other metabolites, but few studies on bacteriocins produced by these bacteria have been reported. We tested eight *Streptomyces* strains against different pathogenic bacteria, and selected *S. griseus*, *S. nigrescens*, *S. bottropensis* and *S. violaceoruber* for further study based on their inhibitory effects against bacteria, including human pathogens. *S. bottropensis* reached its highest activity at 312 h, and was higher than the activities of *S. violaceoruber* and *S. nigrescens*. The best condition for bacteriocin precipitation was using diammonium sulfate at 50% saturation. Bacteriocins were susceptible to proteinase treatments and stable at high temperature (up to 100°C). The highest inhibitory activities were observed between pH 5 and 6. Cross activity assays indicated that each *Streptomyces* strain produced different bacteriocins. When preparations of *S. griseus* and *S. nigrescens* were subjected to SDS-PAGE, bands of inhibition were observed in the gel-overlay assay at a position corresponding to ~2 and 3 kDa, respectively, suggesting that both strains are potential sources for novel bacteriocins.

Key words: *Streptomyces*, bacteriocins, antimicrobial peptides.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, en particular a la División de Ciencias de la Vida, por haberme dado la oportunidad de superarme académicamente al cursar la Maestría en Biociencias.

La realización de este trabajo de Doctorado en Biociencias por la Universidad de Guanajuato (UG), fue posible al gran soporte de CONACyT por la beca otorgada con el número 296832 y el financiamiento del proyecto en el programa “Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2016” con el número de registro 3664.

1. Tabla de contenido

2.	Introducción.....	15
2.1	Género <i>Streptomyces</i>	16
2.1.1	Características generales.....	16
2.1.2	Importancia del género <i>Streptomyces</i>	17
2.2	Metabolismo secundario.....	17
2.3	Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Streptomyces</i>	18
2.3.1	Inmunosupresores.....	18
2.3.2	Antifúngicos.....	19
2.3.3	Antibióticos antibacterianos.....	20
2.3.4	Péptidos antimicrobianos reportados en el género <i>Streptomyces</i> (bacteriocinas).....	22
2.4	Péptidos antimicrobianos.....	25
2.4.1	Definición de péptidos antimicrobianos.....	25
2.4.2	Clasificación de las bacteriocinas.....	26
2.4.3	Biosíntesis de bacteriocinas.....	28
2.4.4	Producción comercial de bacteriocinas.....	30
2.4.5	Aplicaciones de las bacteriocinas y los péptidos antimicrobianos..	31
3.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
3.1	Justificación.....	33
3.2	Hipótesis.....	34
3.3	Objetivos.....	34
3.3.1	Objetivo general.....	34
3.3.2	Objetivos específicos.....	34
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

4.1	Obtención y conservación de esporas de especies del género <i>Streptomyces</i>	35
4.2	Identificación de contaminantes.....	36
4.2.1	Cultivo de esporas en caja	36
4.3	Identificación de especies del género <i>Streptomyces</i> con actividad antibacteriana.....	36
4.4	Análisis de las condiciones óptimas para la producción de compuestos antimicrobianos.	37
4.5	Análisis estadístico de las diferentes condiciones de crecimiento.	38
4.6	Fraccionamiento con sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄).	39
4.7	Producción y precipitación de las probables bacteriocinas.....	39
4.8	Actividad antibacteriana de las bacteriocinas parcialmente purificadas contra bacteria indicadora <i>B. cereus</i> 2152 en medio líquido.....	40
4.9	Interacción antimicrobiana entre las cepas del género <i>Streptomyces</i>	41
4.10	Análisis de percepción de quórum utilizando las probables bacteriocinas como inductores.....	41
4.11	Caracterización parcial de las probables bacteriocinas.	42
4.11.1	Efecto de la temperatura.	42
4.11.2	Efecto del pH.....	42
4.11.3	Tratamiento con enzimas proteolíticas.....	43
4.12	SDS-PAGE y ensayo de actividad por sobrecapa.	43
4.13	Actividad y validación de tratamiento de enzimas proteolíticas en sobrecapa.	44
4.14	Fraccionamiento por peso molecular y prueba de actividad por sobrecapa para identificación de la probable bacteriocina de <i>S. nigrescens</i>	44

4.15	Aplicación de diferentes tratamientos para la eliminación de proteínas de alto peso molecular y conglomerados en las muestras de <i>S. nigrescens</i>	45
4.15.1	Purificación de la bacteriocina producida por <i>S. nigrescens</i>	46
4.16	Electroforesis en gel bidimensional (2-D).....	47
4.17	Determinación actividad inhibidora de proteasas de la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i>	48
4.18	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i> contra bacterias patógenas.....	48
4.19	Identificación y amplificación de los genes codificantes de las probables bacteriocinas.....	49
4.19.1	Prueba de antagonismo contra <i>Escherichia coli</i> TOP 10 y <i>E. coli</i> BL21 Rosetta 2.....	51
4.20	Clonación de segmentos del clúster de grisemicina.....	52
4.20.1	Secuenciación de la construcción.....	52
4.21	Inducción de la grisemicina.....	53
4.22	Actividad de la cepa transformada <i>E. coli</i> BL21 Rosetta 2 pCold A-T en pozos.....	54
4.23	Comprobar la expresión del gen de grisemicina por síntesis de cDNA.....	54
4.23.1	Extracción de RNA.....	54
4.23.2	Tratamiento con DNAsa.....	55
4.23.3	Síntesis del cDNA.....	56
4.23.4	Amplificación del gen de Grisemicina a partir del cDNA.....	56
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
5.1	Obtención y conservación de esporas de especies del género <i>Streptomyces</i>	57

5.2	Identificación de especies del género <i>Streptomyces</i> con actividad antibacteriana.....	57
5.3	Análisis de las condiciones óptimas para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana.....	60
5.4	Análisis estadístico de la producción de compuestos antimicrobianos bajo diferentes condiciones de cultivo.....	66
5.5	Fraccionamiento con sulfato de amonio	67
5.6	Producción y precipitación de las probables bacteriocinas.....	70
5.7	Efecto de las bacteriocinas concentradas sobre <i>B. cereus</i> cepa JCM 2152.....	71
5.8	Interacción antimicrobiana entre las cepas del género <i>Streptomyces</i>	72
5.9	Efecto de la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i> sobre su propia producción.....	73
5.10	Caracterización parcial de las probables bacteriocinas.....	75
5.10.1	Tratamiento con diferentes temperaturas.....	75
5.10.2	Tratamiento con diferentes pH.....	76
5.10.3	Tratamiento con enzimas proteolíticas.....	78
5.11	Comprobación del efecto de las proteasas sobre la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i>	81
5.12	Fraccionamiento por peso molecular y prueba de sobrecapa para identificación de la probable bacteriocina.	82
5.12.1	Purificación de la bacteriocina producida por <i>S. nigrescens</i>	86
5.13	Electroforesis en gel bidimensional (2-D).	88
5.14	Determinación de la actividad inhibidora de proteasas de la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i>	79

5.15	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la bacteriocina de <i>S. nigrescens</i> contra bacterias patógenas.....	89
5.16	Identificación de los genes codificantes de las probables bacteriocinas.....	91
5.17	Genes presentes en operones de bacteriocinas en <i>Streptomyces griseus</i>	92
5.17.1	Prueba de antagonismo de grisemicina contra <i>Escherichia coli</i> TOP10 y <i>E. coli</i> BL21 Rosetta 2.	94
5.18	Amplificación de partes del clúster de Grisemicina.....	95
5.19	Secuenciación del inserto clonado en pCold I.	97
5.20	Actividad de la bacteriocina recombinante.....	99
5.21	Comprobar la expresión del gen de grisemicina en BL21-Rosetta 2. 102	
5.21.1	Extracción de RNA.....	102
5.21.2	Amplificación del gen de grisemicina a partir del cDNA.	102
5.22	Amplificación y secuenciación del gen estructural de Bottromicina en <i>S. bottropensis</i>	105
6.	CONCLUSIONES:.....	106
7.	LITERATURA CITADA:.....	106

2. Introducción

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas que comparte características propias de los hongos (Ōmura *et al.*, 2001), una característica relevante de este género es su capacidad de producir algunos metabolitos secundarios con aplicaciones beneficiosas de interés humano (Ahmad *et al.*, 2017, Dilip *et al.*, 2013). Entre estos metabolitos se encuentran los péptidos antimicrobianos, que son sustancias de defensa del hospedero con interacciones complejas contra patógenos (Téllez y Castaño, 2010), cualidad que abre un abanico de posibilidades para eventuales aplicaciones, por ejemplo: en tratamiento de heridas (Jenssen *et al.*, 2006), control de infecciones bacterianas en el área veterinaria (Islas-Rodríguez *et al.*, 2009) o como bioconservadores en alimentos (Hernández, 2010). Sin embargo, los péptidos antimicrobianos de streptomicetos han sido poco explotados y analizados en comparación con su contraparte en bacterias ácido lácticas, donde las bacteriocinas producidas por estos organismos han sido ampliamente utilizadas y empleadas en áreas de la industria alimentaria (Campos *et al.*, 2011). Estas aplicaciones nos muestran una alternativa para el control de patógenos bacterianos, los cuales según Butzby y Roberts en 1996 eran responsables de la mayoría de las infecciones, alcanzando hasta un 90% en el caso de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) y que según la Organización Mundial de la Salud en 2015, aumentó a un 95%; ya que cada vez resulta más complicado el control de estos agentes biológicos, por la aparición de grupos humanos vulnerables, nuevas formas de transmisión y la resistencia

adquirida a antibióticos (OMS, 2015). Por lo anterior, es necesario encontrar fuentes alternativas para el control de bacterias patógenas, de aquí la importancia de buscar nuevos compuestos que tengan la capacidad de producir metabolitos activos contra bacterias de interés.

En este trabajo nuestro objetivo fue encontrar bacteriocinas producidas por cepas del género *Streptomyces* con actividad antagónica contra bacterias patógenas de interés en salud pública.

2.1 Género *Streptomyces*

2.1.1 Características generales

Streptomyces es un género de bacterias Gram positivas que crece en diversos entornos, con una forma filamentosa similar a la de los hongos. La diferenciación morfológica de *Streptomyces* implica la formación de una capa de hifas en la que puede diferenciarse una cadena de esporas (Ōmura *et al.*, 2001). Cuando una spora encuentra condiciones favorables de temperatura, nutrientes y humedad, se forma el tubo germinal y las hifas se desarrollan. Posterior a esto inicia el desarrollo de la hifa aérea, y en un punto inicia la organización de diversos procesos como el crecimiento y el ciclo celular (Emerson *et al.*, 2012). El estilo de vida de *Streptomyces*, es en muchos aspectos sorprendentemente similar a la de los hongos filamentosos: ambos crecen con ramificación de hifas que forman un micelio vegetativo y se dispersan a través de esporas que se forman en estructuras reproductoras especializadas llamadas hifas aéreas, que emergen de la superficie de la colonia hacia el aire. Al igual que los hongos, la mayoría de los estreptomicetos

viven como saprófitos en el suelo, aunque *Streptomyces spp.* también habita con éxito una amplia gama de otros nichos, tanto terrestres como acuáticos, y algunas cepas suelen ser patógenas para plantas y animales (Flärdh y Buttner, 2009).

2.1.2 Importancia del género *Streptomyces*

La propiedad más interesante e importante de *Streptomyces* es su capacidad de producir metabolitos secundarios tales como antifúngicos, antivirales, antitumorales y anti-hipertensivos (Ahmad *et al.*, 2017, Dilip *et al.*, 2013). Las cepas de este género son productoras de más de la mitad de los antibióticos conocidos hasta ahora (Watve *et al.*, 2001); también son productoras de una gran cantidad de enzimas extracelulares de interés en el área industrial, como proteasas, celulasas, nucleasas, amilasas, lipasas y quitinasas (Mukthar *et al.*, 2017). La mayor parte de esta producción se realiza en la fase de desaceleración de crecimiento del cultivo, en otras palabras, justo antes de entrar a la fase estacionaria e incluso a lo largo de ésta (Kirk *et al.*, 2000; García, 2010).

2.2 Metabolismo secundario en bacterias.

Al proceso mediante el cual se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor se le denomina metabolismo secundario. No obstante, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica (Craney *et al.*, 2013). Los metabolitos secundarios poseen algunas características comunes entre las que se pueden resaltar las siguientes:

- La mayoría de los compuestos son específicos de la cepa productora.
- Presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas.
- En general son productos de complejas rutas biosintéticas (García, 2010; Wohlleben *et al.*, 2012)

2.3 Metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces*

2.3.1 Inmunosupresores

Un inmunosupresor es una sustancia química que produce la supresión del sistema inmunitario. Clínicamente se utilizan para:

- Prevenir el rechazo de un órgano trasplantado.
- Tratamiento de una enfermedad autoinmune o enfermedades que pueden ser de origen autoinmune, como vasculitis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, psoriasis o lupus sistémico eritematoso (Abbas y Lichtman, 2009).

2.3.1.1 Tacrolimus

El tacrolimus es macrólido con un anillo macrocíclico de lactona aislado del caldo de fermentación de *Streptomyces tsukubaensis*, es una opción importante para la inmunosupresión en receptores de transplante renal pediátrico y de adultos (Scott

et al., 2003), mostrando mayor eficacia incluso que la ciclosporina (O'Grady *et al.*, 2002).

2.3.1.2 Sirolimus

Es un inmunosupresor y antibiótico macrólido, producido mediante fermentación por el actinomiceto *Streptomyces higroscopicus*. Posee un mecanismo de acción diferente al tacrolimus y la ciclosporina, con una eficacia similar a esta última. En pacientes con trasplante renal se ha demostrado su capacidad para disminuir la incidencia de rechazo agudo a los 6 y 12 meses si se combina con ciclosporina (Noguera *et al.*, 2002).

2.3.2 Antifúngicos

2.3.2.1 Nistatina

La nistatina (Nis) es un miembro importante de un grupo relativamente grande y variado de antibióticos antifúngicos altamente insaturados que se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*. Por su estructura química y para diferenciarla de otros antibióticos con propiedades antifúngicas, se le incluye dentro del grupo denominado antibióticos antifúngicos de tipo poliénico. Este fármaco presenta tres formas polimórficas, denominadas Tipo A, Tipo B y Tipo C (Lescano *et al.*, 2014).

2.3.2.2 Natamicina

La natamicina es un antibiótico producido por las bacterias *Streptomyces natalensis*, pertenece al grupo de medicamentos llamados antifúngicos. Cuya actividad ha sido aplicada en el área de los alimentos, por ejemplo en panes (San Lucas y Cáceres, 2012). Su estructura primaria consiste en un anillo de lactona con 25 átomos de carbono, el cual está a su vez unido a un residuo de micosamina, un amino-azúcar, por un enlace glucosídico. La natamicina se clasifica como un antibiótico macrólido polieno debido a sus cuatro dobles enlaces conjugados (EFSA, 2009).

2.3.3 Antibióticos antibacterianos

2.3.3.1 Eritromicina

Un antibiótico policétido clínicamente importante, es producido por la bacteria *Streptomyces erythreus* (Cortes *et al.*, 1990). Es ampliamente usado para tratar ciertas infecciones causadas por las bacterias, como bronquitis; difteria; enfermedad de los legionarios; tos ferina; neumonía; fiebre reumática; enfermedades venéreas; y las infecciones del oído, el intestino, el pulmón, las vías urinarias y la piel. También se usa antes de algunos tipos de cirugía o trabajo dental para prevenir infecciones (MedlinePlus, 2010).

2.3.3.2 Neomicina

La neomicina, un agente antibiótico producido por *Streptomyces fradiae* aislado de suelo. Es un compuesto básico fácilmente soluble en agua y más activo en un medio alcalino. Es relativamente termoestable y es activo contra numerosos organismos Gram-positivos y Gram-negativos. Es activo también contra los organismos resistentes a la estreptomicina; cabe destacar que tiene considerable actividad *in vitro* contra diferentes formas de *Mycobacterium tuberculosis*, en algunos casos mostrando mayor actividad que la estreptomicina (Duncan *et al.*, 1951).

2.3.3.3 Estreptomicina

Antimicrobiano bactericida del grupo de los aminoglucósidos, obtenida a partir de *Streptomyces griseus*. Su administración es exclusivamente parenteral. Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana a nivel del ribosoma (Comité de medicamentos de la asociación española de pediatría, 2013).

2.3.3.4 Espiramicina

La espiramicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos elaborado a partir de *Streptomyces ambofaciens*, con acción bacteriostática. Inhibe la síntesis proteica bacteriana a nivel ribosomal. De características muy similares a las de la eritromicina y a la oleandomicina, es más activo que estas *in vivo*, porque su

concentración sanguínea es más persistente. Se utiliza principalmente para tratar mastitis, así como para controlar infecciones renuentes por estreptococos y estafilococos. Se ha observado que es muy activo contra micoplasmas (Zenebergh y Trouet, 1982).

2.3.3.5 Kanamicina

La kanamicina es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro, bactericida (Katzung, 2007) activo sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Mycobacterium*, por lo que se indica en una amplia gama de infecciones. La kanamicina se obtiene de la actinobacteria *Streptomyces kanamyceticus* (MedlinePlus, 2012).

2.3.4 Péptidos antimicrobianos reportados en el género *Streptomyces* (bacteriocinas)

2.3.4.1 Cipemicina

Cipemicina es un pro-péptido lineal y modificado, que es producido por *Streptomyces sp.* OH-4156. La cipemicina no contiene puentes de lantionina pero exhibe algunas de las características estructurales de los lantibióticos, en particular treoninas deshidratadas (dihidrobutilinas) y un C-terminal S-[(Z)-2-aminovinil]-D-cisteína (Minami *et al.*, 1994). En consecuencia, fue clasificado como un miembro de la familia de los lantibióticos, péptidos modificados postraduccionalmente

(Chatterjee *et al.*, 2005). Sin embargo, nuevos estudios le han clasificado de forma distinta, donde la cipemicina es el miembro fundador de una clase inusual de péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente denominados linaridinas (Claesen y Bibb, 2010).

2.3.4.2 Goadsporina

Goadsporin, es un metabolito secundario de *Streptomyces sp.* TP-A0584, consta de 19 aminoácidos, dos de los cuales son deshidroalaninas y seis de los cuales se ciclan a oxazoles y tiazoles por ciclación deshidratante y deshidrogenación de serina, treonina y cisteína (Igarashi *et al.*, 2001). Goadsporina promueve el metabolismo secundario y la morfogénesis a bajas concentraciones, e induce la inhibición del crecimiento en altas concentraciones en actinomicetos. Esta actividad se observa en una amplia variedad de actinomicetos, mientras que no se observa bioactividad en otros organismos (Onaka *et al.*, 2005).

2.3.4.3 Legonaridina

Es un péptido perteneciente a la familia de la linaridinas, que al igual que otros miembros de esta familia sufre de modificaciones post-traduccionales, en total nueve, siendo 8 de estos residuos de dehidrobutirina y un N-terminal N,N-dimetilado con un ácido carboxílico en el C-terminal. Este péptido fue descubierto a partir de la cepa *Streptomyces sp.* CT34 que a su vez fue aislada de suelo (Rateb *et al.*, 2015).

2.3.4.4 Grisemicina

Péptido producido por un clúster de linaridina en *Streptomyces griseus* IFO 13350. Que al igual que otras linaridinas sufre de modificaciones post-traduccionales, en este caso compartiendo al menos tres modificaciones idénticas a la cipemicina, siendo un análogo estructural cercano de ésta, pero de menor tamaño. El menor rango de actividad antibacteriana reportada en comparación con la cipemicina se relaciona a su también más corta estructura (Claesen y Bibb, 2011).

Su clúster así como los procesos involucrados en la formación del péptido maduro son iguales a los de su análogo, por lo que consta este consta de los genes GrmA, GrmH, GrmL, GrmD, GrmM, GrmT, con las mismas funciones descritas para la cipemicina (Claesen y Bibb, 2011).

2.3.4.5 Péptido SapB

SapB es un pequeño péptido morfogenético secretado por *Streptomyces coelicolor*, íntimamente involucrado en el proceso de diferenciación y crecimiento del micelio aéreo (Willey *et al.*, 1991). Funciona como un tensioactivo biológico, liberando la tensión superficial en la interfase aire-agua, permitiendo así a las hifas escapar del medio acuoso de la superficie de la colonia y crecer en posición vertical (Tillotson *et al.*, 1998). Se ha reportado a ser un péptido similar a los lantibióticos, derivando, por modificación postraduccionales del producto de un gen llamado *ramS*, a través de la escisión proteolítica y la introducción de cuatro residuos deshidroalanina y dos puentes de lantionina (Kodani *et al.*, 2004).

2.3.4.6 Ohmyungamycinas

Divididas en A y B, son nuevos péptidos cíclicos, se aislaron a partir de una bacteria marina, *Streptomyces genus* obtenida de la arena de una playa en Jeju, una isla volcánica en la República de Corea. Son depsipéptidos cíclicos que conllevan unidades inusuales de amino ácidos, incluyendo N-metil-4-metoxitriptofano, β -hidroxifenilalanina, y N, N-dimetilvalina. Ohmyungamycinas A y B mostraron actividades inhibitoras significativas contra diversas células cancerígenas, así como efectos antibacterianos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila* y *Proteus hauseri*. Sin embargo, ohmyungamycin A no inhibió *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ó *Escherichia coli* (Soohyun *et al.*, 2013).

2.4 Péptidos antimicrobianos

2.4.1 Definición de péptidos antimicrobianos

Son una familia de sustancias polifacéticas con complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana, o afectando blancos internos (Téllez y Castaño, 2010). Los péptidos antimicrobianos (AMP) son péptidos con un número variable (desde cinco a cien) de aminoácidos. Estos tienen un amplio espectro de actividad contra organismos que van desde virus hasta parásitos. Históricamente los AMP también se han referido como péptidos

catiónicos de defensa del huésped (Brown y Hancock, 2006). Los péptidos antimicrobianos no involucran en su método de acción procesos enzimáticos, siendo esta una de las razones de por qué algunas sustancias como la lisozima no es considerada un péptido antimicrobiano, pues rompe enlaces β -1,4 en las cadenas de los peptidoglicanos (Kirby, 2001). Cuando los péptidos antimicrobianos son producidos específicamente por bacterias reciben el nombre de bacteriocinas (Barboza *et al.*, 2007)

2.4.2 Clasificación de las bacteriocinas

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman *et al.*, (2003).

- **Clase I:** Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Estos péptidos poseen poca estabilidad al calor y son péptidos policíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la

nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los antibióticos se subdividen en 2 grupos:

- **Clase IA:** Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los antibióticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total
- **Clase IB:** Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.
- **Clase II:** No antibióticos-bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:
 - **Clase IIA:** Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal de Y-G-N-G-V-Xaa-C y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

- **Clase IIB:** Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- **Clase IIC:** Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.
- **Clase III:** Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J. V, acidofilicina A y lactacinas A y B.
- **Clase IV:** Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
- **Clase V:** Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A.

2.4.3 Biosíntesis de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas está generalmente relacionada a la expresión de un clúster genético y son sintetizadas ribosomalmente (Cotter *et al.*, 2005, Azevedo *et al.*, 2015). Se ha encontrado incluso relación entre la presencia de clúster predichos por análisis bioinformáticos y la actividad antibacteriana de algunas bacterias (Azevedo *et al.*, 2015).

Los clúster genéticos que codifican para las bacteriocinas están integrados por uno o más genes estructurales, los cuales codifican para la bacteriocina; además de éstos cuentan con una batería de genes implicados en la regulación, procesamiento, plegado, transporte e inmunidad. Sin la presencia de estos la bacteriocina no podría ser sintetizada. Uno de los primeros clúster mejor estudiados es el que codifica para la nisina, éste está integrado por genes de modificación postraduccional *nisB* y *nisC*, el gen de secreción *nisT* y genes de inmunidad *nisI* y *nisF*, entre otros (Konings *et al.*, 1999). En *Bacillus thuringiensis* se han caracterizado bien los clúster responsables de la producción de thurincin H y thuricin CD, cada uno con 10 y 7 genes, respectivamente. Dentro de estos hay proteínas reguladoras ThnR, de inmunidad ThnI, de transporte ThnEDT y TrnFG, de plegado ThnB y TrnCD y la de procesamiento ThnP y TrnE (siendo Thn pertenecientes al clúster de thurincin H y las Trn para thurincin CD; Lee *et al.*, 2009; Rea *et al.*, 2010). Otra de las bacterias en las cuales se han identificado este tipo de clúster son las del género *Streptomyces*; El clúster de la cipemicina consta de los genes CypA (gen estructural), CypH (hidrolasa), CypL (proteína hipotética), CypD (descarboxilasa), CypM (metiltransferasa) y CypT (Transportador ABC). CypH y/o CypL se encargan de deshidratar dos residuos de treonina en el propéptido de la cipemicina (CypA) para formar dehidrobutirina (Dhb) y detiolar la cisteína interna para formar

dehidroalanina (Dha). La alanina en el N-terminal es dimetilada por acción de la metiltransferasa (CypM) dependiente de S-adenosil metionina (SAM) Mientras que CypT esta involucrada en la translocación de la cipepicina a través de la membrana citoplasmática (Claesen y Bibb, 2011). En el caso de *S. griseus*, su clúster asi como los procesos involucrados en la formación del péptido maduro son iguales a los de su análogo, por lo que consta este consta de los genes GrmA, GrmH, GrmL, GrmD, GrmM, GrmT, con las mismas funciones descritas para la cipepicina (Claesen y Bibb, 2011).

2.4.4 Producción comercial de bacteriocinas

Actualmente la producción industrial de bacteriocinas se ve limitada por diversos factores. Por ejemplo, la mayoría de datos e información ha sido obtenida solo a nivel laboratorio y experimental, dificultando así el escalamiento de la producción (Jones *et al.*, 2005). La única bacteriocina que ha sido reconocida como segura para consumo humano es la nisina, la cual es producida por *Lactococcus lactis subsp. lactis* con grado GRAS (FDA, 1988). Al provenir de una cepa GRAS puede ser obtenida directamente y aplicada sin tener que hacer manipulación genética para cambiarla de sistema. Es por eso que solo la nisina ha sido explotada comercialmente. En 2003, Danisco's Nisaplin™ fue considerada la empresa más comercial de nisina empleada en conservación de alimentos. El producto contiene 2.5% de ingrediente activo, 77.5% de NaCl, 12% de proteína de leche y 6% de carbohidratos (Jones *et al.*, 2005).

2.4.5 Aplicaciones de las bacteriocinas y los péptidos antimicrobianos

2.4.5.1 En heridas y úlceras

Los péptidos antimicrobianos se manifiestan durante el proceso de reparación de heridas ya que contribuyen a la eliminación de infecciones y estimulan la reparación de tejidos, esto se ha vinculado con la observación de que en las úlceras cutáneas que no sanan si hay bajas concentraciones del péptido LL-37. Por tanto se ha propuesto el uso de algunos péptidos como un potencial terapéutico en el tratamiento de quemaduras y úlceras (Murphy *et al.*, 1993).

Por otra parte se ha observado que la HBD2 (b-defensinas humanas tipo 2) que se encuentra en el epitelio de las superficies internas y externas del cuerpo humano, tales como la piel y el tracto respiratorio e intestinal (Hiratsuka *et al.*, 1998) inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* in vitro sugiriendo que HBD2 tiene una función importante en el desarrollo de gastritis inducida por *H. pylori*. El péptido antimicrobiano procariótico nisina (producido por bacterias) es otro posible agente terapéutico para el tratamiento de úlceras gástricas causadas por *H. pylori* (Jenssen *et al.*, 2006).

2.4.5.2 Promotores o inhibidores de apoptosis

De forma natural algunos péptidos producidos en organismos se han demostrado a poder inhibir o promover apoptosis, como como LL-37 producido por gran variedad de células epiteliales humanas, con capacidad de inhibir apoptosis en neutrófilos, en contraste, se ha demostrado que promueve la apoptosis de células

primarias del epitelio respiratorio, que es el revestimiento de las vías respiratorias, que se extiende desde la cavidad nasal a través de la ramificación del árbol respiratorio hasta los sacos aéreos terminales de los pulmones (Barlow *et al.*, 2006).

2.4.5.3 Aplicación en el área veterinaria

Se ha empleado el uso del péptido esculentin 1–21 (proveniente de la piel de rana) para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno (Islas-Rodríguez *et al.*, 2009) con buenos resultados. Siendo la mastitis clínica y subclínica las dos formas principales de la inflamación de las glándulas mamarias en respuesta a una invasión bacteriana. Caracterizándose por una disminución de la producción de leche, con considerables alteraciones de su composición (por ejemplo, disminución de proteínas, grasas, contenido de lactosa, aumento en el recuento de leucocitos) (Kitchen, 1981).

2.4.5.4 En el área de los alimentos

Existen además estudios enfocados en el uso de los péptidos antimicrobianos como conservadores en los alimentos, presentando ventajas como:

- La utilización de las bacteriocinas como conservadores de los alimentos, permitiría la sustitución de aditivos químicos de síntesis por otros naturales, elaborados por microorganismos considerados como seguros en los alimentos.

- Como las bacteriocinas son resistentes al calor, acidez, baja actividad de agua (A_w), etc., pueden utilizarse para incrementar la seguridad y la vida útil de muchos alimentos.
- Los alimentos con bacteriocinas purificadas mejoran la oferta de alimentos considerados como nutraceúticos o funcionales, lo que puede mejorar su imagen comercial y de competitividad en la industria alimentaria (Hernández, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

El género *Streptomyces* es conocido por su capacidad de producir gran cantidad de metabolitos secundarios, los más importantes son los antibióticos. Sin embargo, también son productores de otras moléculas poco estudiadas, entre ellas se encuentran las bacteriocinas, éstas son sustancias capaces de inhibir diversos tipos de microorganismos que van desde bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas hasta hongos. Es de gran importancia encontrar una mayor variedad de estas sustancias que actúen contra microorganismos patógenos para el humano dado que el uso excesivo de antibióticos puede ocasionar enfermedades crónicas y ha desembocado en la aparición de cepas resistentes afectando así grupos vulnerables y causando un considerable impacto socioeconómico.

3.2 Hipótesis

Tanto las condiciones de producción como las bacteriocinas sintetizadas por diferentes especies del género *Streptomyces*, pueden ser analizadas y caracterizadas con el fin de obtener información útil para su comprensión y su potencial aplicación.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Identificar, purificar y caracterizar péptidos antimicrobianos producidos por bacterias del género *Streptomyces* con actividad antagónica contra bacterias patógenas de interés en salud pública.

3.3.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas del género *Streptomyces* que produzcan péptidos antimicrobianos con actividad antibacteriana sobre bacterias patógenas.
- Seleccionar las cepas productoras de bacteriocinas y optimizar su producción.
- Purificar la bacteriocina de interés a partir de la cepa productora e identificar el gen o clúster que involucrado en la síntesis de al menos una bacteriocina.

- Caracterizar y determinar la estabilidad de la bacteriocina purificada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención y conservación de esporas de especies del género *Streptomyces*.

Para la obtención de esporas y conservación de cultivos, diferentes cepas de *Streptomyces* (*S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber*, *S. avermitilis*, *S. nigrescens*, *S. hygrosopicus* y *S. CC48*) fueron incubadas por aproximadamente dos semanas o hasta existir un cambio de coloración del medio. Cultivos en medio sólido Soya-Manitol (harina de soya 20 g/L, Difco D-mannitol 20 g/L, Agar bacteriológico 20 g/L). En condiciones estériles se adicionaron entonces 3 mL de agua destilada estéril (DDW) a los cultivos con ayuda de una micropipeta y con la punta se raspó la superficie del cultivo para resuspender las esporas, las cuales fueron transferidas a viales de 15 mL y se aforaron luego a 10 mL con DDW. Para romper la cadena de esporas las suspensiones fueron mezcladas por agitación vigorosa con vórtex hasta alcanzar la homogeneidad. Las suspensiones homogéneas de esporas fueron filtradas a través de un filtro de algodón estéril y centrifugadas a 4500 rpm por 10 min, tras lo cual se decantaron y las pastillas fueron finalmente resuspendidas en 1 mL de glicerol estéril al 10%. Las esporas se almacenaron a -70°C (Shepherd *et al.*, 2010).

4.2 Identificación de contaminantes

4.2.1 Cultivo de esporas en caja

Para comprobar la pureza de las esporas conservadas, se realizó un cultivo de 40 µL de esporas (10^7 e/mL) de *Streptomyces* en cajas Petri con agar Soya-Manitol (harina de soya 20 g/L, D-manitol 20g/L, agar bacteriológico 20g/L) previamente esterilizado por duplicado, y se incubó a 28°C, observando periódicamente la presencia o ausencia de contaminaciones.

4.3 Identificación de especies del género *Streptomyces* con actividad antibacteriana

Esporas conservadas en glicerol al 10% de diferentes cepas de este género fueron cultivadas en medio líquido YEME (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L, glucosa 10 g/L y sucrosa 170 g/L) a 28°C y 200 rpm, por aproximadamente 8 días (Orsaria *et al.*, 1998) o hasta que mostraron un cambio visible de coloración del medio. Una vez llegado este punto, se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min y se conservó el sobrenadante, que fue probado por el método de difusión de pozos contra diferentes bacterias patógenas (*Micrococcus luteus*, *Bacillus aerius*, *Salmonella spp.*, *Bacillus wiedmannii*, *Streptococcus canis*, *Enterococcus caseiflavus*, *Bacillus cereus* 183, *Bacillus cereus* st. JCM 2152, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*) a manera de bacteria indicadora. Para realizarlo, se prepararon cajas con 20 mL de agar de pozos (0.7 g de TSB (caldo soya tripticaseína) y 6 g de agar bacteriológico en 500 mL) y 140 µL

(1×10^9 cel/mL) de la bacteria a probar, y una vez solidificado se hicieron pozos de 8 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Las cajas fueron almacenadas 2 h a 28°C para eliminar la humedad, tiempo tras el cual se agregaron los sobrenadantes obtenidos del cultivo de las *Streptomyces* a los pozos; las cajas se incubaron por 12 h a 4°C para lograr difusión, seguido de una incubación de 24 h a 37°C o 28°C, dependiendo de la bacteria contra la que se probó la actividad antimicrobiana, después se determinó el halo de inhibición. Para confirmar la identidad de aquellas cepas que mostraron actividad se realizó la secuenciación de un fragmento del gen 16S rDNA utilizando oligonucleótidos: StrepB directo ACAAGCCCTGGAAACGGGGT y StrepE reverso CACCAGGAATTCCGATCT, diseñados por Rintala et al., en 2001. Para la amplificación se preparó la siguiente mezcla de reacción: 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 1X de Taq buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -MgCl₂, 2 mM de MgCl₂, DMSO (3%) y 1U de Taq Polymerase (Termofisher). El protocolo de PCR fue como sigue: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 68°C y 1.5 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1.5% (p/v).

4.4 Análisis de las condiciones óptimas para la producción de compuestos antimicrobianos.

Con el fin de conocer las mejores condiciones para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, se realizaron curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones (Tabla 1). Cada 24 h se tomaron dos muestras de cada

replica, una para monitorear la densidad óptica a 600 nm y la otra para ser centrifugada a 13,000 rpm por 2 min y el sobrenadante probado en pozos contra bacteria indicadora para conocer la actividad; posteriormente se calculó la actividad específica tras cuantificar la concentración de proteína en los sobrenadantes.

Tabla 1. Condiciones de cultivo empleadas en las curvas crecimiento

	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)
A	YEME ¹	28	200
B	TSB ²	28	200
C	MIN ³	28	200
D	YEME	37	200
E	TSB	37	200

¹**YEME:** Medio específico para el género *Streptomyces* (Shepherd *et al.*, 2010)

²**TSB:** Tryptic Soy Broth

³**MIN:** Medio mínimo para el género *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985)

4.5 Análisis estadístico de las diferentes condiciones de crecimiento.

Usando el programa Statgraphics Centurion XVI.I se realizó un ANOVA multifactorial de los datos obtenidos con un intervalo de confianza del 95%, con el cual se identificó que variables fueron estadísticamente significativas, posteriormente y por medio de una comparación de medias por el método de Tukey se conoció que nivel o niveles de las variables que presentaban significancia. Con base a estos análisis se pudo determinar cuál de los tratamientos empleados fue el más apropiado para la producción de compuestos antimicrobianos.

4.6 Fraccionamiento con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄).

Las cepas *Streptomyces* fueron cultivadas bajo las mejores condiciones determinadas por el ensayo de análisis de las condiciones para producción de compuestos antimicrobianos. Los cultivos fueron luego centrifugados a 5000 rpm por 15 min, para conservar el sobrenadante y desechar la pastilla.

El fraccionamiento se comenzó con una saturación de sulfato de amonio del 30%. Se dejó precipitando a temperatura ambiente por 2 h en agitación, después se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min y se resuspendieron las proteínas precipitadas en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8. Posteriormente al sobrenadante se le agregó el sulfato de amonio necesario para alcanzar el 40% de saturación y se repitió el proceso. Lo mismo se realizó para las saturaciones al 50, 60, 70 y 80%. Todas las fracciones que se obtuvieron fueron luego dializadas en buffer de fosfatos 100mM (pH 6.8) durante una noche a 4°C, usando membranas con corte de 3 kDa. Finalmente las fracciones fueron cuantificadas por método de Bradford y probadas en pozos contra la bacteria indicadora.

4.7 Producción y precipitación de las probables bacteriocinas.

Para cada cepa se utilizaron las condiciones óptimas de cultivo y precipitación detectadas en las pruebas anteriores. En general, se utilizó el medio específico YEME, a una temperatura de 28°C (a excepción de *S. violaceoruber*, que se cultivó a 37°C) por un lapso de 300 h. Los cultivos fueron luego centrifugados a 7,000 rpm por 20 min para precipitar y desechar las células en una pastilla. Las precipitaciones se realizaron a una saturación de sulfato de amonio de 50% para las cepas *S.*

violaceoruber y *nigrescens*, 60% para *S. griseus* y 40% para *S. bottropensis* a 4 °C con agitación constante durante una noche. Las proteínas precipitadas fueron sedimentadas por centrifugación a 10,000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en buffer de fosfato 100 mM (pH 6.8), después se dializó durante una noche a 4°C contra el mismo buffer utilizando tubos de mini-diálisis y membranas con un corte de 3 kDa. Las proteínas dializadas se almacenaron a -20 °C (Barboza *et al.*, 2007).

La actividad, tanto de los sobrenadantes sin precipitar como de los precipitados se comprobó en prueba de pozos, como se indicó anteriormente. Para comparar la presencia de compuestos proteicos entre los sobrenadantes y sus precipitados con sulfato de amonio, se elaboró un gel Tris-Tricina SDS-PAGE y finalmente se realizó una tinción en plata (Mortz *et al.*, 2001) con el fin de detectar compuestos proteicos en concentraciones más bajas (< 0.5 ng) en especial de bajo peso molecular (probables bacteriocinas).

4.8 Actividad antibacteriana de las bacteriocinas parcialmente purificadas contra bacteria indicadora *B. cereus* 2152 en medio líquido.

En un matraz que contenía 75 mL de medio TSB se adicionaron 157.5 µg de la sustancia tipo bacteriocina parcialmente purificada por precipitación de sulfato de amonio, posteriormente cada matraz fue inoculado con 75 µL de preinóculo de la bacteria indicadora *B. cereus* 2152 a una densidad óptica de 0.5. Los cultivos inoculados fueron incubados a una temperatura de 28°C con una agitación constante de 200 rpm durante 10 h, se tomaron muestras periódicas a cada hora

para medir densidad óptica a 600 nm. Los datos obtenidos fueron posteriormente analizados y graficados. Esta prueba se realizó para cada sustancia tipo bacteriocina producida por cada cepa de *Streptomyces* analizada en este estudio.

4.9 Interacción antimicrobiana entre las cepas del género *Streptomyces*.

Veinte microlitros de una suspensión de esporas a una concentración de 10^7 esp/mL fue sembrada por método de extensión en placa sobre medio sólido YEME-agar. Sobre el cultivo se dispusieron discos estériles de papel filtro con un diámetro de 8 mm previamente impregnados con 20 μ L de la sustancia tipo bacteriocina producida por cada cepa, discos impregnados con 20 μ L de gentamicina (20 mg/mL) fueron usados como control positivo. Los cultivos se incubaron por 48 h a 28°C. Los halos fueron finalmente medidos y la actividad específica calculada.

4.10 Análisis de percepción de quorum utilizando las probables bacteriocinas como inductores.

Se realizaron diluciones seriadas de las probables bacteriocinas parcialmente purificadas (1:10, 1:100, 1:1000) y se probaron en pozos contra *B. cereus* para detectar actividad. Posteriormente se cultivaron cepas de *Streptomyces* a 28°C en medio específico YEME por 322 h, agregando las probables bacteriocinas parcialmente purificadas y sus diluciones como inductores (1 μ L/1 mL). Las primeras cuatro muestras se tomaron cada 12 h, siguiendo después cada 24 h. Estas

muestras se tomaron por duplicado, una para monitorear la densidad óptica a 600 nm y la otra para ser centrifugada a 13,000 rpm por 2 min y el sobrenadante probado en pozos contra *B. cereus* como bacteria indicadora para conocer la actividad. Los datos obtenidos fueron luego graficados y comparados.

4.11 Caracterización parcial de las probables bacteriocinas.

4.11.1 Efecto de la temperatura.

Alícuotas de los extractos crudos de las producciones de las cepas *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens* fueron incubadas a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 120°C) por 10 min y probadas en prueba de pozos contra bacteria indicadora.

4.11.2 Efecto del pH.

Las muestras de los extractos crudos de las producciones de las cepas *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens* fueron diluidas a una proporción 1:10 en buffer a diferentes pH e incubado a temperatura ambiente por 2 h, para ver el efecto sobre la actividad de nuestros probables péptidos. Los buffers (buffer de glicina, ácido cítrico, MES, Tris base y fosfato de sodio) se usaron a una concentración final de 100 mM a pH 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y 20 mM a pH 3 y 4. Las muestras tratadas se evaluaron por ensayo de difusión en pozos contra la bacteria indicadora *B. cereus* y se usó como control positivo la muestra tratada en buffer de

fosfatos pH 6.8, 100 mM y como control negativo cada uno de los buffers antes mencionados.

4.11.3 Tratamiento con enzimas proteolíticas.

Noventa μL de cada muestra fueron tratados con proteinasa K producida por células de *Pichia pastoris* con un gen clonado de *Tritirachium álbum* (Thermo Scientific™), proteasa de *S. griseus* (SIGMA®), tripsina extraída de páncreas porcino (SIGMA®) y quimiotripsina de páncreas bovino (SIGMA®), cada uno a una concentración final de 1 mg/mL. Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 h. Las muestras tratadas fueron probadas por ensayo de pozos contra la bacteria indicadora, usando como controles las diluciones sin tratar y las soluciones de las enzimas a la misma concentración (Barboza *et al.*, 2007).

4.12 SDS-PAGE y ensayo de actividad por sobrecapa.

Diez μL de las muestras resuspendidas en buffer de Laemmli fueron corridas en geles de Tris-tricina por duplicado. Un gel fue teñido en solución de Coomassie y el otro se lavó 4 veces en intervalos de 10 minutos con agua destilada. El gel se colocó después en caja Petri estéril y se realizó una sobrecapa con agar pozos (0.7 g de TSB (caldo soya tripticaseína) mezclado con 6 g de agar bacteriológico en 500 mL) y 140 μL (1×10^9 cel/mL) de la bacteria *B. cereus*. Se dejó incubar a 28°C por una noche.

4.13 Actividad y validación de tratamiento de enzimas proteolíticas en sobrecapa.

Muestras de los extractos crudos de las producciones de las cepas *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens* tratadas con enzimas proteolíticas se corrieron en un gel SDS-PAGE Tris-Tricina al 16%, utilizando como control positivo la muestra sin tratar. El gel se lavó cada 10 minutos con agua destilada por 4 veces. El gel se colocó después en caja Petri estéril y se realizó una sobrecapa con agar pozos (0.7 g de TSB (caldo soya tripticaseína) mezclado con 6 g de agar bacteriológico en 500 mL y 140 μ L (1×10^9 cel/mL) de la bacteria a probar. Se incubó entonces a 28°C por una noche.

4.14 Fraccionamiento por peso molecular y prueba de actividad por sobrecapa para identificación de la probable bacteriocina de *S. nigrescens*.

Los productos obtenidos tras la diálisis de los precipitados con sulfato de amonio, se fraccionaron mediante filtración por centrifuga usando cartuchos con membranas (Amicon) de diferente corte (30 kDa, 10 k Da y 3 kDa). Las muestras de aproximadamente 2 mL se colocaron en el cartucho con membrana de 30 kDa, se centrifugó luego a 5000 rpm hasta haber filtrado aproximadamente 1 mL; se agregó este filtrado a un cartucho con membrana de 10 kDa y se repitió la operación hasta haber filtrado 500 μ L aproximadamente, fracción la cual se filtró ahora en cartucho con membrana de 3 kDa bajo las mismas condiciones. Los tamaños moleculares de las diferentes fracciones obtenidas fueron >30 kDa, <30->10 KDa, <10->3 kDa y

finalmente <3 kDa. Las muestras fueron preparadas usando 50 µL de muestra y 20 µL de Buffer de Laemmli sin agente reductor, las muestras no fueron calentadas. Estas fracciones fueron corridas en gel Tris-Tricina SDS-Page al 16% por duplicado, uno con el fin de ser teñidas con plata como se indicó anteriormente y otro para probar en sobrecapa.

4.15 Aplicación de diferentes tratamientos para la eliminación de proteínas de alto peso molecular y conglomerados en las muestras de *S. nigrescens*.

Se buscó que la probable bacteriocina producida por *S. nigrescens* estuviese lo más libre de proteínas de alto peso molecular, y analizar si de esta forma se evitaba la formación de conglomerados, para lo que se probaron diferentes tratamientos a la producción de esta cepa, como se indica a continuación.

El sobrenadante libre de células de un cultivo de 12 días de *S. nigrescens* fue calentado a 80°C por 10 minutos en baño María, luego centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos y el remanente fue precipitado con una saturación al 50% de sulfato de amonio, la pastilla que fue obtenida se resuspendió en 1 mL de buffer 100 mM de glicina, ácido cítrico y fosfato de sodio a pH 10 para posteriormente ser dializado contra el mismo buffer por una noche.

El sobrenadante libre de células de otro cultivo de 12 días de *S. nigrescens* fue precipitado con una saturación al 50% de sulfato de amonio, las pastillas obtenidas se resuspendieron en 1 mL de buffer 100 mM de glicina, ácido cítrico y fosfato de

sodio a pH 10 para posteriormente ser dializados contra el mismo buffer por una noche.

Otra muestra que también fue resuspendida y dializada por una noche en el mismo buffer se calentó a 80°C durante 10 minutos.

Se observó la presencia o ausencia de conglomerados y la muestra fue corrida en un gel SDS-PAGE tris-tricina al 16 % y teñido en azul de Coomassie, como control se usó una muestra que no fue tratada con calor para comparar patrón de bandeo.

4.15.1 Purificación de la bacteriocina producida por *S. nigrescens*.

Para precipitar los conglomerados de la bacteriocina, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos una alícuota de 1 mL de suspensión de la bacteriocina resuspendida y dializada en buffer pH 10; la pastilla precipitada tras la centrifugación fue lavada 3 veces y resuspendida en 500 µL con el mismo buffer, mientras que el sobrenadante fue filtrado en un cartucho estéril para jeringa de .45 µm (Thermo Fisher).

El filtrado se purificó usando la columna de exclusión molecular Superdex 30 HiLoad 16/60 (GE Healthcare), usando como fase móvil un buffer pH 10, 100 mM en un flujo isocrático de 1mL/min. Se obtuvieron fracciones de 2 mL que fueron colectadas para posteriormente ser sometidas a prueba de actividad por ensayo de gotas en césped (Barefoot y Klaenhammer, 1983).

Las fracciones que mostraron actividad fueron concentradas hasta alcanzar un volumen de 500 µL por fraccionamiento en cartucho con un corte de membrana de 3 kDa. Las muestras obtenidas en cada uno de los pasos antes mencionados fueron

corridas en gel SDS-PAGE tris-tricina al 16 % por duplicado, para ser teñido en azul de Coomassie y también sometido a prueba de actividad en sobrecapa.

4.16 Electroforesis en gel bidimensional (2-D).

Una muestra de 200 µg de la bacteriocina producida por *S. nigrescens* se llevó a un volumen de 125 µL con buffer de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, anfolitos 1%, DTT 1%), posteriormente se esparció la muestra en un carril para isoelectroenfoque (IEF) del PROTEAN i12™ IEF System (BIO-RAD) y encima se colocó una tira de 7 cm pH 3-10 por 15 min, tiempo tras el cual fueron adicionados 2 mL de aceite mineral. Se dejó 16 horas en rehidratación. A continuación se describen los pasos durante la corrida del 2D.

Paso	Voltaje	Ramp	Tiempo	Unidades
1	250	Rápido	00:20	HH:MM
2	4000	Gradual	01:00	HH:MM
3	4000	Rápido	15000	Vh
4	500		Mantener	

Una vez terminado el isoelectroenfoque la tira se retiró del carril y el exceso de aceite fue removido. Las tiras se equilibraron durante 20 min en Buffer de Equilibrio 1 (Urea 6 M, SDS 2%, Tris HCl pH 8.8 (1.5 M) 0.06 M, Glicerol 20% y DDW) + DTT al 2%, y 20 min más en Buffer de equilibrio 2 (igual al buffer de equilibrio 1 pero

sustituyendo el DTT por Iodoacetamida al 2.5%); la tira se enjuagó en buffer de corrida SDS-PAGE tras el equilibrio.

La tira fue colocada sobre un gel Tris-Tricina SDS-PAGE al 16% preparado 24 h antes y sellada con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%.

La electroforesis fue llevada a cabo a 80 V y el gel fue teñido finalmente con azul de Coomasie. Los spots obtenidos fueron cortados y mandados a secuenciar.

4.17 Determinación actividad inhibidora de proteasas de la bacteriocina de *S. nigrescens*.

Para la determinación de actividad inhibidora de proteasas se emplearon 2.5 μ L de albumina (2.5 mg/mL) y se mezclaron por separado con 3.0 μ L de proteinasa K, tripsina o quimiotripsina (10 mg/mL) y 1 μ L de bacteriocina purificada (2.1 mg/mL) las reacciones fueron llevadas a 15 μ L de volumen final con agua destilada estéril e incubadas 1 h a 37°C, posteriormente 5 μ L de Buffer de Laemmli sin agente reductor fueron adicionados a cada reacción y se llevaron a ebullición por 5 min. Las mismas mezclas pero sin bacteriocina fueron usadas como controles.

Las muestras fueron corridas en un gel Tris-tricina SDS-PAGE al 16% a 120 V, el cual fue finalmente teñido en azul de Coomasie y desteñido en solución de ácido acético 10% para observar el patrón de bandeo obtenido.

4.18 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la bacteriocina de *S. nigrescens* contra bacterias patógenas.

Con el fin de conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se prepararon matraces de 250 mL con 100 ml de medio TSB que fueron después adicionados con la bacteriocina semipurificada a diferentes concentraciones finales (2.1, 1.0 y 0.5 µg/mL) y finalmente inoculados con 100 µL de preinóculo 1×10^8 cel/mL de la cepa indicadora a analizar (*B. cereus* 2152, *M. luteus*, *S. canis* y *V. parahemoliticus*), cultivos de las mismas bacterias sin bacteriocina añadida fueron usados como control. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 37°C y a una agitación constante de 200 rpm durante 10 h, tomando muestras cada hora para determinar la densidad óptica (DO) a 600 nm. Los datos obtenidos fueron posteriormente analizados y graficados.

4.19 Identificación y amplificación de los genes codificantes de las probables bacteriocinas.

Los genomas de las cepas fueron analizados mediante el programa bioinformático BAGEL (Bagel automated bacteriocin mining) (<http://bagel.molgenrug.nl/>) para obtener una predicción de posibles bacteriocinas. Con esta información, se diseñaron oligonucleótidos específicos para obtener la amplificación correspondiente a los genes estructurales y clústeres completos de algunas de las bacteriocinas probablemente producidas por estas cepas Tabla 2. Tomando además ventaja de que hay algunos reportes de bacteriocinas de *S. griseus*, decidimos usar los oligonucleótidos reportados (Claesen y Bibb, 2011) con la finalidad de amplificar uno de estos genes y clonarlo. Para la reacción de PCR se usó DNA genómico extraído por el método propuesto por Poutou *et al.*, en 2005.

Para la amplificación de genes estructurales la mezcla de reacción contenía: 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 1X de Taq buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - MgCl_2 , 2 mM de MgCl_2 y 1U de Taq Polymerase (Termofisher®). El protocolo de PCR fue como sigue: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 68°C y 30 s a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1.5% (p/v).

Para la amplificación de clústeres completos se empleó DMSO (concentración final 3%) y el buffer utilizado fue el buffer 5x GC phusion, específico para la Phusion™ DNA Polymerase (Thermo Scientific™). El protocolo de PCR fue como sigue: 30 s a 98°C; 30 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 58°C y 2.5 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1% (p/v).

Para el caso de *S. bottropensis* se usaron los oligonucleótidos para el gen estructural de la bottromcina D reportado por Hou *et al.* en 2012; se buscaron además genes ortólogos de la cepa *S. avermitilis* y se logró identificar un clúster de genes relacionados, también se diseñaron oligonucleótidos para el clúster de esta última cepa.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplificación (pb)	Datos
CypcluFw	CCCAAGCTTGTGCCGCCGGGCCCG	12,148	Cipemicina clúster completo
CypcluRv	CCCAAGCTTGACGACGCCCGGCACG		
CypFw	CCCAAGCTTGTGCGATCTGAGATGACTCTTAC	195	Cipemicina gen estructural
CypRv	CCCAAGCTTTCAGCAGACCAGGCAGATCGTG		

GrmA-Fw	AGGAGCGGGCCTTGCTC	968	Grisemicina gen estructural con 380 pb río arriba y 393 río abajo ¹
GrmA-Rv	CGCCGCGAGTGTCAAC		
BGrmestF	CCCAAGCTTTCAGCAGACGAGACAGATGGTG	195	Grisemicina gen estructural
BGrmestR	CCCAAGCTTATGCGACTCGATTGATTGCAAC		
GrmA-HF	CCCAAGCTTCTACTTGGCATGTATGAACCTTCGGATGGCGC	2,069	Grisemicina estructural e hidrolasa
GrmA-HR	CCCAAGCTTATGCGACTCGATTGATTGCAACGCAGGAGAC		
GrmA-MF	CCCAAGCTTGGTGACCGTCGCGCCCTCGGCGGCGAG	3,920	Grisemicina estructural a metil transferasa
GrmA-HR	CCCAAGCTTATGCGACTCGATTGATTGCAACGCAGGAGAC		
GrmA-TF	CCCAAGCTTCCCAGCTCCACCCGGCCGTCGCGCGCCTC	4,549	Grisemicina estructural a transportador ABC
GrmA-HR	CCCAAGCTTATGCGACTCGATTGATTGCAACGCAGGAGAC		
GripepFw	CCCAAGCTTAACCTCTGTGGGTTTCTGGG	9,602	Griseopeptina clúster completo
GripepRv	CCCAAGCTTCGACCCGCTGGTCACTGCA		
AvrCluFw	CCGGAATTCTCTTCCATCAGCGCGGCCAGCGC	7,968	Averminopectina clúster completo
AvrCluRv	CCGGAATTCGCGCTGGCCGCGCTGATGGAAGA		
BtpCluFw	CCGGAATTCGATGCCCGCCGAGGTCGAG	7,855	Ortólogo de Averminopectina en <i>S.</i> <i>bototropensis</i>
BtpCluRv	CCGGAATTCCTCGTGCCCGAGGACACGAAC		
BottoestFw	ATGGGACCCGTAGTCGTATTTCGAC	135	Gen estructural de la bottromicina
BottoestRv	CCAGGCGCCAGGACTCCA		

¹Oligos reportados por Claesen y Bibb, 2011

4.19.1 Prueba de antagonismo contra *Escherichia coli* TOP 10 y *E. coli* BL21 Rosetta 2.

Se realizaron pruebas de antagonismo para comprobar que la producción de *S. griseus* no tiene actividad contra las bacterias en las que se transformara el clúster. *S. griseus* se creció en medio YEME por 12 días a 28 °C, una muestra del sobrenadante libre de células fue conservada para ser probada y el resto fue precipitado por saturación de sulfato de amonio, luego se resuspendió y dializó en buffer pH 10. Tanto el sobrenadante como la bacteriocina parcialmente purificada

fueron probadas en ensayo de difusión de pozos contra *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 Rosetta 2 (cepas donadas por el laboratorio de Bioquímica estructural a cargo del Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro, LANGEBIO).

4.20 Clonación de segmentos del clúster de grisemicina.

Se obtuvieron amplificaciones que corresponden diferentes segmentos del clúster de grisemicina, se seleccionó la amplificación de mayor tamaño, la cual recibió el nombre de fragmento A-T, por comenzar con el gen GrmA y terminar en el gen GrmT; esta amplificación fue obtenida con los oligonucleótidos GrmA-TF y GrmA-HR. Este se clonó en el vector de expresión pCold I (vector donado por el laboratorio de Bioquímica estructural a cargo del Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro, LANGEBIO) y se transformó en la cepa BL21 Rosetta 2 para la expresión con el objetivo de obtener la cepa recombinante *E. coli*:BL21R2::pColdI::AT. Para conocer exactamente los genes que fueron clonados se secuenciaron las construcciones con oligonucleótidos: pColdFw, GrmA-TFw, GrmA-MFw y GrmA-HFw (Tabla3). Las secuencias fueron analizadas mediante alineamientos con las secuencias reportadas para el clúster de grisemicina.

4.20.1 Secuenciación de la construcción.

Se usaron las combinaciones de oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3 para amplificar segmentos del clúster dentro del vector y posteriormente secuenciarlos.

Tabla 3. Juego de oligonucleótidos usados para amplificar segmentos de la construcción.

Oligo directo	Oligo reverso	Genes amplificados	Tamaño esperado
pCold Fw	pColdRv	A, H, L, D, M, T	4,800 pb
pCold Fw	AHRv	A, H	2,069 pb
pCold Fw	AMRv	A, M	3,920 pb
pCold Fw	ATRv	A, H, L, D, M, T	4,549 pb
pCold Rv	GrmH-Cter Fw	L, D, M, T	2,512 pb

4.21 Inducción de la grisemicina.

Un preinóculo de la bacteria transformada fue dejado crecer en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) por 16 h a 37°C. De este preinóculo se tomaron 5 mL para inocular 500 mL de LB con ampicilina y cloranfenicol y se dejó crecer hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. En este punto se tomó 1 mL del cultivo para usarlo como muestra no inducida, el resto se colocó a 4°C por 15 minutos, tiempo tras el cual se le agregaron 500 µL de IPTG 0.5 M como inductor. La inducción se dejó 16 h a 18°C.

De este cultivo se tomó 1 mL como muestra inducida, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se decantó. El resto del cultivo fue igualmente centrifugado. El botón resultante se almacenó a -70°C y el sobrenadante se precipitó con 60% de sulfato de amonio y se dializó contra buffer de fosfatos pH 6.8, 100 mM. Los botones tanto de las muestras inducidas y no inducidas se resuspendieron en 50 µL de buffer de fosfatos pH 6.8 100 mM y fueron sonicados por 30 seg a una amplitud de 40, para finalmente ser resuspendidos en 50 µL de buffer de Laemmli y hervidos 5 minutos.

4.22 Actividad de la cepa transformada *E. coli* BL21::R2::pColdl::A-T en pozos.

Con 100 μ L de los preinóculos de las bacterias *E. coli*::BL21R2::pColdl::AT y *E. coli* BL21::R2 con el vector pColdl vacío se inocularon 10 mL de medio líquido LB con ampicilina y cloranfenicol. Los cultivos fueron llevados a una DO_{600nm} de 0.5, cuando alcanzaron la DO se tomó una muestra de 1 mL de cada cultivo y se centrifugó 5 min a 13,000 rpm (muestras no inducidas), el resto de los cultivos se colocaron en hielo por 15 min, tiempo tras el cual se agregaron 10 μ L de IPTG 0.5 M a cada cultivo y se dejaron induciendo a 16°C toda la noche. Pasado el tiempo se tomó 1 mL del cultivo inducido de cada cepa y se centrifugaron por 5 min a 13,000 rpm. Las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 100 μ L de NaCl 150 mM, luego hervidas 5 minutos y sonicadas a una amplitud de 40 por 1 min. Las muestras fueron probadas en pozos contra la bacteria indicadora *B. cereus* 2152.

4.23 Comprobar la expresión del gen de grisemicina por síntesis de cDNA.

4.23.1 Extracción de RNA.

Se realizó una inducción en las bacterias *E. coli*::BL21R2::pColdl::AT y *E. coli* BL21::R2 con el vector pColdl vacío; se tomaron muestras al tiempo cero (no inducidas) y a las 16 h de inducción con 0.5 mM de IPTG a 16°C. Las muestras fueron centrifugadas y decantadas, los botones se utilizaron para realizar la extracción de RNA total.

Los botones resuspendidos en 750 μ L de trizol (TRI Reagent[®]) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se le adicionaron 150 μ L de cloroformo y se homogeneizó en vortex a 3600 rpm por 30 segundos, posteriormente se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se separaron las fases por centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue tratada con 375 μ L de isopropanol, se incubó por 10 minutos; después se centrifugo por 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

La pastilla se resuspendió en 750 μ L de etanol al 75%, se agitó suavemente en vortex y se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente la pastilla se resuspendió en 30 μ L de agua libre de RNAsa y se incubó a 60°C por 10 minutos.

4.23.2 Tratamiento con DNAsa.

El tratamiento se realizó en una mezcla de reacción que se ajustó a 10 μ L con agua libre de RNAsa y que contenía 1 μ L de DNAsa I (Jena Bioscience), 1 μ g de RNA y 1 μ L de 10x DNAsa Reaction Buffer (100 mM Tris HCl pH 7.6, 25 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂).

La reacción se incubo a 37°C por 30 minutos y posteriormente a 67°C por 10 minutos para inactivar la enzima y así detener la reacción.

4.23.3 Síntesis del cDNA.

Se utilizó el sistema iScript Reverse Transcription supermix for RT-qPCR (Bio-Rad), haciendo una reacción con 2 µL del supermix y 8 µL de la reacción previamente tratada con DNAsa, llevando a un volumen final de 10 µL.

Las condiciones de reacción fueron: 25°C/5 min para el priming, 46°C/20 min para la transcripción reversa y 95°C/1 min para la inactivación de la enzima.

4.23.4 Amplificación del gen de Grisemicina a partir del cDNA.

Para la reacción de PCR se usó el cDNA obtenido de las muestras de los cultivos de la cepa transformada *E. coli* BL21::R2 con el vector pColdI vacío inducido y de la transformante *E. coli*::BL21R2::pColdI::AT tanto inducido como no inducido y se usó agua como control negativo. Para la amplificación del gen estructural, la mezcla de reacción de 10 µL contenía: 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1X de Taq buffer + (NH₄)₂SO₄-MgCl₂, 2 mM de MgCl₂, DMSO (concentración final 3%), 1 µL de la reacción de síntesis del cDNA y 1U de Taq Polymerase (Termofisher). El protocolo de PCR fue como sigue: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 68°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1.5% (p/v).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Obtención y conservación de esporas de especies del género *Streptomyces*

Esporas de diferentes cepas del género *Streptomyces* (*S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber*, *S. avermitilis*, *S. nigrescens*, *S. hygrosopicus*, *S. pristinaespiralis* y *S. rochei* CC48) fueron obtenidas por el método propuesto por Shepherd *et al.* en 2010 y conservadas a -70°C. Dichas esporas fueron sembradas en agar Soya-Manitol comprobando así su pureza.

Los cultivos de *S. avermitilis* mostraron crecimiento anormal sobre la superficie del *Streptomyces*, debido a esta contaminación descartamos a esta cepa para producción de péptidos antimicrobianos.

5.2 Identificación de especies del género *Streptomyces* con actividad antibacteriana

Se logró detectar actividad antimicrobiana sobre varias bacterias patógenas en cuatro de las ocho cepas de *Streptomyces* que fueron probadas; estas fueron *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceruber* y *S. nigrescens* cuyo rango de actividad puede observarse en la Tabla 4. Esta prueba también nos permitió seleccionar una bacteria indicadora para usar en posteriores pruebas, se seleccionó a *Bacillus cereus* cepa JCM 2152 debido a que fue la bacteria con mayor susceptibilidad y a la vez fue sensible a los sobrenadantes de las cuatro *Streptomyces* con actividad antibacteriana, además de ser señalada como una bacteria patógena responsable

de producir intoxicación alimentaria (Granum y Lund, 1997). Aunque solo cuatro cepas de *Streptomyces* mostraron efecto inhibitorio sobre los microorganismos probados no significa que las otras especies de *Streptomyces* (es decir, *S. avermitilis*, *S. hygroscopicus*, *S. pristinoespiralis* y *S. rochei* CC48) no producen bacteriocinas; es posible que tengan efectos inhibitorios contra diferentes bacterias no probadas en este estudio. Cabe señalar que las cepas *S. bottropensis* y *S. griseus* se han reportado como cepas productoras de las bacteriocinas bottromicina y grisemicina respectivamente (Claesen y Bibb 2011; Hou *et al.* 2012), sin embargo la información respecto a la caracterización y rango de sus actividades es limitada.

Tabla 4. Actividad antagonica de los sobrenadantes libre de células de las cepas de *Streptomyces* probados contra bacterias patógenas.

Cepa	MI	Ba	Ss	Bw	Sc	Ec	BcA	BcJ	Vp	Lm	Li
<i>S. bottropensis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>S. griseus</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>S. violaceruber</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>S. nigrescens</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>S. hygroscopicus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. pristinaespiralis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. CC48</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. avermitilis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

MI, *Micrococcus luteus*; **Ba**, *Bacillus aerius*; **Ss**, *Salmonella spp.*, **Bw**, *Bacillus wiedmannii*; **Sc**, *Streptococcus canis*; **Ec**, *Enterococcus casseliflavus*; **BcA**, *Bacillus cereus* cepa 183; **BcJ**, *Bacillus cereus* cepa JCM 2152; **Vp**, *Vibrio parahaemolyticus*; **Lm**, *Listeria monocytogenes*, **Li**, *Listeria innocua*; (+) Actividad antibacteriana; (-) Sin actividad.

La identidad de las cuatro cepas que mostraron actividad antimicrobiana fueron confirmadas por secuenciación de un fragmento del 16S que se amplificó usando oligonucleótidos específicos para este género (Figura 1). Los resultados de secuenciación fueron analizados por medio de un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se encontraron los siguientes porcentajes de identidad: *S. bottropensis* KS573 (97%), *S. griseus* XylebKG-8 (99%), *S. violaceoruber* SYA3 (97%) y *S. nigrescens* CGMCC (98%).

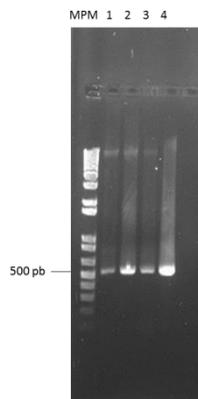


Figura 1. Amplificación del fragmento 16S rDNA de aproximadamente 500 pb. Carriles marcados como: *S. bottropensis* (1); *S. griseus* (2); *S. violaceoruber* (3); *S. nigrescens* (4); marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen®) marcado como MPM.

5.3 Análisis de las condiciones óptimas para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana.

Como puede observarse en las curvas de actividad (Figuras 2-5), la mayor actividad antimicrobiana se alcanzó al usar el medio YEME, que contiene glucosa y sacarosa, y por tanto la alta actividad probablemente se deba al agotamiento de la fuente primaria de carbono, desencadenando estrés en la bacteria y provocando la producción de compuestos antibacterianos, proceso que recibe el nombre de “represión catabólica por fuente de carbono”, y que anteriormente se ha reportado para bacterias Gram positivas (Brückner y Titgemeyer, 2004; Jankovic y Brückner, 2007).

En específico, las mejores actividades se obtuvieron bajo la condición “A” (medio YEME, 28°C y 200 rpm) para 3 de las cepas, las cuales fueron: *S. bottropensis* (14998 U/mg a las 336 h), *S. violaceoruber* (8367 U/mg a las 240 h) y *S. nigrescens* (8881 U/mg a las 312 h), a diferencia de *S. griseus*, cuya actividad más alta (15373 U/mg) se detectó en la condición “D” (medio YEME, 37°C y 200 rpm) a las 312 h de incubación. Lo cual coincide con estudios previos (Leroy y De Vuyst, 2001 y Verluyten *et al.*, 2004) en que se relaciona una mayor cantidad de nutrientes con una mayor producción de actividad antimicrobiana. Por otro lado, el crecimiento poblacional de los cultivos parece no estar relacionado con la actividad puesto que para las cuatro cepas los mayores crecimientos fueron obtenidos en la condición “D” (medio TSB, 37° y 200 rpm). Por su parte la condición “C” (medio mínimo, 28°C y 200 rpm) no muestra ni buen crecimiento ni buena producción de compuestos antimicrobianos. La actividad antibacteriana y el crecimiento fueron

insignificantes para todas las especies cultivadas en medio mínimo, lo que sugiere que la producción de bacteriocina depende de los nutrientes presentes en el medio, como se sugirió anteriormente (Garsa et al. 2014).

Otros estudios que utilizan *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 como modelo (Leroy y De Vuyst 2001; Veryuten et al. 2004) han demostrado que un mayor contenido de nutrientes da como resultado una mejor biomasa y una mayor actividad de bacteriocina, y una menor concentración de nutrientes complejos puede causar inhibición del crecimiento, es decir, menor biomasa. Observamos un aumento en la actividad antimicrobiana al comienzo de la fase estacionaria tardía, ~ 300 h, especialmente en YEME que contiene glucosa y sacarosa, probablemente se deba al agotamiento de nutrientes y a la represión catabólica por fuente de carbono, como anteriormente se ha reportado para bacterias Gram-positivas (Brückner y Titgemeyer 2002; Masurekar 2008; Jankovic y Brückner 2007; Deutscher 2008). Es importante tener en cuenta que una de las desventajas que tiene *Streptomyces* en relación con otras bacterias Gram-positivas, como *B. thuringiensis*, es un período de crecimiento más largo requerido para obtener altos rendimientos de bacteriocina. Por ejemplo, algunas cepas de *B. thuringiensis* producen un alto nivel de bacteriocinas a las 15-25 h (Barboza-Corona et al. 2007), mientras que *Streptomyces* spp. de este trabajo requieren más de 200 h para alcanzar un alto nivel de producción de bacteriocina.

Se realizaron cultivos en medio mínimo de las cuatro cepas por un tiempo más prolongado (512 horas), a este tiempo se detectó el máximo de actividad. *S. griseus* es la cepa que más actividad mostró, 3447 U/mg a las 384 horas, seguida por *S. violaceoruber* con 3325 U/mg a las 400 h. *S. bottropensis* y *S. nigrescens*

alcanzaron su máxima actividad a las 432 h con cifras de 2795 y 1964 U/mg, respectivamente (Figura 6). Aunque la producción en medio mínimo fue mucho menor que en medio complejo esperábamos tener menos producción de otras proteínas y facilitar así la purificación de nuestro péptido. Para corroborar o descartar esto, los extractos de medio mínimo se analizaron en Tris-Tricina SDS-PAGE y se compararon con los extractos obtenidos en medio YEME y como se observa en la Figura 7, no existe una diferencia relevante en el patrón de bandas que indique una especificidad en la producción del compuesto antibacteriano.

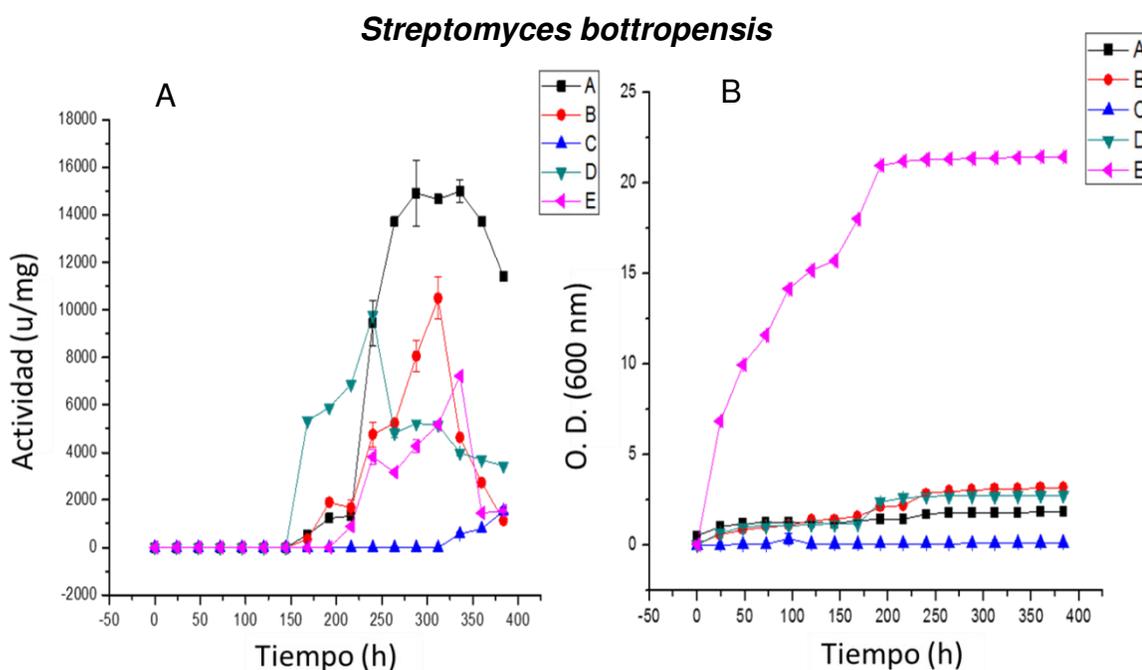


Figura 2. A) Curva de actividad específica de *S. bottropensis* bajo diferentes condiciones de cultivo. Condiciones marcadas como A: medio YEME, 28°C y 200 rpm, B: medio TSB, 28°C y 200 rpm, C: medio mínimo NMMP, 28°C y 200 rpm, D: medio YEME, 37°C y 200 rpm, E: medio TSB, 37°C y 200 rpm y F: medio NMMP, 37°C y 200 rpm. **B)** Curva de crecimiento de *S. bottropensis* bajo diferentes condiciones de cultivo.

Streptomyces griseus

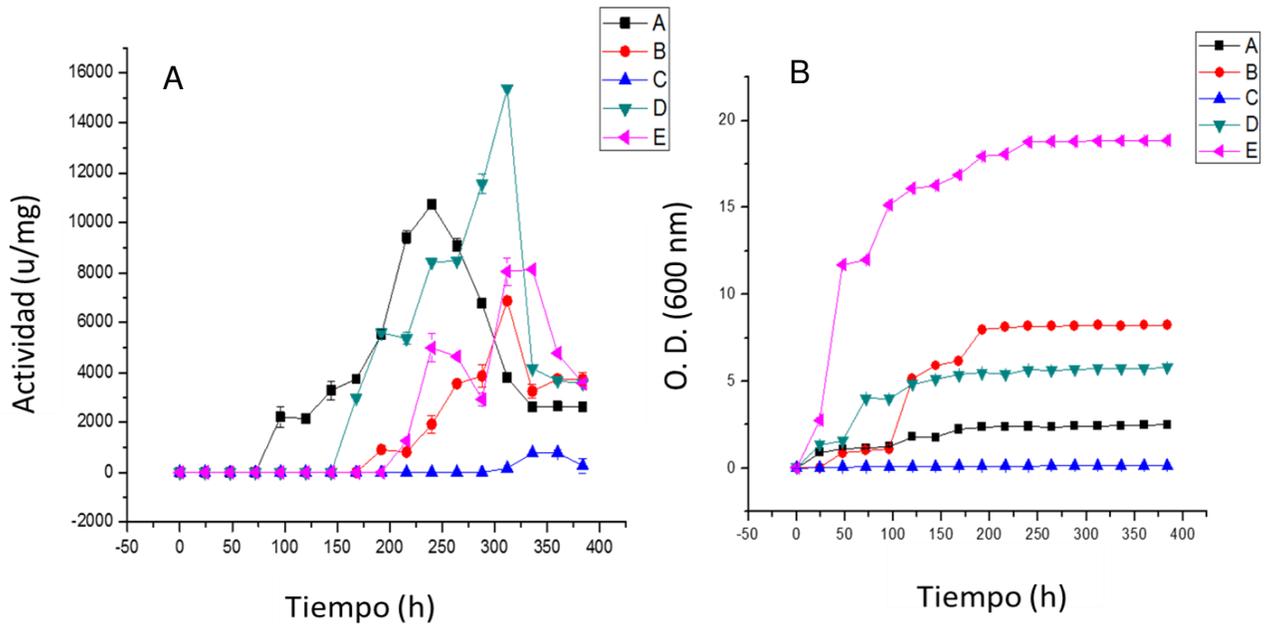


Figura 3. A) Curva de actividad específica de *S. griseus* bajo diferentes condiciones de cultivo. Condiciones marcadas como A: medio YEME, 28°C y 200 rpm, B: medio TSB, 28°C y 200 rpm, C: medio mínimo NMMP, 28°C y 200 rpm, D: medio YEME, 37°C y 200 rpm, E: medio TSB, 37°C y 200 rpm y F: medio NMMP, 37°C y 200 rpm. **B)** Curva de crecimiento de *S. griseus* bajo diferentes condiciones de cultivo.

Streptomyces violaceuber

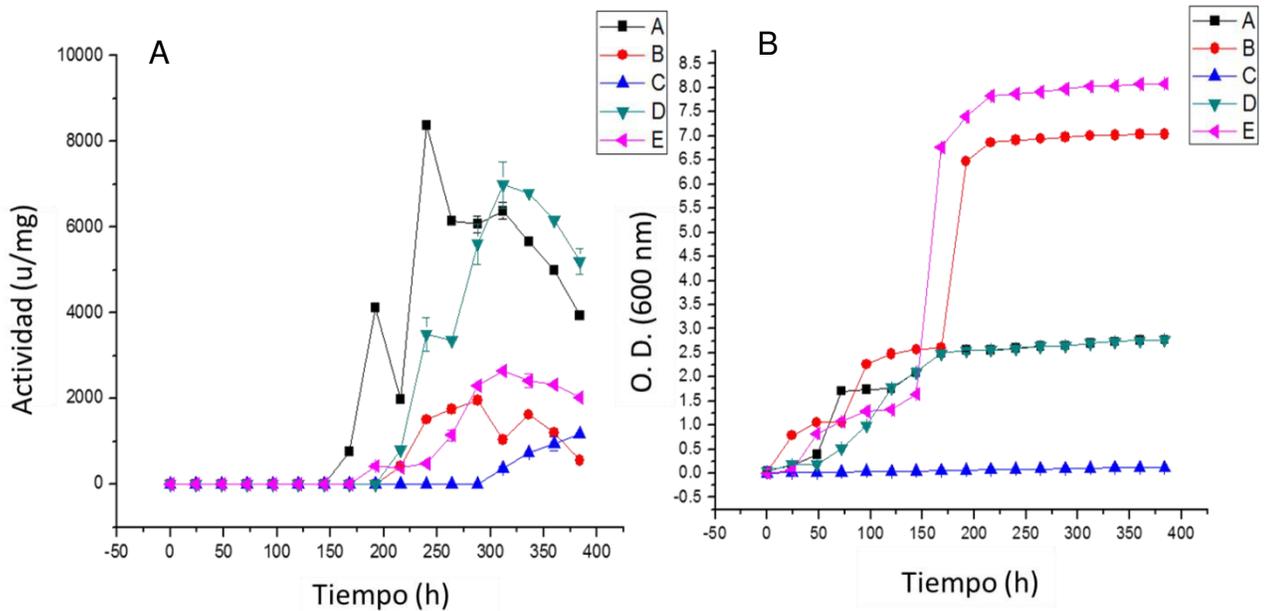


Figura 4. A) Curva de actividad específica de *S. violaceus* bajo diferentes condiciones de cultivo. Condiciones marcadas como A: medio YEME, 28°C y 200 rpm, B: medio TSB, 28°C y 200 rpm, C: medio mínimo NMMP, 28°C y 200 rpm, D: medio YEME, 37°C y 200 rpm, E: medio TSB, 37°C y 200 rpm y F: medio NMMP, 37°C y 200 rpm. **B)** Curva de crecimiento de *S. violaceus* bajo diferentes condiciones de cultivo.

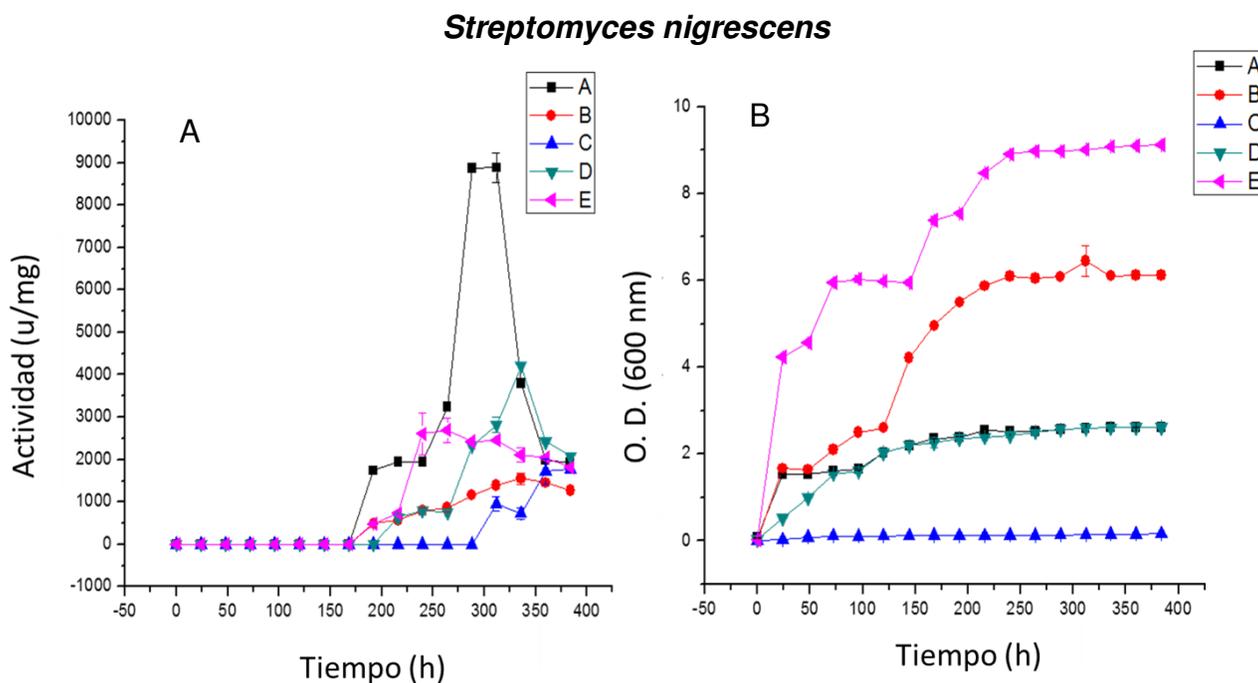


Figura 5. A) Curva de actividad específica de *S. nigrescens* bajo diferentes condiciones de cultivo. Condiciones marcadas como A: medio YEME, 28°C y 200 rpm, B: medio TSB, 28°C y 200 rpm, C: medio mínimo NMMP, 28°C y 200 rpm, D: medio YEME, 37°C y 200 rpm, E: medio TSB, 37°C y 200 rpm y F: medio NMMP, 37°C y 200 rpm. **B)** Curva de crecimiento de *S. nigrescens* bajo diferentes condiciones de cultivo.

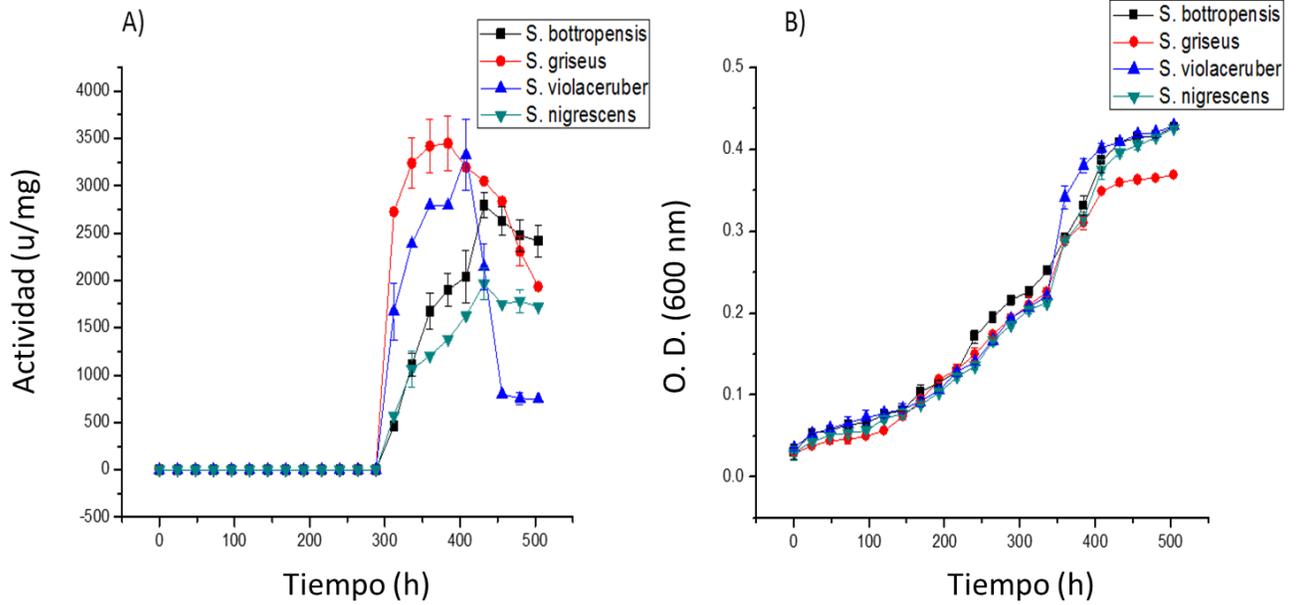


Figura 6. A) Curva de actividad específica de las diferentes cepas utilizando medio mínimo como medio de cultivo. **B)** Curva de crecimiento de las diferentes cepas utilizando medio mínimo como medio de cultivo.

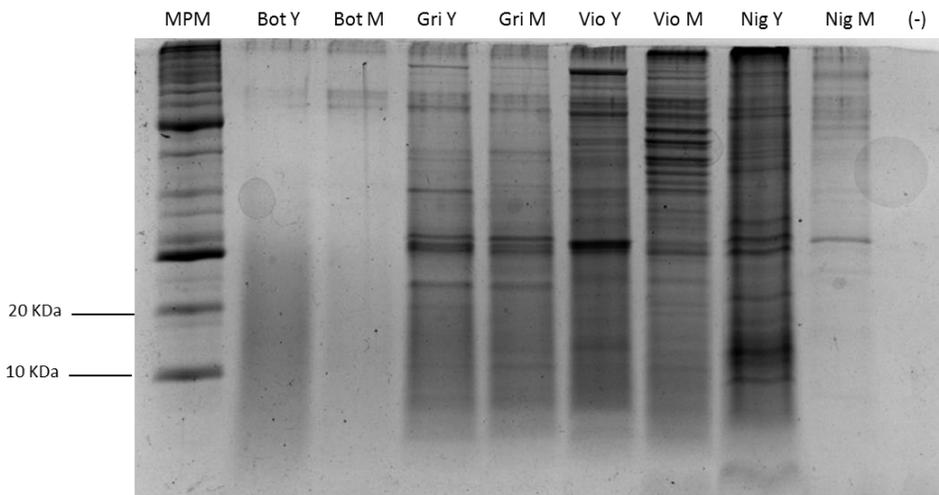


Figura 7. Comparación en gel Tris-Tricina de la producción de proteínas en medio complejo YEME (Y) y medio mínimo (M) de las diferentes cepas. Cepas marcadas como: *S. bottropensis* (Bot), *S. griseus* (Gri), *S. violaceoruber* (Vio) y *S. nigrescens* (Nig).

5.4 Análisis estadístico de la producción de compuestos antimicrobianos bajo diferentes condiciones de cultivo.

Con base a estos resultados se pudo observar que la combinación de factores tanto de temperatura y medio de cultivo son determinantes para una buena producción de compuestos antibacterianos al resultar ser significativos, aunque una temperatura más alta provoca un mayor crecimiento bacteriano en cualquier medio (Figuras 2-5B), es el uso de un medio específico como YEME lo que propicia una mayor síntesis del metabolito con actividad (Tabla 5).

La actividad antimicrobiana fue muy baja en un medio mínimo, lo que nos podría indicar que la producción de compuesto antimicrobiano no está relacionada a alguna sensibilidad de la cepa ante el estrés por falta de nutrientes. Las condiciones más favorables encontradas para cada cepa resultaron ser: la condición “A”, donde el medio YEME y la temperatura de 28°C son estadísticamente significativos para *S. bottropensis* y *S. nigrescens* (Tabla 5); mientras que para las cepas *S. griseus* y *S. violaceoruber* las condiciones “A” y “D” son estadísticamente similares. Estos resultados sugieren que tal como se ha reportado previamente (Garsa et al. 2014), la producción de bacteriocinas está directamente relacionada a la concentración de nutrientes en el medio.

Tabla 5. Condiciones de cultivo bajo las cuales se obtuvieron las mejores producciones de compuesto antibacteriano para cada una de las cepas.

<i>S. bottropensis</i>	<i>S. griseus</i>	<i>S. violaceoruber</i>	<i>S. nigrescens</i>
------------------------	-------------------	-------------------------	----------------------

Tiempo (h)	336*	312*	240*	312*
Temperatura (°C)	28*	37/28	37/28	28*
Medio	YEME*	YEME*	YEME*	YEME*

* Variables con significancia estadística obtenida por medio de un análisis multifactorial y comparación de medias por el método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

5.5 Fraccionamiento con sulfato de amonio

Tal como se puede observar en la Tabla 6 se requiere entre el 40-60% de saturación para precipitar las bacteriocinas de *Streptomyces*, a estas concentraciones se obtuvieron las mayores actividades siendo el sobrenadante de *S. bottropensis* el que menor concentración de sal necesita para una mejor precipitación (40%) y *S. griseus* las más alta (70%), las otras dos cepas restantes se precipitaron con una concentración del 50% cada una. Cabe señalar que no hay estudios previos respecto a la precipitación de bacteriocinas de *Streptomyces*; pero en anteriores investigaciones con bacteriocinas de otras fuentes se ha usado una saturación del 80% (Yamamoto *et al.*, 2003; Barboza-Corona *et al.*, 2007). Esto se debe a que una mayor concentración asegura la precipitación de los compuestos proteicos en el medio; sin embargo, esto la vuelve menos específica, lo que dificulta la purificación del compuesto de interés del extracto total.

Al monitorear los precipitados en geles de Tris Tricina solo se encontró una banda de bajo peso molecular (debajo de 5 kDa) en *S. nigrescens* bajo las saturaciones de 30 y 40% (Figura 8 D), lo que sugiere la presencia de un péptido antimicrobiano (bacteriocina). Cuando se realizó el ensayo de sobrecapa de las fracciones de esta cepa (Figura 9), se encontró actividad en ambos carriles

previamente mencionados y la actividad coincidió con el peso molecular de la banda. También se detectó una actividad similar en el carril correspondiente al 50% de saturación, sin embargo, en el gel no se detectó alguna banda (Figura 9). Obtener actividad en el ensayo de sobrecapa y no detectar una banda en el gel teñido podría explicarse por un error al cargar el gel o a que la cantidad necesaria para observar actividad sea tan baja que no se detecte fácilmente en gel. Por último, no se logró determinar actividad por ensayo de sobrecapa para las demás cepas.

Tabla 6. Actividad (U/mg) de las fracciones obtenidas de las diferentes cepas de *Streptomyces*.

% de saturación de ((NH₄)₂SO₄)	<i>S. bottropensis</i>	<i>S. griseus</i>	<i>S. violaceoruber</i>	<i>S. nigrescens</i>
30%	6120 ± 301	5435 ± 0	1744 ± 36	3403 ± 0
40%	6640 ± 378	6159 ± 243	2036 ± 80	2837 ± 0
50%	5664 ± 224	5266 ± 0	2578 ± 0	6229 ± 150
60%	4426 ± 0	7437 ± 229	2067 ± 0	3477 ± 77
70%	2398 ± 0	---	1857 ± 56	---
80%	---	---	---	---
(+)	4247 ± 151	4606 ± 212	2937 ± 112	2131 ± 165

U, una unidad esta definida como el área del halo de inhibición en mm²

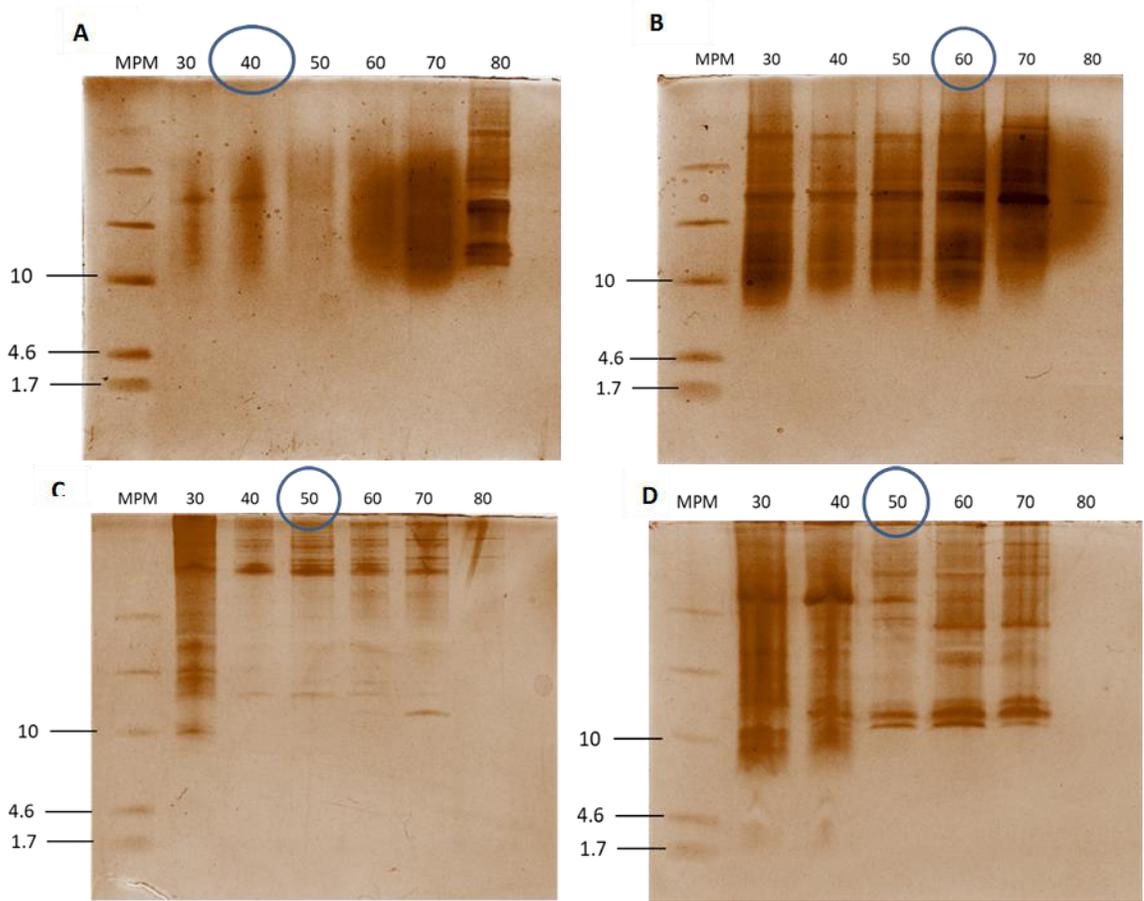


Figura 8. Gel Tris-Tricina mostrando los diferentes patrones de bandeo obtenidos con diferentes concentraciones de saturación (30-80%) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del sobrenadante de (A) *S. bottropensis*, (B) *S. griseus*, (C) *S. violaceoruber* y (D) *S. nigrescens*. Se encierra en un círculo la concentración de sal de sulfato de amonio en la que se obtuvo una mayor actividad.

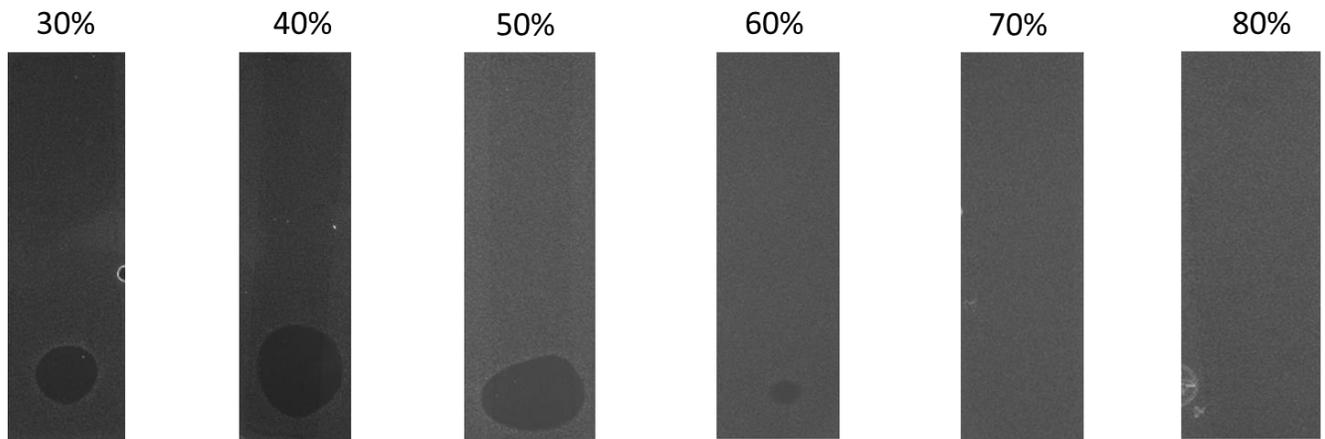


Figura 9. Actividad en prueba de sobrecapa de los precipitados con diferentes porcentajes de saturación de la cepa *S. nigrescens*.

5.6 Producción y precipitación de las probables bacteriocinas.

Una vez determinada la concentración de sulfato de amonio necesaria para precipitar las bacteriocinas de cada cepa se realizó la producción de éstas, los sobrenadantes obtenidos fueron precipitados, resuspendidos en una centésima parte del volumen inicial del cultivo con buffer de fosfato 100 mM (pH 6.8) y posteriormente dializados toda la noche contra el mismo buffer. Una vez comprobada la actividad en pozos tanto de los sobrenadantes como de los dializados, se realizó un gel Tris-Tricina al 16% para monitorear la integridad de los extractos. Como puede observarse en la Figura 10, los dializados muestran un patrón de bandas más abundante e intenso en comparación de los sobrenadantes debido a que las proteínas del sobrenadante fueron concentradas tras la precipitación. Para el caso de *S. nigrescens* podemos observar una banda de bajo peso molecular en la muestra precipitada y dializada, tal banda corresponde a un péptido con actividad antimicrobiana, como se observó en el ensayo de sobrecapa (Figura 9).

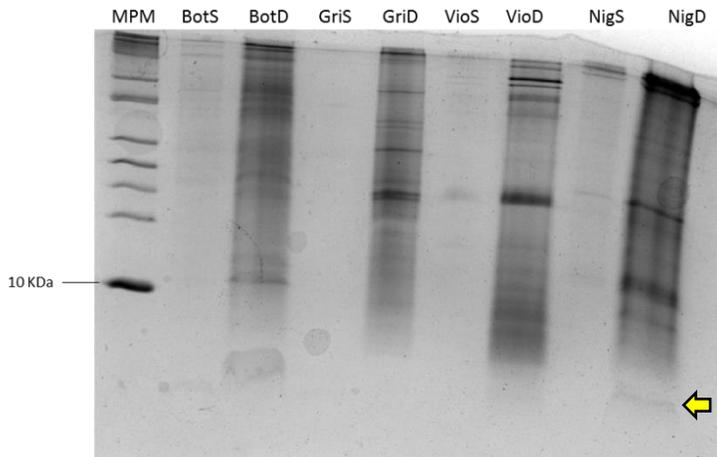


Figura 10. Comparación en gel Tris-Tricina de la presencia de proteínas en sobrenadante y tras su precipitación con sulfato de amonio y dializado. Cepas marcadas como: *S. bottropensis* (Bot), *S. griseus* (Gri), *S. violaceoruber* (Vio) y *S. nigrescens* (Nig). Sobrenadantes (S) y Concentrados (D). Flecha indicando presencia de probables péptidos antimicrobianos.

5.7 Efecto de las bacteriocinas concentradas sobre *B. cereus* cepa JCM 2152

Los extractos concentrados de las cepas de *Streptomyces* seleccionadas tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. cereus* JCM 2152 (Figura 11). De las cuatro cepas analizadas, *S. bottropensis* fue la que tuvo un menor efecto, alcanzó una DO de 0.3 a las 8 horas de cultivo, mientras que la cepa silvestre alcanzó una DO de 0.8 a las 8 horas. Aunque hubo un efecto negativo evidente sobre el crecimiento no fue letal, el crecimiento se mantuvo en una DO de 0.3 durante las dos siguientes horas. Lo que podría sugerir un comportamiento bacteriostático en lugar de bactericida; si bien no hay reportes que clasifiquen su actividad como tal, ya antes se identificó un comportamiento similar por parte de la

bottromicina producida por *S. bottropensis*, pero actuando en sinergia con la patulina (Dulaney y Jacobsen, 1987).

Para el caso de las otras 3 cepas (*S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens*) si se observó un mayor efecto, la DO apenas alcanzo 0.1, por lo que estas cepas parecen ser más efectivas contra *B. cereus* JCM 2152.

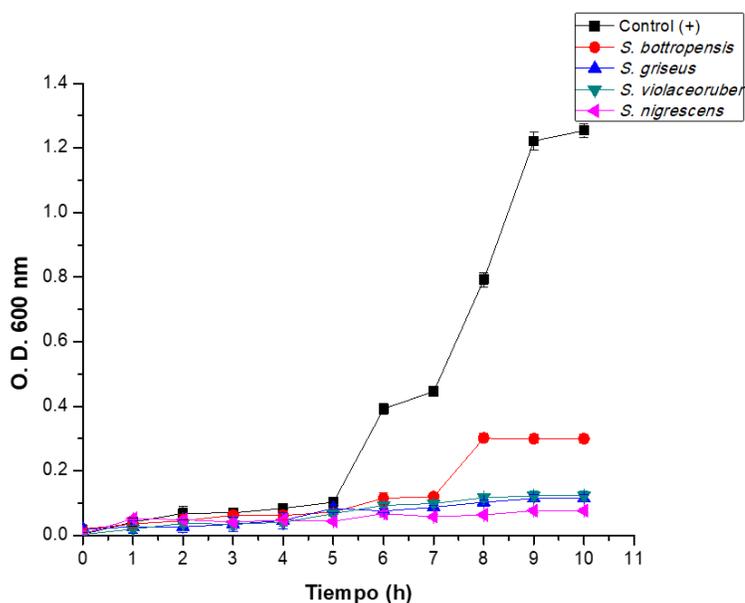


Figura 11. Curva de crecimiento bacteriano de la bacteria indicadora *B. cereus* 2152 en medio liquido adicionado con las bacteriocinas parcialmente purificadas de las diferentes cepas del género *Streptomyces*.

5.8 Interacción antimicrobiana entre las cepas del género *Streptomyces*.

Ninguna de las cuatro cepas es activa contra sí misma, lo cual es un comportamiento esperado debido a que está reportado que en los clústeres de bacteriocinas, independientemente de la cepa productora suelen estar presentes genes de inmunidad que aseguran que estos metabolitos no repercutan en la cepa

misma (Ishibashi et al., 2014; Cleasen y Bibb, 2011; Stein *et al.*, 2003). Por otro lado, el rango de actividad entre las cepas es variado. *S. nigrescens* fue la cepa más activa, pues tuvo efecto inhibitorio sobre todas las demás; *S. griseus* fue activa solo sobre *S. bottropensis* y *S. violaceoruber*. Las dos últimas no mostraron efecto inhibitorio sobre ninguna cepa (Tabla 7). Estos resultados señalan que las bacteriocinas de las cepas son distintas entre sí, con excepción de las producidas por *S. bottropensis* y *S. violaceoruber*, cuyo mismo comportamiento sugiere una probable similitud ya sea entre los sistemas de inmunidad o la estructura de sus bacteriocinas, tal como Nisl de *Lactococcus lactis* es homólogo a Spal y LanI en *Bacillus subtilis*, brindando inmunidad mutua (Jeong y Ha, 2018).

Tabla 7. Interacción antagónica entre las diferentes cepas de *Streptomyces*

	Bacteria indicadora			
	<i>S. bottropensis</i>	<i>S. griseus</i>	<i>S. violaceoruber</i>	<i>S. nigrescens</i>
<i>S. bottropensis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. griseus</i>	1560 ± 488	(-)	1560 ± 488	(-)
<i>S. violaceoruber</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. nigrescens</i>	11378 ± 464	12201 ± 485	9784 ± 454	(-)
(+)	2389 ± 87	2305 ± 97	2389 ± 87	2140 ± 92

(-) No se observó interacción antagónica

(+) Control positivo, se utilizó gentamicina a 20 mg/mL

5.9 Efecto de la bacteriocina de *S. nigrescens* sobre su propia producción.

Es sabido que algunas bacteriocinas, como la nisina, regulan su propia producción (Kleerebezem, 2004); con el propósito de determinar si el propio péptido de las cepas aquí estudiadas está actuando como autoinductor se diseñó un experimento donde se utilizó un extracto total a una concentración inicial de 0.48 mg/mL y diluciones de ésta 1:10, 1:100 y 1:1000. El experimento comenzó en el día cero, el cual corresponde al día de la inoculación de la cepa seleccionada; ese mismo día se agregó el extracto concentrado y las diluciones a probar a los cultivos, además, se dejó un cultivo sin extracto como control. Desde el día cero se determinaron las actividades con el fin de descartar que el aumento en la actividad se debiera a la bacteriocina agregada (Figura 12A). Se puede apreciar que el extracto concentrado y la dilución 1:10 ocasionan un incremento en la actividad a partir de la hora 225, esto no se observó con las diluciones 1:100 y 1:1000, las cuales mostraron los mismos valores que el control (Figura 12A). En lo que respecta al crecimiento, no se observó efecto alguno. Estos resultados sugieren que la bacteriocina no es la responsable de inducir su propia producción, a diferencia de las bacterias ácido lácticas (Eijsink *et al.*, 2002) sin embargo, el incremento de la actividad en las concentraciones más altas sucede solo después de que se enciende la batería para producción de bacteriocinas, es detectada y ayuda a incrementar la actividad.

S. nigrescens

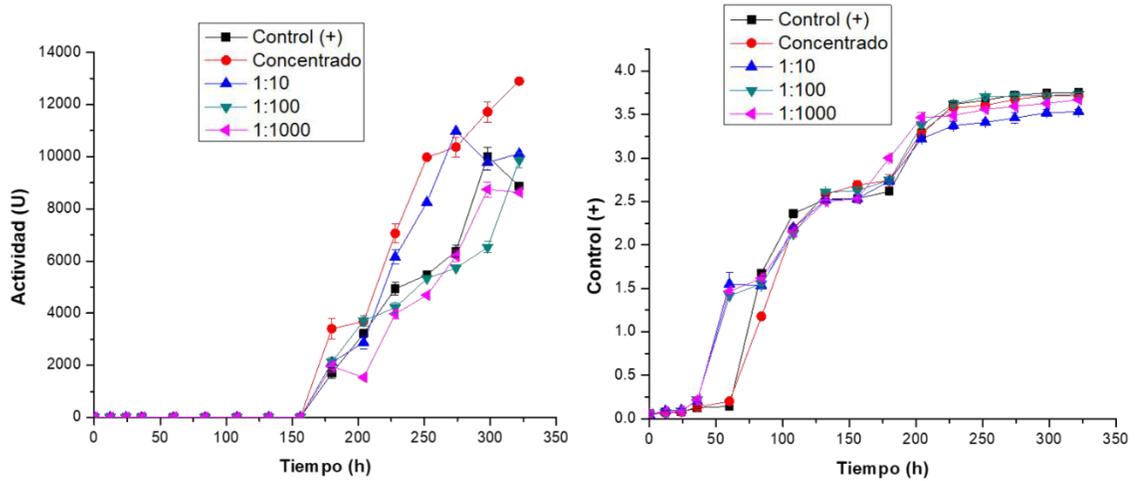


Figura 12. A) Curvas de actividad específica de la cepa *S. nigrescens* utilizando el dializado conteniendo la probable bacteriocina y sus diluciones como autoinductores. **B)** Curvas de crecimiento de la cepa *S. nigrescens* utilizando el dializado conteniendo la probable bacteriocina y sus diluciones como autoinductores.

5.10 Caracterización parcial de las probables bacteriocinas.

5.10.1 Tratamiento con diferentes temperaturas

Para determinar el efecto de la temperatura en la estabilidad y en la actividad de las probables bacteriocinas, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.161 mg/mL (*S. bottropensis*), 0.360 mg/mL (*S. griseus*), 0.293 mg/mL (*S. violaceoruber*) y 0.269 mg/mL (*S. nigrescens*). Como se muestra en la Tabla 8, las sustancias tipo bacteriocina producidas por todas las cepas de *Streptomyces* fueron estables a alta temperatura, mostrando una pequeña pérdida de actividad (alrededor del 20% para todas) en temperaturas cercanas a 100°C. A una temperatura de 121°C se perdió el 84% de actividad para *S. bottropensis* y *S. violaceoruber*, 69% para *S. griseus* y 53% para *S. nigrescens*.

Las sustancias más estables de tipo bacteriocina fueron las producidas por *S. nigrescens* y *S. griseus*. Esta alta estabilidad sugiere un potencial para que estas bacteriocinas sean empleadas en procesos que involucran altas temperaturas sin perder sus propiedades antimicrobianas, tal como otras bacteriocinas comerciales, por ejemplo la nisina, cuya actividad se conserva también a los 120 °C, y cuya estabilidad puede mejorarse con el uso de recubrimientos de ácido poliláctido (PLA), polietilenglicol (PLA/PEG) ó etilvinilacetato (EVA) (Nostro *et al.*, 2010; Holcapkova *et al.*, 2018)

Tabla 8. Actividad (U/mg) de los precipitados de las cepas de *Streptomyces* tras someterse a tratamiento por triplicado con cada una de las diferentes temperaturas.

	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C	120 °C	(+)
<i>S. bottropensis</i>	7663 ± 697	6653 ± 649	7140 ± 212	7140 ± 212	6653 ± 649	6166 ± 324	1262 ± 228	7663 ± 348
<i>S. griseus</i>	3893 ± 0	3893 ± 0	3659 ± 311	3659 ± 155	3425 ± 155	3192 ± 0	1209 ± 112	3893 ± 0
<i>S. violaceoruber</i>	4208 ± 382	3653 ± 356	3921 ± 0	4208 ± 382	3653 ± 356	3386 ± 125	693 ± 125	4208 ± 382
<i>S. nigrescens</i>	4906 ± 208	4279 ± 0	4592 ± 208	4279 ± 0	3987 ± 194	3696 ± 194	2345 ± 165	4906 ± 208

(+) Extracto proteico tratado a 28°C como control.

5.10.2 Tratamiento con diferentes pH

Para determinar el efecto del pH en la actividad de las probables bacteriocinas, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.307 mg/mL (*S. bottropensis*), 0.776 mg/mL (*S. griseus*), 0.711 mg/mL (*S. violaceoruber*) y 0.470 mg/mL (*S. nigrescens*). La actividad fue estable a pH 5, 6 y neutro para las cuatro muestras, mientras que el uso de un pH de 3 disminuyó en un 7-10% la actividad total. Los productos de *S. bottropensis* y *S. violacerouber* perdieron completamente

su actividad a pH 8, comportamientos similares se han encontrado al tratar bacteriocinas de algunas bacterias ácido lácticas, las cuales tienen una actividad óptima a pH 6-7 y pierden completamente su actividad en pH básico (Widayati et al., 2019), sin embargo la estabilidad puede variar dependiendo de la bacteriocina, por ejemplo la bacteriocina producida por *L. spicheri* si bien mostró igualmente un óptimo en los pH 6 y 7, perdió actividad en pH ácido (Gautam y Sharma, 2015).

Por su parte, el producto de *S. griseus*, solo se ve afectado a pH 10; por último el producto de *S. nigrescens* fue el más estable ya que aun después de los tratamientos dentro del rango de pH básico su actividad se mantuvo (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad específica del extracto dializado de *S. nigrescens* tras tratamiento con diferentes pH.

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	(+)
<i>S. bottropensis</i>	6889 ± 248	6889 ± 248	7386 ± 0	7386 ± 0	7386 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7386 ± 0
<i>S. griseus</i>	2724 ± 98	2920 ± 0	2920 ± 0	2920 ± 0	2920 ± 0	2920 ± 0	2724 ± 0	0 ± 0	2920 ± 0
<i>S. violaceoruber</i>	2972 ± 107	2972 ± 107	3186 ± 0	3186 ± 0	3186 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3186 ± 0
<i>S. nigrescens</i>	5166 ± 171	5166 ± 171	5509 ± 0	5509 ± 0	5509 ± 0	5509 ± 0	5509 ± 0	5509 ± 0	5509 ± 0

(+) Extracto proteico tratado con buffer de fosfatos pH 6.8

La estabilidad de las bacteriocinas producidas por *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens* en un amplio rango de pH y temperatura, sugiere que tienen potencial para aplicarse como agentes de biocontrol, especialmente en la industria alimentaria dado que mostraron actividad contra bacterias patógenas, incluyendo *M. luteus* (Vivier et al. 1994; Peces et al. 1997), *B. wiedmannii* (Miller et al. 2016), *E. casseliflavus* (Reid et al. 2001) y *B. cereus* (Anderson-Borge et al. 2001).

5.10.3 Tratamiento con enzimas proteolíticas.

Para determinar la respuesta de las probables bacteriocinas frente a enzimas proteolíticas, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.307 mg/mL (*S. bottropensis*), 0.776 mg/mL (*S. griseus*), 0.711 mg/mL (*S. violaceoruber*) y 0.470 mg/mL (*S. nigrescens*).

La naturaleza proteica de las bacteriocinas producidas en este estudio se demostró por la pérdida o disminución significativa de la actividad antimicrobiana después del tratamiento de preparaciones crudas con enzimas proteolíticas. El efecto de la proteinasa K sobre la actividad de las bacteriocinas fue el esperado, ya que esta enzima hidroliza aminoácidos alifáticos, posiblemente los residuos más comunes en proteínas y péptidos (Smith 1966). Además, el tratamiento con proteinasa, tripsina y quimotripsina confirmó efectos variables sobre la actividad antibacteriana de estas sustancias similares a bacteriocina (Figura 13). Los últimos resultados proporcionan información sobre la composición de aminoácidos de estos péptidos activos; por ejemplo, los extractos de *S. bottropensis* y *S. violaceoruber* fueron sensibles a las cuatro enzimas proteolíticas utilizadas, infiriendo que la arginina y la lisina (digeridas por tripsina), triptófano, tirosina o fenilalanina (digeridas por quimotripsina) podrían estar presentes en sus estructuras primarias. Por el contrario, podría esperarse una menor cantidad de estos residuos en la sustancia tipo bacteriocina de *S. griseus* y *S. nigrescens*, ya que no se detectó una gran pérdida de actividad después del tratamiento enzimático (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad específica (u/mg) del extracto dializado de las cepas de *Streptomyces* tras tratamiento con diferentes enzimas proteolíticas.

Cepa	Proteinasa K	Proteasa	Tripsina	Quimiotripsina	(+)
<i>S. bottropensis</i>	0 ± 0	360 ± 43	418 ± 33	1837 ± 297	7054 ± 441
<i>S. griseus</i>	0 ± 0	569 ± 79	820 ± 119	2280 ± 82	2404 ± 80
<i>S. violaceoruber</i>	0 ± 0	152 ± 18	138 ± 40	792 ± 105	3043 ± 190
<i>S. nigrescens</i>	0 ± 0	4606 ± 144	273 ± 28	4823 ± 189	5051 ± 172

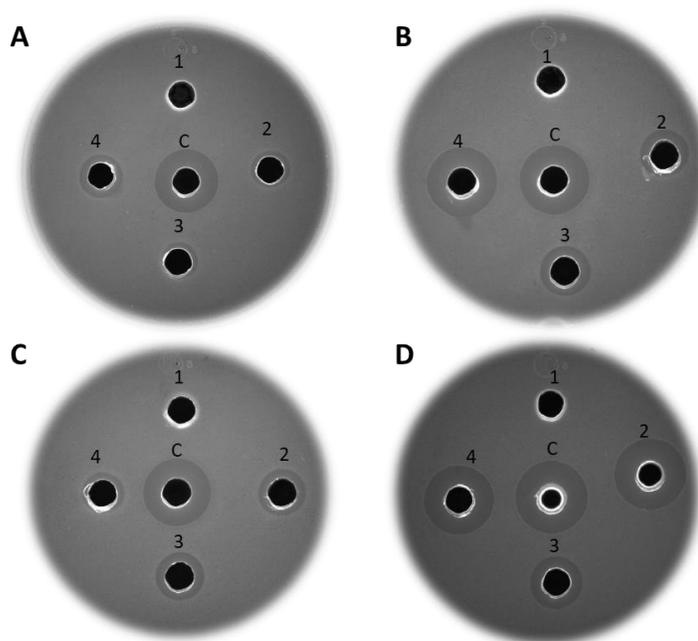


Figura 13. Actividad antimicrobiana de los compuestos dializados de **A)** *S. bottropensis*, **B)** *S. griseus*, **C)** *S. violaceoruber*, **D)** *S. nigrescens* tras tratamiento enzimático de **1)** Proteinasa K, **2)** Proteasa, **3)** Tripsina y **4)** Quimiotripsina, el control sin tratar se marca como “C”.

5.10.4 Efecto de la bacteriocina de *S. nigrescens* sobre algunas proteasas

Debido a que los extractos de *S. nigrescens* fueron resistentes a la digestión con tripsina y quimiotripsina se realizaron pruebas para determinar si estas proteasas eran inhibidas por el péptido antimicrobiano. Se ha reportado que existen péptidos antimicrobianos de plantas (defensinas) que actúan como inhibidores de serín

proteasas, específicamente con la capacidad de inhibir tripsina y quimiotripsina (de Leo et al. 2006). Para determinar si nuestros péptidos cuentan con esta característica inhibitoria de serin proteasas se realizó un ensayo donde las proteasas fueron tratadas con la bacteriocina y posteriormente se utilizaron para digerir una albumina. La bacteriocina producida por *S. nigrescens* no mostró efecto inhibitorio sobre las enzimas proteolíticas proteinasa K, tripsina y quimiotripsina, como podemos observar en la Figura 14, se observó el mismo patrón de bandas entre la muestra tratada con bacteriocina y las no tratadas lo que nos sugiere que nuestros péptidos no inhiben serin proteasas.

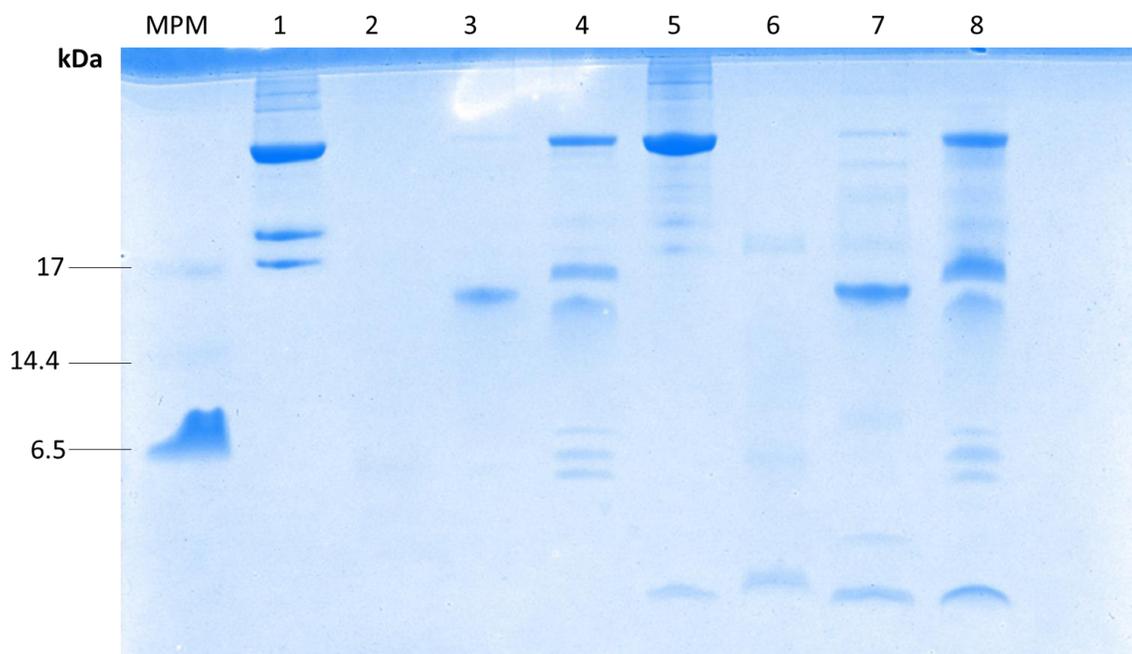


Figura 14. Digestión de la albumina por diferentes enzimas. **MPM)** marcador de peso molecular; **1)** albumina; **2)** albumina tratada con proteinasa K; **3)** albumina tratada con tripsina; **4)** albumina tratada con quimiotripsina; **5)** albumina con la bacteriocina de *S. nigrescens*; **6)** albumina tratada con proteinasa k y bacteriocina de *S. nigrescens*; **7)** albumina tratada con tripsina y bacteriocina de *S. nigrescens*; **8)** albumina tratada con quimiotripsina y bacteriocina de *S. nigrescens*.

5.11 Comprobación del efecto de las proteasas sobre la bacteriocina de *S. nigrescens*.

Con el fin de corroborar que el efecto de las proteasas se debía a la digestión del péptido antimicrobiano se realizaron ensayos de actividad por sobrecapa en gel de muestras tratadas y sin tratar. La actividad se perdió en su totalidad tras la digestión del extracto con la proteinasa K (Figura 15A), lo que nos indica que la actividad se debe a una sustancia de naturaleza proteica (Smith, 1966). La tripsina disminuyó notablemente la actividad, lo que sugiere la presencia de arginina y lisina en la estructura peptídica que al digerirse impiden el funcionamiento de la bacteriocina en la membrana del patógeno (Li *et al.*, 2013). En los tratamientos con quimiotripsina se afectó la actividad levemente, esta enzima actúa sobre los enlaces entre residuos aromáticos. Por último, se monitorearon en gel las muestras digeridas para corroborar las digestiones (Figura 16).

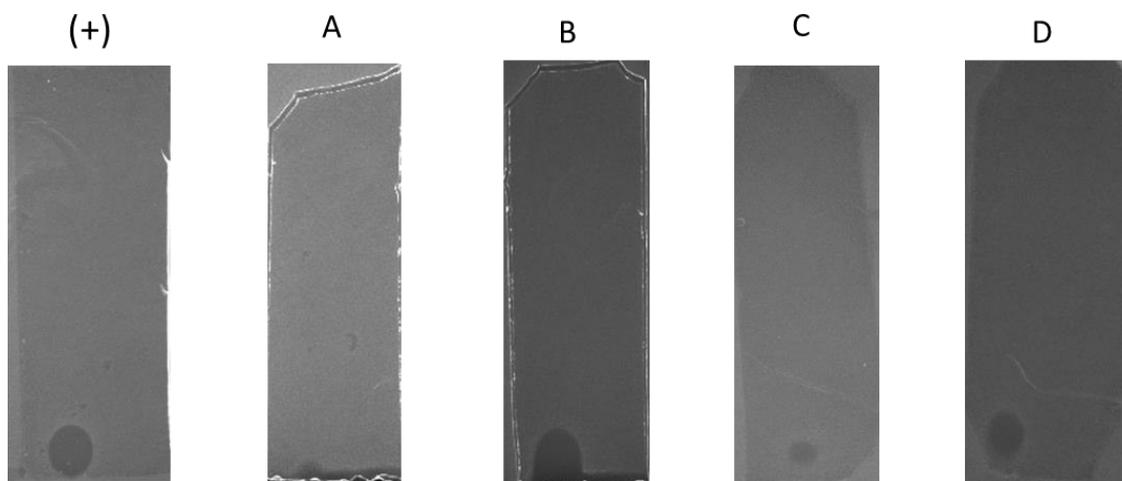


Figura 15. Actividad en sobrecapa del precipitado de la cepa *S. nigrescens* tras tratamiento con enzimas proteolíticas. Control positivo (muestra sin tratar) marcada como (+); (A), muestra tratada con proteinasa k; (B), muestra tratada con proteasa; (C), muestra tratada con tripsina; (D), muestra tratada con quimiotripsina.

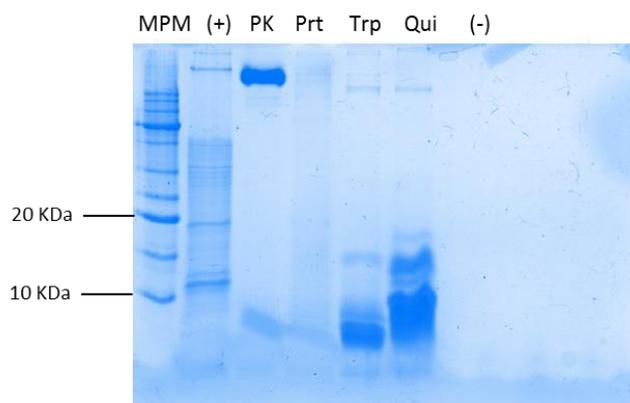


Figura 16. Gel de proteínas teñido en Coomassie para corroborar actividad proteolítica de las enzimas. MPM, marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder®); Pk, muestra tratada con proteinasa K; P, muestra tratada con proteasa; Trp, muestra tratada con tripsina; Qui, muestra tratada con quimiotripsina; control positivo marcado como (+), muestra sin tratar; control negativo marcado como (-), buffer de Laemmly sin muestra.

5.12 Fraccionamiento por peso molecular y prueba de sobrecapa para identificación de la probable bacteriocina de *S. nigrescens*

Dado que solo en el extracto de *S. nigrescens* logramos observar una banda de bajo peso molecular que prometía ser una bacteriocina continuamos con un proceso de semipurificación utilizando cartuchos de filtración con membranas de diferente corte. Debido a que la muestra una vez dializada tiene a precipitarse se realizó una centrifugación y posteriormente el sobrenadante clareado se filtró para eliminar las

partículas grandes antes de comenzar el tamizado. Aún así, al realizar el primer tamizado con la membrana de 30 kDa notamos que la proteína se seguía precipitando y por este motivo la fracción >30 kDa es la que muestra más cantidad de proteínas en todos los pesos y por lo tanto mayor actividad antimicrobiana (Figuras 17 y 18). El filtrado que paso por 30 kDa se pasó por los cartuchos con corte de 10 y posteriormente 3 kDa. Como se aprecia en la figura 17, se lograron disminuir las proteínas de alto peso molecular, lamentablemente aunque disminuímos proteínas no deseadas también disminuyó la actividad antimicrobiana (Figuras 17 y 18)

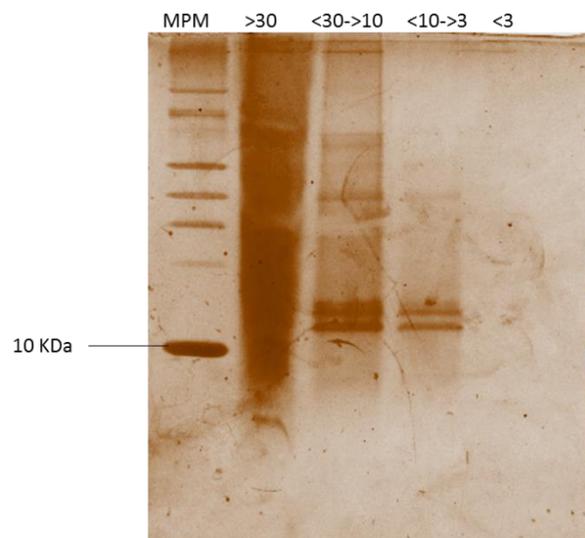


Figura 17. Fracciones del extracto de *S. nigrescens* obtenidas por filtración en cartuchos con membranas de diferente corte (30, 10 y 3 kDa). Carriles marcados por el rango de tamaño en kDa.

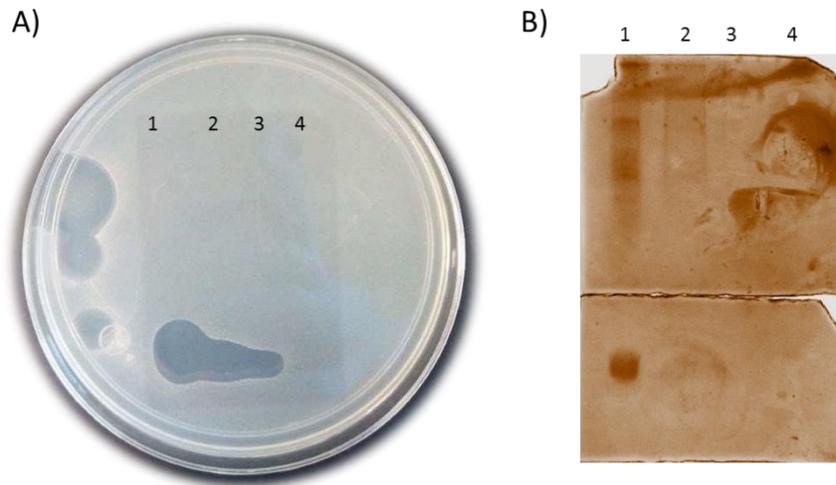


Figura 18. A) Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por filtración en amicons del dializado de *S. nigrescens* en prueba de sobrecapa. **B)** Tinción en plata del mismo gel que mostró actividad. Carriles marcados como 1) >30kDa; 2) <30->10kDa; 3) <10->3 kDa y 4) < 3kDa.

Para determinar cuanta proteína estamos perdiendo en la precipitación se realizó un ensayo de difusión en pozos del sobrenadante, el precipitado y las fracciones producto del tamizado. La mayor actividad se obtuvo del precipitado, seguida por la fracción >30 kDa y la que menos actividad mostró fue la fracción >10 y <3 kDa (Tabla 11), aunque la actividad fue menor es importante remarcar que es la fracción más pura (Figura 17)

Tabla 11. Actividad específica de las fracciones clarificadas y obtenidas por filtración en cartuchos de amicons de la cepa *S. nigrescens*.

Fracción	Act. Esp. (U/mg)
Total	8988 ± 276
>30	5035

30 a 10	3965 ± 268
10 a 3	2281
< 3	-----
Precipitado	11927

Al monitorear las fracciones en geles SDS-PAGE teñidos con plata no se aprecia la banda correspondiente a la actividad (Figura 20A), sin embargo, en el precipitado si esta la banda (Figura 20B).

Para intentar solubilizar una mayor cantidad de proteína se modifico el pH de los extractos por diálisis. Se observó que a valores de pH ácido hay mas precipitado, incluso más que en el control (muestra a pH 6.8). El precipitado comenzó a solubilizarse a pH 8 y no fueron casi detectados a pH 9 y 10 (Figura 19).

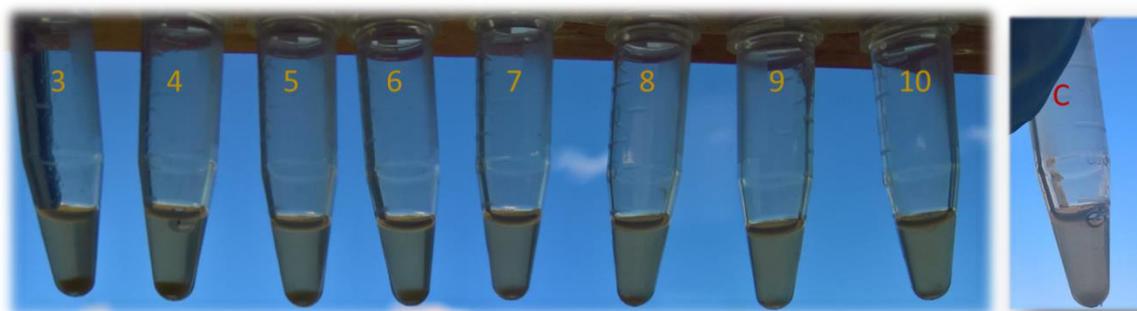


Figura 19. Muestras del extracto producido por *S. nigrescens* tras dos horas de tratamiento a diferentes valores de pH. El pH de cada tratamiento se marca sobre cada una de las muestras; la muestra control sin tratamiento se indica como (C).

En otro esfuerzo por obtener mayor cantidad de proteína soluble y con mayor pureza, se optó por calentar la muestra a 80°C en buffer de fosfatos (pH 6.8) y alcalino (pH 10). En todos los casos se observó la banda de interés (Figura 20A). El

calentamiento no mejoró la pureza ni la solubilización (Figura 20A y B).

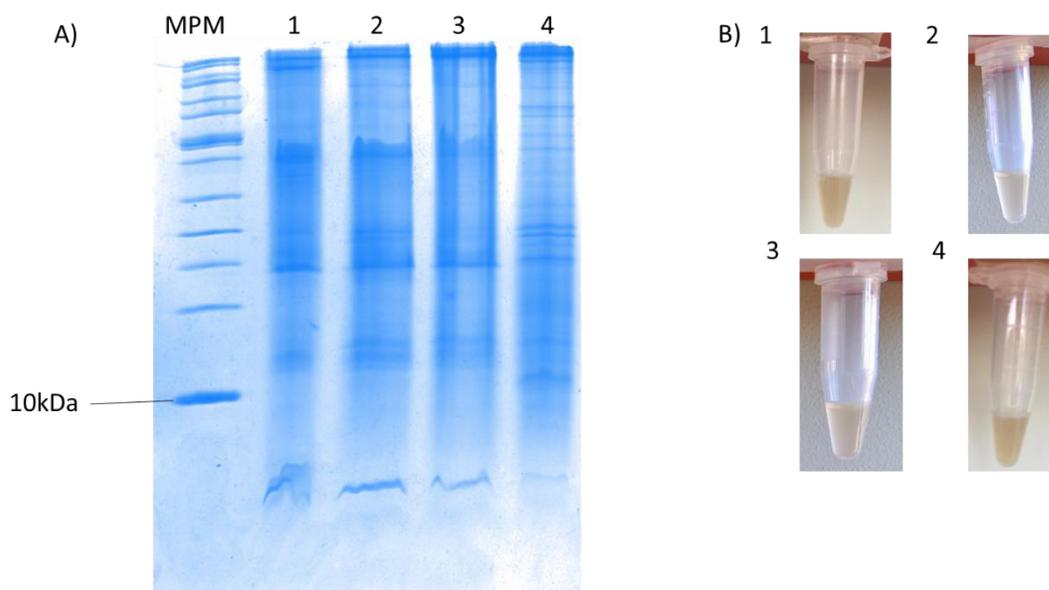


Figura 20. Muestras de la producción de *S. nigrescens* tras diferentes tratamientos para intentar eliminar proteínas de alto peso molecular. **A)** Gel de proteínas SDS-PAGE Tris-Tricina teñido en Coomassie. La flecha roja indica la banda correspondiente a la proteína tipo bacteriocina **B)** Muestras tratadas en los diferentes tratamientos. MPM) marcador de peso molecular; 1) muestra resuspendida y dializada en buffer de fosfatos pH 6.8 100 mM; 2) muestra resuspendida y dializada en buffer de glicina, ácido cítrico y fosfato de sodio a pH 10 100 mM; 3) muestra resuspendida y dializada en buffer de glicina, ácido cítrico y fosfato de sodio a pH 10 100 mM y tratada a 80°C; 4) muestra tratada a 80°C previo a su precipitación y diálisis.

5.12.1 Purificación de la bacteriocina producida por *S. nigrescens*.

Para la purificación de la bacteriocina de *S. nigrescens* se utilizó la columna de exclusión molecular Superdex 30, se obtuvieron 5 picos mayoritarios a lo largo de la corrida (Figura 21), las fracciones 58 a 61 que corresponden al pico con mayor intensidad (Figura 22) mostraron actividad antimicrobiana contra *B. cereus* JCM

2152 (figura 21). Estas muestras fueron concentradas y monitoreadas en gel, aunque debido a la baja concentración no se logró observar.

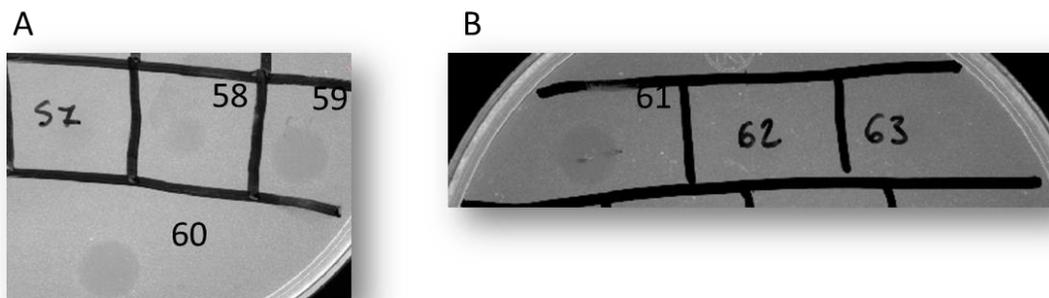


Figura 21. Actividad de las fracciones obtenidas tras paso de la muestra clarificada del extracto crudo de *S. nigrescens* por columna Superdex-30. **A)** Fracciones 58-60; **B)** Fracción 61.

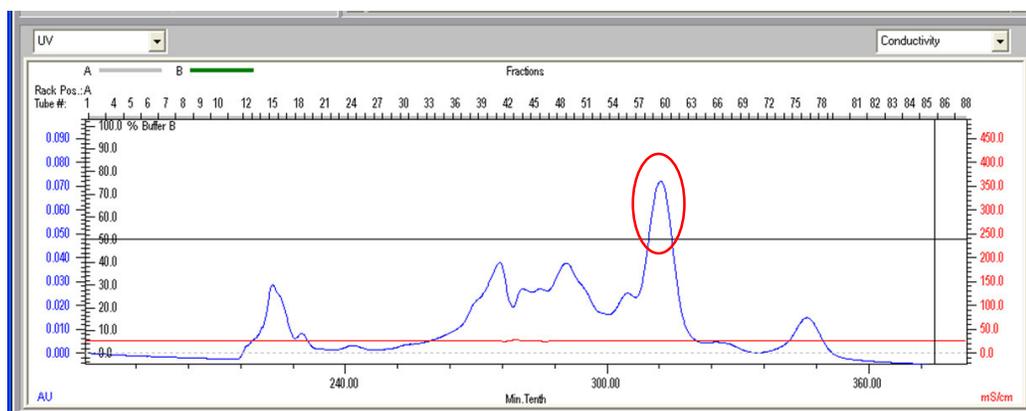


Figura 22. Cromatograma de la corrida de la muestra de clarificada del extracto crudo de *S. nigrescens* por columna Superdex-30. Se señala en rojo el pico correspondiente a las fracciones con actividad antimicrobiana.

Por otro lado, al precipitado que se descartó se le realizaron varios lavados con el buffer pH 10 y se corrió en gel de poliacrilamida, observamos una banda que corresponde en peso a la proteína buscada con una alta pureza (Figura 23).

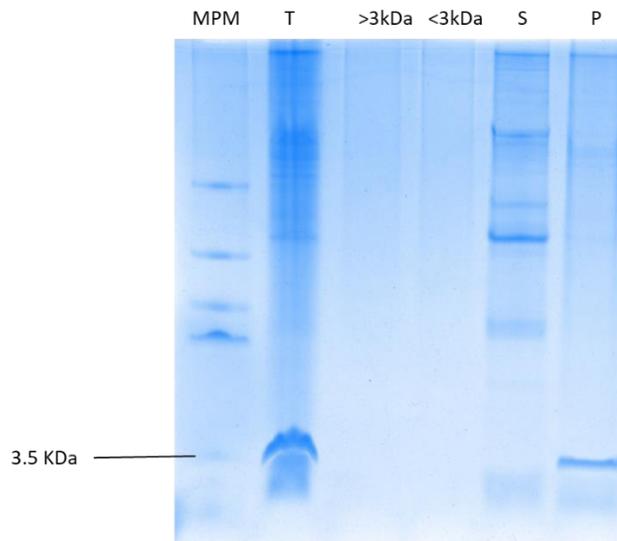


Figura 23. Purificación de la bacteriocina producida por *S. nigrescens*. **MPM)** Marcador de peso molecular; **T)** producción total; **>3KDa)** Fracciones 58-61 concentradas por cartuchos con membrana de 3 kDa; **<3KDa)** Filtrado de las fracciones 58-61 que paso por la membrana de 3 kDa; **S)** Sobrenadante clarificado de la muestra tras la centrifugación antes de paso por columna; **P)** Precipitado obtenido por centrifugación de la muestra total y lavado con buffer pH 10.

5.13 Electroforesis en gel bidimensional (2-D).

Con el fin de determinar si la banda observada en la Figura 23 correspondía sólo a un péptido, se realizó un gel bidimensional. Como se puede apreciar en la Figura 24 la limpieza de la bacteriocina fue tal que solamente dos puntos fueron visibles, uno de gran concentración cerca del pH 9 y otro de mucho menos intensidad a pH más neutro. Que existan dos puntos podría o bien sugerir una naturaleza compleja de la bacteriocina, en otras palabras, que necesite dos fracciones proteicas para tener actividad o incrementarla, casos similares se han observado en la lactococcina G, plantaricinas EF y JK, Lactacin F (Oppegård *et al.*, 2007; Ekblad *et al.*, 2016;

Allison *et al.*, 1995). Otra alternativa es que puede ser una proteína que no se eliminó en los lavados anteriores.

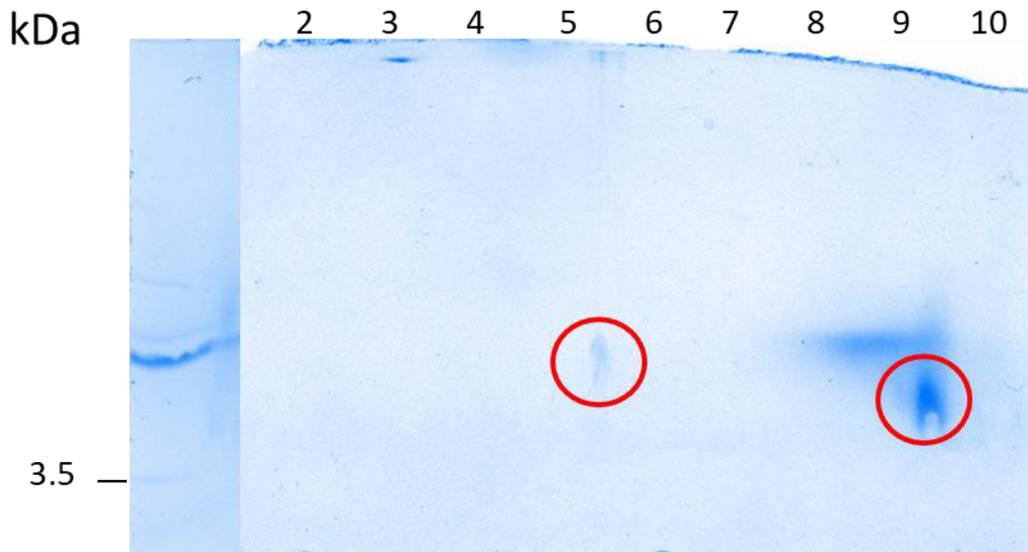


Figura 24. 2D SDS-PAGE del extracto purificado de *S. nigrescens*. En el extremo izquierdo está el marcador de peso molecular. La tira de pH que se utilizó va de 2 a 10. En círculos rojos los dos *spots* separados de la muestra purificada.

5.14 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la bacteriocina de *S. nigrescens* contra bacterias patógenas.

Se buscó la CMI de la bacteriocina de *S. nigrescens* contra cuatro cepas patógenas, de estas solo *B. cereus* 2512 y *V. parahemoliticus* fueron inhibidas totalmente con una concentración de 2.1 $\mu\text{g/mL}$ en el medio de cultivo (Figura 25A y_D) por lo que se puede considerar esta concentración como la mínima inhibitoria para estas bacterias, mientras que las otras concentraciones (1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$) si bien

disminuyeron el crecimiento en las primeras horas, este se recuperó al acercarse a la fase estacionaria (Figura 25B y C).

Los cultivos de *M. luteus* y *S. canis* fueron los menos afectados, aún con la más alta concentración de bacteriocina hubo crecimiento (Figura 25B y C). *S. canis*, mostró durante una disminución del crecimiento en las primeras siete horas de incubación, no obstante a partir de las ocho horas el crecimiento poblacional alcanzó prácticamente los mismos niveles que los cultivos tratados con concentraciones menores y el mismo control sin tratar (Figura 25B). Esto sugiere que si bien existe efecto antibacteriano, la concentración de bacteriocina no es suficiente para alcanzar la CMI. Cabe señalar que estas dos últimas cepas fueron las que mostraron menos rango de inhibición cuando se probaron en ensayos de pozos, lo que explicaría su mayor resistencia también al probarse en medio líquido.

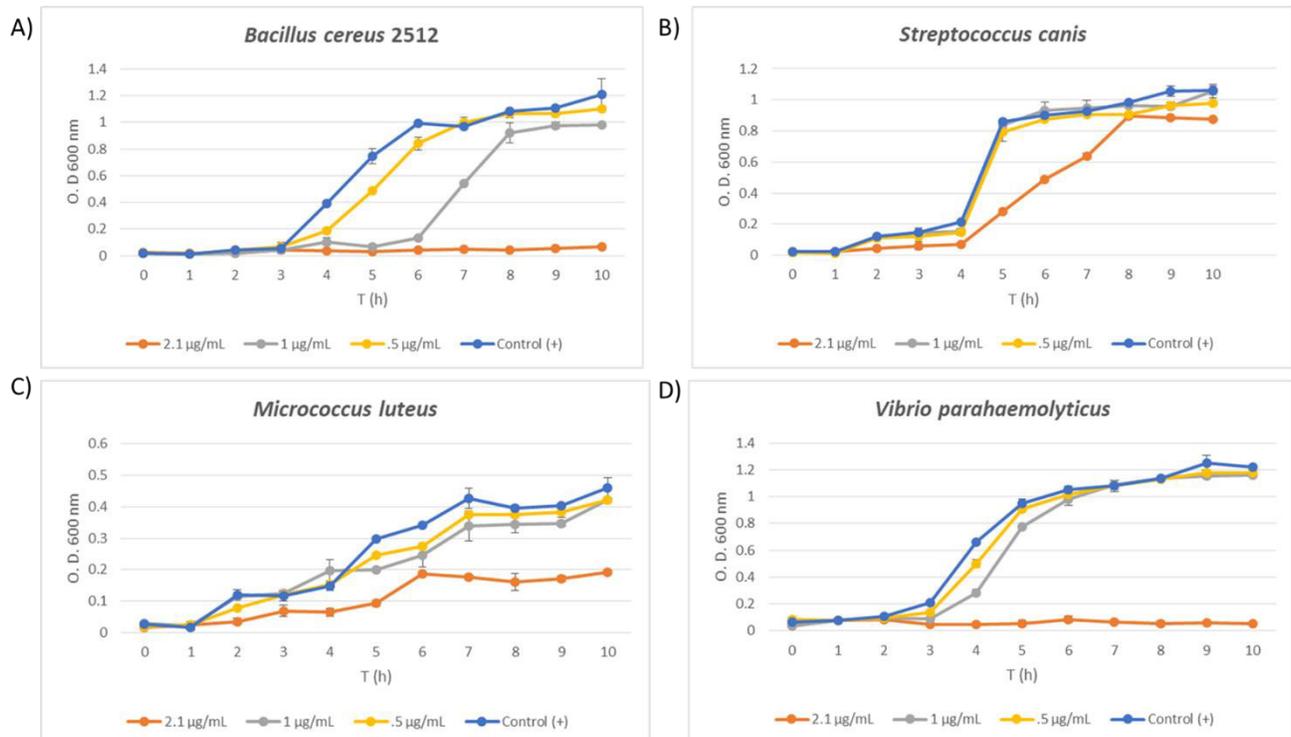


Figura 25. Curvas de crecimiento bacteriano para medir el efecto de la bacteriocina de *S. nigrescens* a diferentes concentraciones contra *B. cereus* 2512, *S. canis*, *M. luteus* y *V. parahaemolyticus*.

5.15 Identificación de los genes codificantes de las probables bacteriocinas

Tras el análisis del genoma de *S. griseus* en el programa bioinformático BAGEL 4.0 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) y por reportes en artículos (Cleasen y Bibb, 2011) se diseñaron oligonucleótidos para su amplificación. Para la cepa de *S. griseus* se identificaron clusteres para cipemicina, griseopeptina y griseomicina. También se analizó el genoma de *S. avermitilis* en el mismo programa y se encontró un clúster reportado para la bacteriocina averminopectina y los genes involucrados en su síntesis (transportador tipo ABC, regulador transcripcional, gen estructural y una cinasa tipo Ser/Thr) (Völler *et al.* 2012) con esta información se buscaron genes ortólogos en el genoma de *S. bottropensis*. Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de todo el clúster de ambas cepas (Figura 26).

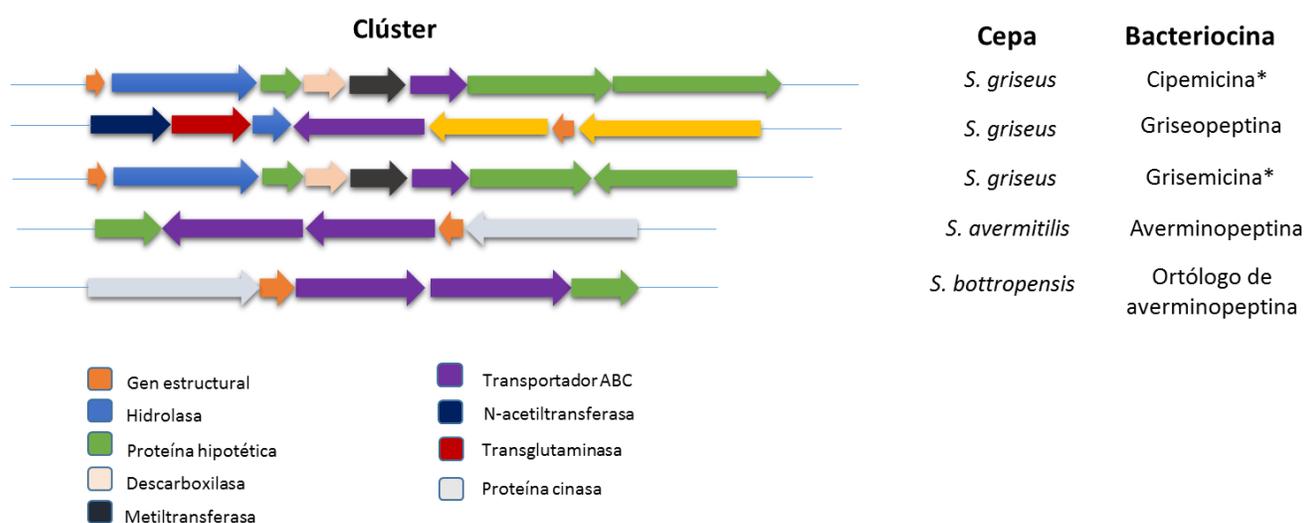


Figura 26. Clústeres identificados en genomas de diferentes cepas de *Streptomyces*. *Clústeres de grisemicina y cipemicina reportados por Cleasen y Bibb, 2011.

5.16 Genes presentes en operones de bacteriocinas en *Streptomyces griseus*.

Con el par de oligonucleótidos correspondientes al gen estructural de cipemicina no logramos obtener amplificación, sin embargo, los oligonucleótidos específicos para grisemicina si nos amplificaron algunas bandas del tamaño esperado de aproximadamente 900 pb como se ha reportado por Cleasen y Bibb en 2011, sin embargo, hubo amplificaciones inespecíficas (Figura 27), esto pudo haberse debido al alto contenido en GC del genoma de esta cepa. Para tratar de obtener una banda más específica se optó por realizar un gradiente de temperatura de alineamiento de 58 hasta 68°C. Se obtuvo así una banda más definida que corresponde al tamaño esperado a 68°C (Figura 29). Sin embargo, esta amplificación no corresponde sólo al del gen estructural, incluye también 380 pb río arriba (parte del gen de hidrolasa) y 393 pb río abajo (secuencia que no forma parte del clúster).

Se buscó amplificar solamente el gen estructural con un tamaño de aproximadamente 200 pb, la amplificación fue exitosa utilizando los oligonucleótidos BGremestF y BGremestR, tras adicionar a la mezcla de reacción DMSO (0.3%) (Figura 30); con un tercer par de oligonucleótidos se busco amplificar el gen de griseopeptina (Völler *et al.*, 2012). Sin embargo, no fue posible amplificar dicho gen (Figura 31).

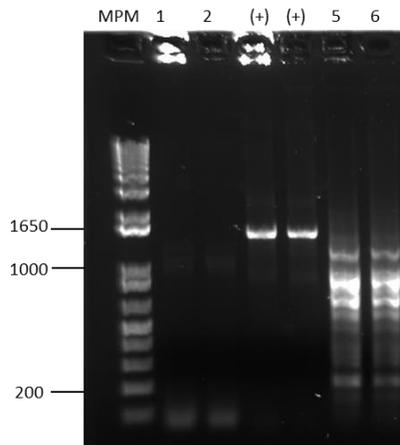


Figura 27. Amplificación de los genes de probables bacteriocinas en *S. griseus*. Carril MPM, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen); Carriles 1 y 2, gen estructural de Cipemicina; Carriles 5 y 6, gen estructural de Grisemicina; Carriles (+), amplificación del gen 16S rDNA como control positivo.

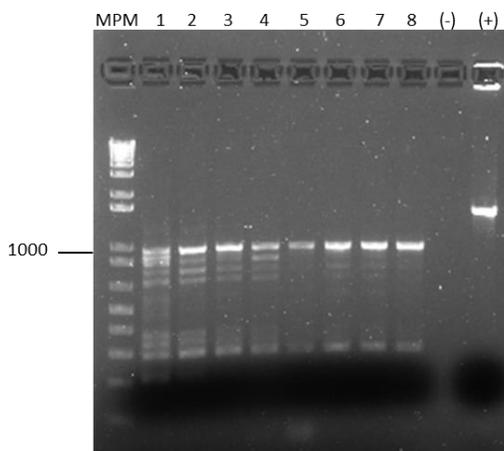


Figura 29. Productos de PCR utilizando un gradiente de temperaturas de alineamiento para la amplificación del gen estructural de Grisemicina reportado por Cleasen y Bibb, 2010. MPM, marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen®); Carril 1, temperatura de alineamiento de 58°C; Carril 2, temperatura de alineamiento de 59°C; Carril 3, temperatura de alineamiento de 60.3°C; Carril 4, temperatura de alineamiento de 62°; Carril 5, temperatura de alineamiento 64°C; Carril 6, temperatura de alineamiento 66.1°C; Carril 7, temperatura de alineamiento de 67.3°C; Carril 8, temperatura de alineamiento de 68°C; Carril (-), como control negativo; Carril (+), amplificación de 16S rDNA como control positivo.

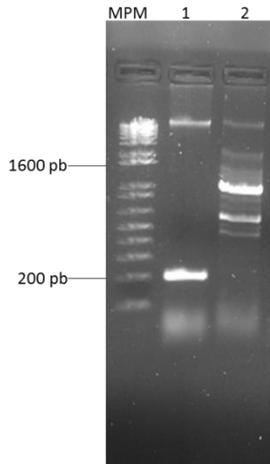


Figura 30. Amplificación del gen estructural y clúster completo de *S. griseus*. Para la amplificación se utilizó DMSO a la mezcla de reacción. Carril 1, amplificación del gen estructural de grisemicina; Carril 2, amplificaciones inespecíficas obtenidas al intentar amplificar el clúster completo de grisemicina.

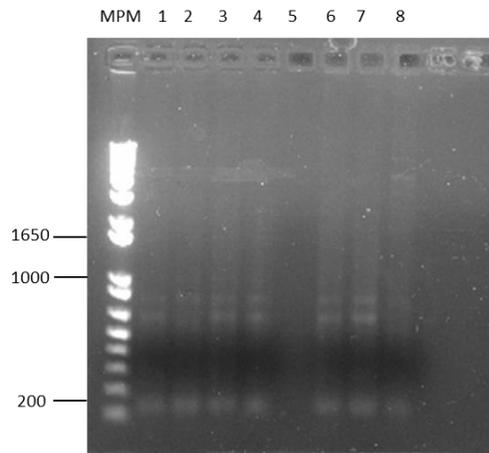


Figura 31. Productos de PCR utilizando un gradiente de temperaturas de alineamiento para la amplificación del clúster de Griseopeptina. MPM, marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); Carril 1, temperatura de alineamiento de 58°C; Carril 2, temperatura de alineamiento de 59°C; Carril 3, temperatura de alineamiento de 60.3°C; Carril 4, temperatura de alineamiento de 62°; Carril 5, temperatura de alineamiento 64°C; Carril 6, temperatura de alineamiento 66.1°C; Carril 7, temperatura de alineamiento de 67.3°C; Carril 8, temperatura de alineamiento de 68°C.

5.16.1 Prueba de antagonismo de grisemicina contra *Escherichia coli* TOP10 y *E. coli* BL21 Rosetta 2.

Se comprobó que no existe actividad antagonica por parte de *S. griseus* contra *E. coli* Top 10 ni *E. coli* BL21 Rosetta 2, esto tras probar tanto el sobrenadante obtenido del cultivo de *S. griseus* libre de células y como la bacteriocina concentrada parcialmente purificada por precipitación de sulfato de amonio (Figura 32). El propósito de esta prueba fue ver el efecto de la bacteriocina de *S. griseus* contra *E. coli*, es importante dado que nuestro propósito es utilizar esta última para expresión heteróloga. Los resultados nos indican que podemos realizar las pruebas de inducción de grisemicina en las cepas de *E. coli* sin que la bacteriocina expresada dañe a la cepa productora. Dichos resultados pueden ser corroborados en la Figura 32.



Figura 32. Prueba de antagonismo por ensayo de pozos de *S. griseus* contra las bacterias competentes **A)** *E. coli* TOP 10 y **B)** *E. coli* BL21 Rosetta 2. S, sobrenadante libre de células; B, bacteriocina parcialmente purificada por precipitación de sulfato de amonio; (+) Gentamicina (20 mg/mL) como control positivo; (-) Buffer pH 10 como control negativo.

5.17 Amplificación de partes del clúster de Grisemicina.

Con el fin de asegurar que la secuencia amplificada del clúster de grisemicina contuviera los genes reportados en la literatura (Cleasen y bibb, 2011), se diseñaron oligonucleótidos específicos con los que se amplificaron partes de diferentes

tamaños de este mismo. Con los oligonucleótidos Grm A-H se amplificó el gen estructural y el gen de una probable hidrolasa, con un tamaño final de 2,069 pb, con los oligonucleótidos Grm A-M se obtuvieron genes codificantes para el gen estructural, una probable hidrolasa, una proteína hipotética, una descarboxilasa y una metil-transferasa, todo con un total de 3,965 pb. Finalmente, el juego de oligonucleótidos Grm A-T nos permitieron amplificar todos los genes codificantes anteriores más un transportador ABC sumando un total de 4,549 pb (Figura 33). Siendo esta última amplificación la que se ligó en vector pCold I para su posterior expresión.

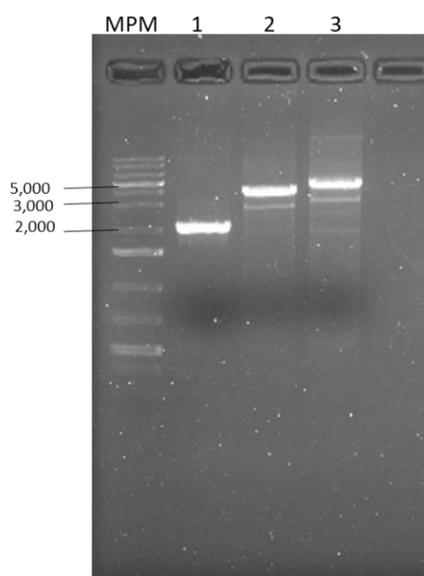


Figura 33. Amplificación de los genes constituyentes del clúster de grisemicina. MPM, marcador de peso molecular; 1, amplificación con el juego de oligos GrmA-H de 2,069 pb; 2, amplificación con el juego de oligos GrmA-M de 3,965 pb; 3, amplificación con el juego de oligos GrmA-T de 4,549 pb.

La construcción realizada contiene el gen estructural (a partir del ATG), probable hidrolasa, una proteína hipotética, una descarboxilasa, una metil-transferasa y un transportador de tipo ABC, todos estos elementos en el vector

pCold I. Para confirmar que el gen estructural quedó delante del promotor de choque frío se realizó una digestión con la enzima *EcoRV*. Se encontró el patrón de bandas esperado, una banda de 1765 pb y otra de 7197pb (Figura 34A), además se realizó una corroboración por PCR usando el oligo pColdFw y AHFw para amplificar un fragmento del clúster de 2,069 pb, como se observa en la Figura 34B (se usó el oligonucleótido directo puesto que el diseño de oligos se realizó en base a la cadena complementaria).

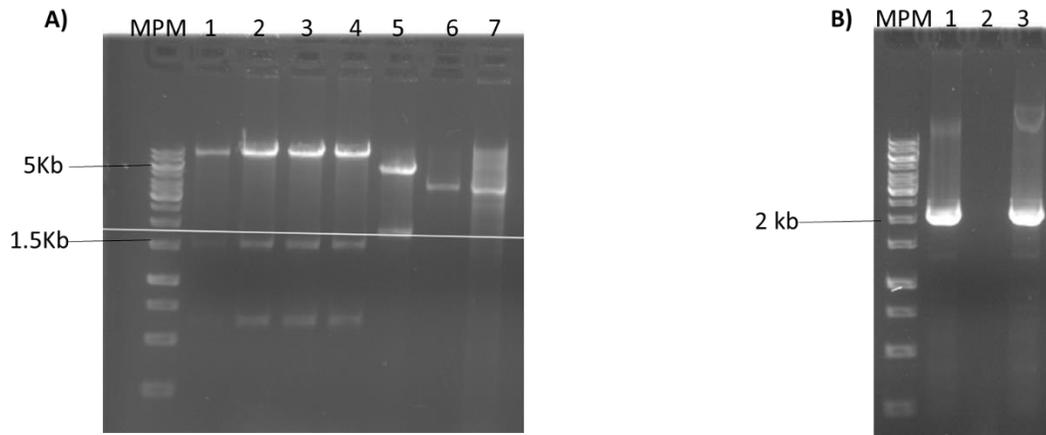


Figura 34. A) Cepa mostrando el patrón de bandeo esperado en el carril 5; carriles 1, 2, 3, 4, 6 y 7 corresponden a otras cepas transformadas que tras la digestión con la enzima *EcoRV* mostraron patrones de bandeo diferentes y fueron descartadas B) Comprobación de sentido del inserto; MPM, marcador de peso molecular; Carril 1, amplificación del fragmento A-H en DNA de la cepa *S. griseus*; Carril 2, control negativo; Amplificación del fragmento A-H en DNA de la cepa transformada.

5.18 Secuenciación del inserto clonado en pCold I.

Al secuenciar la construcción con los oligonucleótidos pColdFw, ATRv y AHRv se determinó la presencia del gen estructural, el gen codificante de la hidrolasa y el gen de la proteína hipotética (Figura 35). Cabe mencionar que al utilizar las combinaciones de oligonucleótidos AHFw-AMRv y pColdRv-GrmDFw no se obtuvo amplificación ni resultado al secuenciar, lo que podría sugerir la pérdida de estos dos genes (D y M) dentro del inserto y cuya suma de ambos genes (1,299 pb) correspondería a la pérdida del tamaño encontrado en la amplificación, en relación al peso esperado

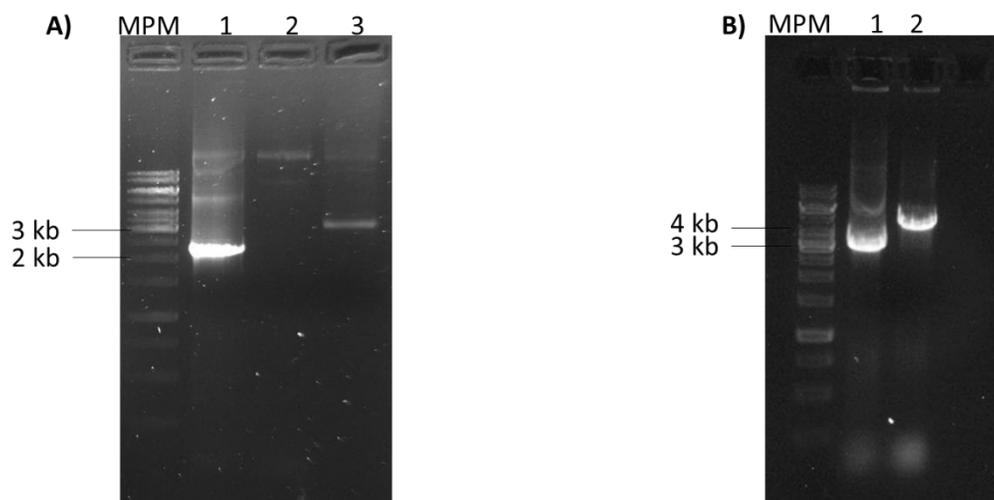


Figura 35. A) Amplificaciones de los diferentes fragmentos del clúster en la cepa transformada; MPM, marcador de peso molecular; Carril 1, amplificación del fragmento A-H (peso esperado de 2,069 pb); Carril 2, amplificación del fragmento A-M peso esperado de 3,965 pb); Carril 3, amplificación del fragmento A-T (peso esperado de 4,549 pb). B) Comparación de la amplificación más grande A-T; Carril 1, amplificación A-T obtenida en DNA de la cepa transformada, mostrando un peso menor al esperado de aproximadamente 3,500 pb; Carril2, amplificación A-T obtenida en DNA de la cepa *S. griseus* en el peso esperado.

Aun así se secuenció usando los tres oligos correspondientes a los tres fragmentos del clúster (A-H, A-M y A-T) y los oligo pColdFw y pColdRv. Se encontró que el inserto tenía el gen estructural y los correspondientes a la hidrolasa, una proteína hipotética y la descarboxilasa pero no el de la metil-transferasa y solamente la parte final del gen del transportador ABC (Figura 37). La organización total de clúster y el trabajo realizado sobre él, así como las partes secuenciadas se ilustran en la Figura 37.

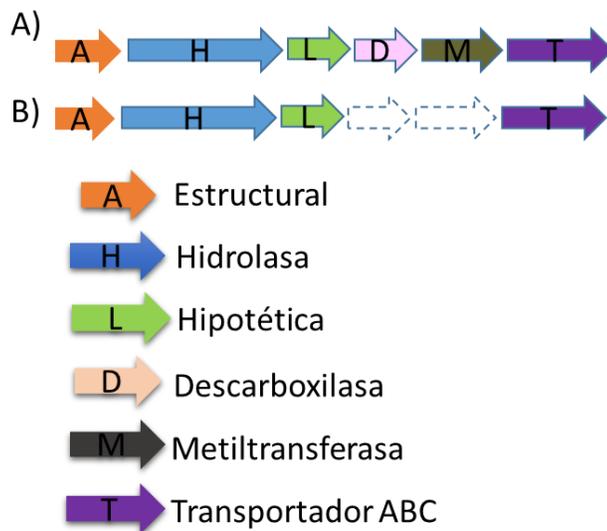


Figura 37. Genes pertenecientes al clúster de Grisemicina en *S. griseus*. **A)** Genes totales presentes en el clúster. **B)** Genes secuenciados en este trabajo. Se muestra en líneas punteadas los genes ausentes.

5.19 Actividad de la grisemicina recombinante.

Se realizó una inducción de *E. coli* transformada con la construcción pColdI-Grm A-T con el propósito de obtener la grisemicina recombinante. La clonación se efectuó a partir del codón de inicio del gen estructural el cual contiene un péptido

señal para la secreción de éste. Por este motivo se analizaron tanto los botones celulares como el sobrenadante libre de células, esto nos permitió determinar si el péptido fue secretado o no. Se tomaron muestras inducida y no inducida (botones celulares) de la cepa transformada con la construcción y con el vector vacío como control. También se tomó el sobrenadante y se concentró con sulfato de amonio. Se detectó actividad en sobrecapa de la cepa transformada con el clúster tanto en la fracción inducida como en la no inducida provenientes de botón celular (Figura 38), obtener actividad en la fracción no inducida se puede asociar a que el promotor de pColdI *cspA* es un promotor constitutivo (Fang *et al.*, 1999). Las muestras obtenidas con el vector pColdI vacío no tuvieron actividad y la precipitación del sobrenadante tampoco tuvo actividad (Figura 38).

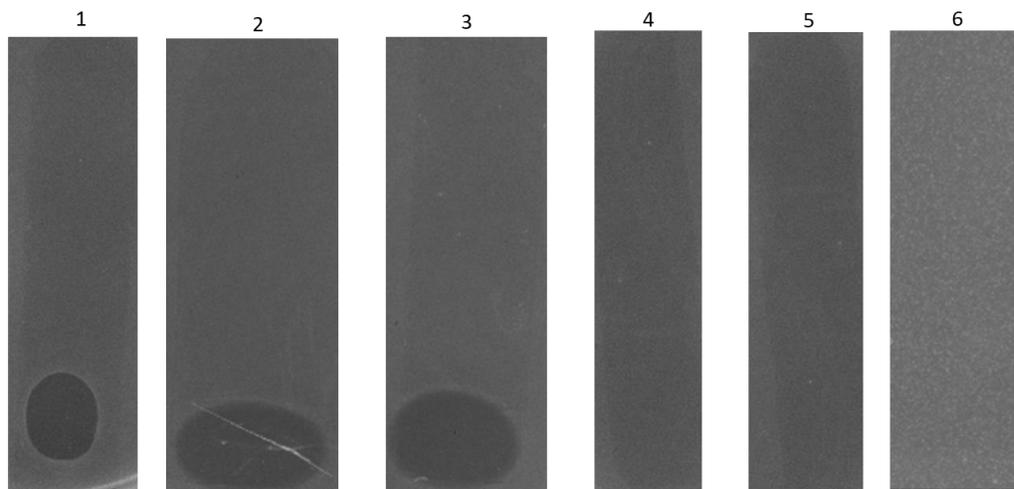


Figura 38. Actividad en sobrecapa. 1, producción de *S. nigrescens* como control positivo; 2, botón de la transformante inducida; 3, botón de la transformante no inducida; 4, botón de la cepa transformada con el vector pColdI vacío inducida; 5, botón de la cepa transformada con el vector pCold I vacío no inducida; 6, precipitado con sulfato de amonio, resuspendido y dializado en buffer de fosfatos pH 6.8 10 mM.

El gel SDS-PAGE Tris-tricina se tiñó en Coomasie y como se ve en la Figura 39, el patrón de bandeo se observó más definido en las cepas transformadas con la construcción pCold-Grm A-T que en los carriles donde se corrieron las muestras de las cepas transformadas con el vector pCold vacío, incluso se pudieron ver unas bandas que bien podrían corresponder con la actividad en sobrecapa que se mostró anteriormente (Figura 38), pues su peso oscila alrededor de los 2 kDa, que también es el peso reportado de la grisemicina (Cleasen y Bibb, 2011), otro aspecto notorio es que la intensidad de la banda es mayor en el carril de la muestra inducida.

El bandeo de la muestra del precipitado con sulfato de amonio es muy tenue y como se pudo ver en la Figura 38, ninguna actividad antimicrobiana pudo ser detectada en sobrecapa.

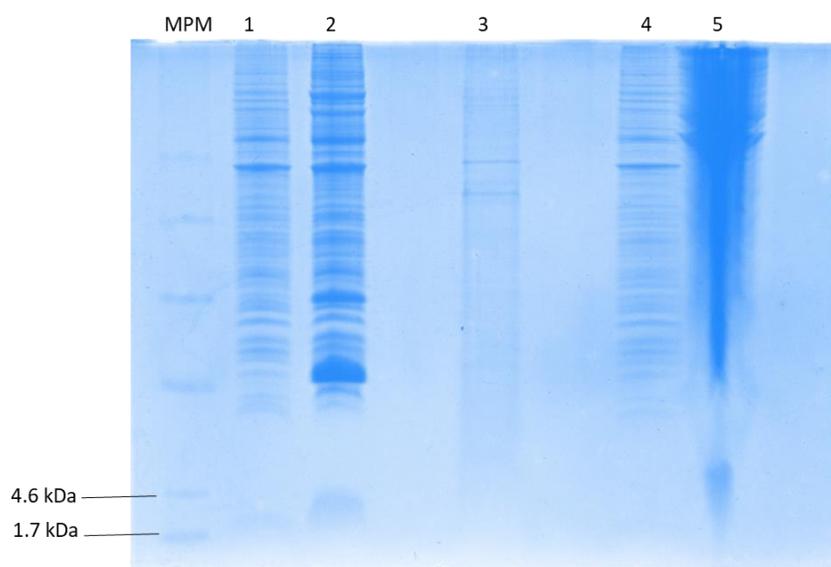


Figura 40. Gel SDS-PAGE Tris-Tricina teñido en Coomasie. MPM, marcador de peso molecular; Carril 1, muestra no inducida de la cepa transformante; Carril 2, muestra inducida de la cepa transformante; Carril 3, producto semipurificado por precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante del cultivo de la cepa transformada inducida; Carril 4, muestra no inducida de la cepa

transformada con pCold I vacío; Carril 5, muestra inducida de la cepa transformada con pCold I vacío.

5.20 Comprobar la expresión del gen de grisemicina en BL21-Rosetta 2.

5.20.1 Extracción de RNA.

RNA de buena calidad fue obtenido de las células inducidas transformadas con nuestro clúster y de la cepa transformada con el vector pCold I vacío (Figura 41), sin embargo, el RNA extraído de las células no inducidas fue muy poco. No obstante, se utilizó la misma cantidad de RNA de todas las muestras.

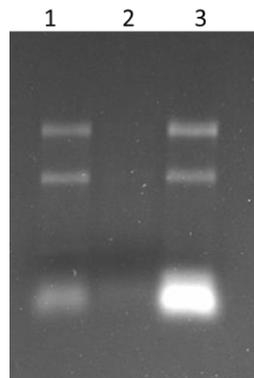


Figura 41. Extracción de RNA. Carril 1, RNA extraído de la cepa transformada con el vector pCold I vacío; Carril 2, RNA extraído de la cepa no inducida transformada con la construcción; Carril 3, RNA extraído de la cepa transformada inducida con la construcción.

5.20.2 Amplificación del gen de grisemicina a partir del cDNA.

Se logró amplificar el gen de la grisemicina en la cepa transformada tanto inducida y no inducida, y se usaron como controles positivos las amplificaciones que se obtienen usando como DNA molde el DNA extraído directamente de *S. griseus*

y la cepa transformada con el vector pColdI conteniendo el fragmento del clúster A-T. La Figura 42 nos muestra que estas amplificaciones corresponden en peso a los controles positivos, por tanto podemos inferir que el gen de grisemicina (Grm A) está siendo expresado.

Otro detalle que podemos observar en la Figura 42 es la intensidad de las bandas; en los controles positivos la intensidad es mayor, pues la concentración de DNA que sirve de molde es mayor, en el caso de las cepas transformantes inducida y no inducida la intensidad de la banda es menor pero de buena calidad y aun así es detectable una mayor intensidad en la transformante inducida.

Los controles negativos por su parte también mostraron amplificación, si bien es algo desafortunado, la intensidad de banda es mucho menor en comparación de los controles y de las transformantes, pudiendo ser que se deba una contaminación y al ser de un bajo peso molecular, facilite la amplificación de dicha banda.

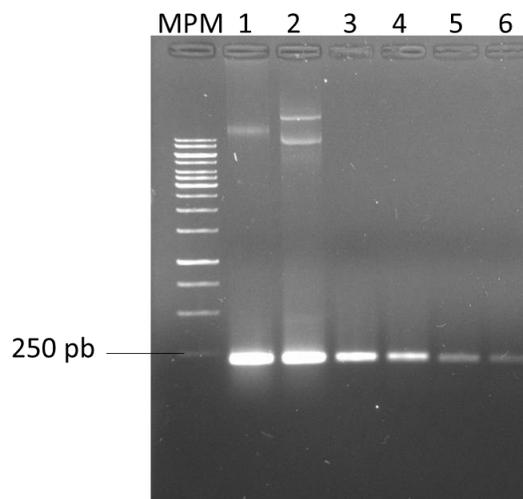


Figura 42. Amplificación del gen de grisemicina a partir de cDNA. MPM, marcador de peso molecular; Carril 1, amplificación del gen usando DNA de la cepa *S. griseus*; Carril 2, amplificación del gen usando DNA plasmídico extraído de la cepa transformada; Carril 3, amplificación del gen

usando cDNA de la cepa transformada inducida; Carril 4, amplificación del gen usando cDNA de la cepa transformada no inducida; Carril 5, amplificación del gen usando cDNA de la cepa transformada con el vector pCold I vacío; Carril 6, amplificación del gen usando agua como control negativo.

5.20.2.1 Expresión de un gen constitutivo como control.

La amplificación del gen 16s rDNA fue observable en todas las cepas, sin embargo y a pesar de que la intensidad es igual en todos los casos, dicha amplificación se observa muy tenue (Figura 43).

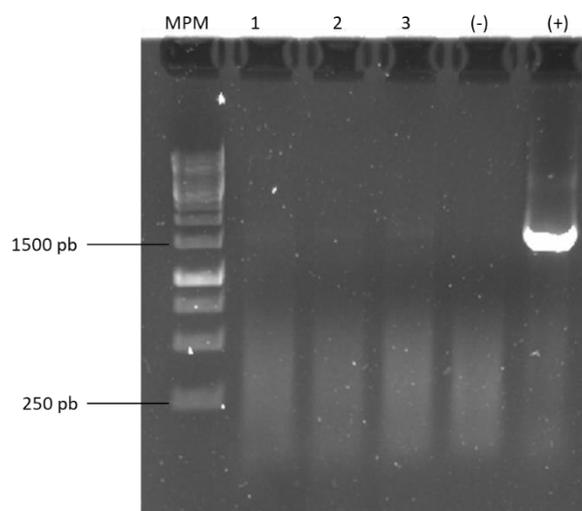


Figura 43. Amplificación del gen constitutivo 16S rDNA a partir de cDNA. **MPM)** marcador de peso molecular; **1)** cepa transformada con el vector pCold vacío; **2)** cepa transformada con la construcción pCold-GrisA-T e inducida; **3)** cepa transformada con la construcción pCold GrisA-T no inducida; **(-)** reacción con agua en lugar de DNA como control negativo; **(+)**, amplificación del gen 16S a partir de DNA total de cepa de *Lactococcus lactis* como control positivo.

5.21 Amplificación y secuenciación del gen estructural de Bottromicina en *S. bottropensis*.

El gen fue amplificado exitosamente en *S. bottropensis* como era esperado, pero no así en las demás cepas (Figura 44). Cuando se secuenció directamente de producto de PCR purificado se obtuvo un 95% de identidad pero solo un 78% de cobertura en relación a un fragmento del clúster de la bacteriocina; si bien esta es una identidad relativamente alta, la cobertura abre la duda respecto a si pudiese tratarse de una variación de la Bottromicina A, como la reportada por Hou *et al.*, 2012. Sin embargo, al intentar corroborar esta teoría con una secuenciación directa con oligonucleótidos M13 correspondientes a una parte del vector TOPO 2.1 que contenía nuestro inserto no se obtuvieron resultados que pudiera dar una similitud en BLAST. Estos resultados señalan la producción ya sea de bottromicina o una variante de ella, pero son necesarios más estudios para corroborarlo.

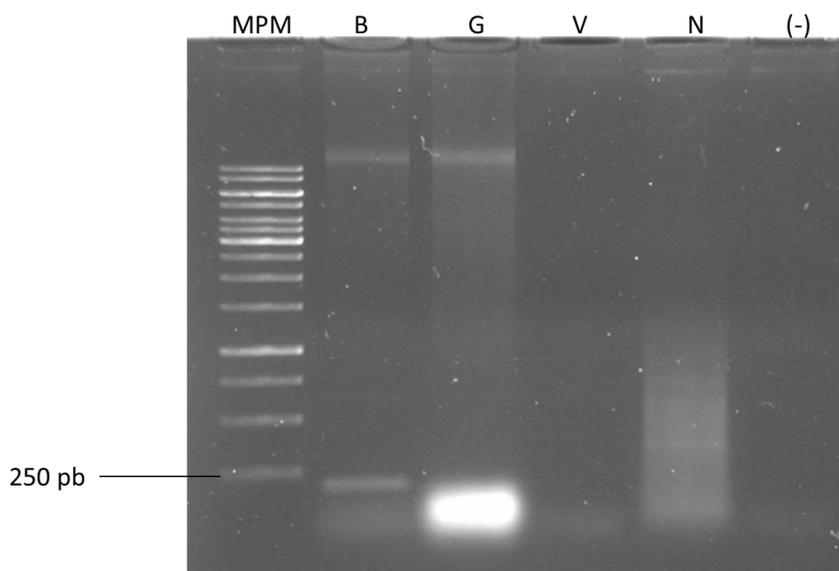


Figura 44. Amplificación del gen estructural de Bottromicina en diferentes cepas del género *Streptomyces*. **MPM)** Marcador de peso molecular; **B)** *S. bottropensis*; **G)** *S. griseus*; **V)** *S. violaceoruber*; **N)** *S. nigrescens*; **(-)** Reacción con agua como control negativo.

6. CONCLUSIONES:

S. bottropensis, *S. griseus*, *S. violaceoruber* y *S. nigrescens* producen bacteriocinas sensibles al tratamiento enzimático que son activas contra bacterias patógenas de interés humano, tales como *M. luteus*, *B. wiedmannii*, *E. casseliflavus*, *B. cereus* y *Vibrio parahaemolyticus*, estas bacteriocinas son además termoestables y funcionales en un amplio rango de pH, lo que sugiere que de obtenerse a partir de un sistema heterólogo seguro para el ser humano (una bacteria generalmente reconocida como segura o GRAS) tendrían utilidad práctica en la industria alimentaria.

Se demostró que usar un medio rico en nutrientes para el cultivo de estas cepas del género *Streptomyces* propicia una mayor producción de bacteriocinas en la fase estacionaria, mientras que una temperatura de 37°C incrementa la densidad poblacional.

La producción de una bacteriocina activa es posible en el sistema recombinante *E. coli*::BL21R2::pColdI con el constructo A-T (GrmA, GrmH, GrmL y GrmT), sin embargo existe la posibilidad de que la actividad antimicrobiana observada en el extracto de *S. griseus* se deba a más de una bacteriocina.

7. LITERATURA CITADA:

Abbas, A. B. and A. H. Lichtman. 2009. Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd edición), Saunders (Elsevier). Pp 175-180.

- Abts, A., A. Mavaro, J. Stindt, P. J. Bakkes, S. Metzger, A. J. M. Driessen, S. H. J. Smits and L. Schmitt. 2011. Easy and Rapid Purification of Highly Active Nisin. *Int. J. Pept.* 2011:2-9.
- Ahmad, M. S., A. O. El-Gendy, R. R. Ahmed, H. M. Hassan, H. M. El-Kabbany and A. G. Merdash. 2017. Exploring the Antimicrobial and Antitumor Potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 Isolated from Egyptian Soil. *Front. Microbiol.* 8:438.
- Allison, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles and T. R. Klaenhammer. 1995. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4):1371–1377.
- Azevedo, C. A., C. B. P. Bento, J. C. Ruiz, M. V. Queiroz and H. C. Mantovani. 2015. Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(20):7290-7304.
- Barboza-Corona, J. E., H. Vázquez-Acosta, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernández. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol.* 187(2):117-126.
- Barlow, P. G., Y. Li, T. S. Wilkinson, D. M. E. Bowdish, Y. E. Lau, C. Cosseau, C. Haslett, A. J. Simpson, R. E. W. Hancock and D. J. Davidson. 2006. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* 80(3):509–520.
- Anderson Borge, G. I., M. Skeie, T. Sørhaug, T. Langsrud, P.E. Granum. 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* 69(3):237-246.

- Butzby, J. C. and T. Roberts. 1996. ERS Updates U.S foodborne disease cost for seven pathogens, Food Review, USDA. E.R.S. 19(3):20–25.
- Brückner, R., F. Titgemeyer. 2004. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiol. Lett. 209:141-148.
- Brown, K. L. and R. E. Hancock. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Curr. Opin. Immunol. 18:24–30.
- Campos, G., L. Robles, R. Alonso, M. Nuñez and A. Picon. 2011. Microbial dynamics during the ripening of a mixed cow and goat milk cheese manufactured using frozen goat milk curd. J. Dairy Sci. 94(10):4766-4776.
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. 2012. Estreptomicina. Consultado el 12/08/15. Disponible en: <http://www.pediamécum.es>.
- Cortes, J., S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt and P. F. Leadlay. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature, 348:176–178.
- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3:777–788.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. Chem. Rev. 105:633–684
- Claesen, J. and M. Bibb. 2010. Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107(37):16297-16302.

- Claesen, J. and M. Bibb. 2011. Biosynthesis and Regulation of Grisemycin, a New Member of the Linaridin Family of Ribosomally Synthesized Peptides Produced by *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol. Res.* 193(10):2510–2516.
- De Leo, F., Volpicella, M., Sciancalepore, M., Gallerani, R., & Ceci, L. R. 2006. One of the three proteinase inhibitor genes newly identified in the *Brassica napus* genome codes for an inhibitor of glutamyl endopeptidase. *FEBS letters*, 580(3), 948-954.
- Craney, A., S. Ahmed and J. Nodwell. 2013). Towards a new science of secondary metabolism. *J. Antibiot.* 66:387–400.
- Demain, A. L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:455–463.
- Dilip, C. V., S. Mulaje, R. Mohalkar. 2013. A review on actinomycetes and their biotechnological application. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4:1730–1742.
- Dulaney, E. L. and Jacobsen C. A. 1987. Synergy of patulin with other antibiotics. *J. Antibiot.* 8: 1211-1212.
- Duncan, G.G., C. F. Clancy, J. R. Wolgamot and B. Beidleman. 1951. Neomycin: results of clinical use in ten cases. *JAMA.* 145(2):75-80.
- Eijsink, V. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81:639-654.
- Ekblad, B., P. K. Kyriakou, C. Oppegård, J. Nissen-Meyer, Y. N. Kaznessis and P. E. Kristiansen. 2016. Structure-Function Analysis of the Two-Peptide Bacteriocin Plantaricin EF. *Biochemistry.* 55(36):5106-5116

- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Scientific Opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. EFSA J. 7(12): 1412.
- Emerson de Lima Procópio, R., I. Reis da Silva, M. Kassawara Martins, J. Lúcio de Azevedo and J. Magali de Araújo. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz. J. Infect. Dis. 16(5):466-471.
- Fajardo-García I. 2011. Guía básica sobre seguridad alimentaria. Madrid: Díaz de Santos S. A., pp 9. Recuperado de: <https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479788612.pdf>
- Fang, L., B. Xia, and M. Inouye. 1999. Transcription of *cspA*, the gene for the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is negatively regulated at 37°C by the 5'-untranslated region of its mRNA. FEMS Microbiol. Lett. 176(1):39-43.
- FDA. Federal Register. 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS Status as a Direct Human Food Ingredient. 21 CFR Part 184, Fed. Reg. 53:11247-11251.
- Flärdh, K. and M. J. Buttner. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat. Rev. 7(1): 36-49.
- García, A. Y. 2010. Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*. Tesis Doctoral. Instituto de microbiología bioquímica departamento de microbiología y genética c.s.i.c./Universidad de Salamanca. Recuperado de: <http://digital.csic.es/handle/10261/44882>
- Garsa, A. K., Kumariya R., Sood S. K., Kumar A. and Kapila S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. Probiotics. Antimicrob. Proteins. 6(1):47-58.
- Gautam, N. and N. Sharma. 2015. A study on characterization of new bacteriocin produced from a novel strain of *Lactobacillus spicheri* G2 isolated from Gundruk-

- a fermented vegetable product of North East India. *J. Food Sci. Technol.* 52(9):5808-5816.
- Granum, P. E. and T. Lund. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:223-228.
- Hernández, P. E. 2010. *Nutrición y Bromatología III*. Tesis doctoral Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino and S. Matsukara. 1998. Identification of b-defensins —2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:943-947.
- Holcapkova, P., A. Hurajova, P. Bazant, M. Pummerova and V. Sedlarik. Thermal stability of bacteriocin nisin in polylactide-based films. *Polym. Degrad. Etabil.* 158:31-39
- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. W. Ward and H. Schrempf. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation.
- Hou, Y., M. D. Tianero, J. C., J. C. Kwan, T. P. Wyche, C. R. Michel, G. A. Ellis, E. Vazquez-Rivera, D. R. Braun, W. E. Rose, E. W. Schmidt and T. S. Bugni. 2012. Structure and biosynthesis of the antibiotic bottromycin D. *Org. Lett.* 14(19):5050-5053.
- Igarashi, Y., Y. Kan, K. Fujii, T. Fujita, K. Harada, H. Naoki, H. Tabata, H. Onaka and T. Furumai. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes

- secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J. Antibiot.* 54(12):1045-53.
- Ishibashi, N., K. Himeno, Y. Masuda, Perez R. H., S. Iwatani, T. Zendo, P. Wilaipun, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2014. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(21):6647-6655.
- Islas-Rodríguez, A. E., L. Marcellini, B. Orioni, D. Barra, L. Stella and M. L. Mangoni. 2009. Esculentin 1–21: a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria. *J. Pept. Sci.* 15:607–614.
- Jankovic, I., R. Brückner. 2007. Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. *J. Mol. Microb. Biotech.* 12(1-2):114-120.
- Jenssen, H., P. Hamill, R. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:491-511.
- Jeong, J. H. and S. C. Ha. 2018. Crystal Structure of NisI in a Lipid-Free Form, the Nisin Immunity Protein, from *Lactococcus lactis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 62 (3).
- Jones, E., V. Salin and G. W. Williams. 2005. Nisin and the market for commercial bacteriocins. TAMRC Consumer and Product. Research Report No. CP-01-05.

- Katzung, B. G. 2007. Chloramphenicol, Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, & Streptogramins. *Basic & Clinical Pharmacology* (9 edición). McGraw-Hill. Chapter 44, pp. 1064–1074.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers and J. Kok. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1589-1597.
- Khandan, D. N. and R. J. Gottravalli. 2015. Isolation, Identification and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from Soil Sample of Kodagu, Karnataka State (India). *Jundishapur J. Microbiol.* 8(2):e15107.
- Kitchen, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167–188.
- Kirby, A. J. 2001. The lysozyme mechanism sorted—After 50 years. *Nat. Struct. Mol.* 8:737–739.
- Kirk, S., A. C. Avignone-Rossa and M. E. Bushell. 2000. Growth limiting substrate effects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* (22):1803-1822.
- Kodani, S., E. Michael, M. E. Hudson, M. C. Durrant, M. J. Buttner, J. R. Nodwell and J. M. Willey. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(31):11448 –11453.

- Konings, W. N., O. P. Kuipers and J. H. J. Huis in't Veld. 1999. Lactic acid bacteria: genetics, metabolism, and applications. In Proceedings of the sixth symposium on lactic acid bacteria, genetics, metabolism and applications. Veldhoven, The Netherlands: Federation of European Microbiological Society
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, W. M. De Vos. 1993. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisl genes for development of immunity. Eur. J. Biochem. 216(1):281-91.
- Kleerebezem, M. 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. Peptides. 25:1405-1414.
- Lee, H., J. J. Churey and R. W. Worobo. 2010. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincinH, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF36. Microbiol. Lett. 299:205–213.
- Leon-Galván, M F, N. Carbajal, T. Frickey and L. Santos. 2009. Microbial identification of the Nichupte-Bojorquez coastal lagoon in Cancun, México. Aquat. Ecol. 43:197-205.
- Leroy F, De Vuyst L. 2001. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67(10):4407-13.

- Lescano, G. M., R. S. Pettigrosso and Llabot J. M. 2014. Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales. R. M. C. F. 45(2):31-36.
- Li, L., I. Vorobyov and T. W. Allen. 2013. The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. J. Phys. Chem. A. 117:11906–11920
- MedlinePlus. 2010. Eritromicina. Consultado el 12/08/15. Recuperado de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682381-es.html>
- MedlinePlus. 2012. Kanamicina. Consultado el 12/08/15. Recuperado de: <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Kanamicina.pdf>
- Miller, R. A., S. M. Beno, D. J. Kent, L. M. Carroll, N. H. Martin, K. J. Boor and J. Kovac. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(11):4744–4753.
- Mukhtar, S., A. Zaheer, D. Aiysha, K. A. Malik and S. Mehnaz. 2017. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. J Proteomics Bioinform. 10(12): 316-319.
- Müller, A., W. Hinrichs, W. M. Wolf and W. Saenger. 1994. Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution. J. Biol. Chem. 269(37):23108–11.

- Minami, Y., K. Yoshida, R. Azuma, A. Urakawa, T. Kawauchi, T. Otani, K. Komiyama, S. Ōmura. 1994. Structure of cypemycin, a new peptide antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 35:8001–8004.
- Mortz, E., T. N. Krogh, H. Vorum and A. Görg. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.* 1(11):1359-1363.
- Murphy, C. J., B. A. Foster, M. J. Mannis, M. E. Selsted, T. W. 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblast, *J. Cell. Physiol.* 155:408-413.
- Noguera, A., J. Massó, D. Soy, C. Codina and J. Ribas. 2002. Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. *Farmacia Hospitalaria.* 26(2):96-105.
- Nostro A., R. Scaffaro, G. Ginestra, M. D'Arrigo, L. Botta, A. Marino, G. Bisignano. 2010. Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:729-737
- O'Grady, J.G., A. Burroughs, P. Hardy, D. Elbourne, A. Truesdale and The UK and Ireland Liver Transplant Study Group. 2002. Tacrolimus versus emulsified cyclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet.* 360:1119–1125.
- Widayati, O., Z. Bachruddin, C. Hanim, L. M. Yusiati and N. Umam. 2018. Bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from rumen fluid of thin tail sheep. *Bul. Peternak.* 43(3): 158-165.
- Ōmura, S., H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, M. Hattori. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism

- Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98(21):12215–12220.
- Onaka, H, M. Nakaho, K. Hayashi, Y. Igarashi and T. Furumai. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. Microbiology. 151(Pt 12):3923-33.
- Oppegård, C., Fimland G., Thorbaek L. and Nissen-Meyer J. 2007. Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol. 73(9):2931-2938
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Resistencia a los antimicrobianos, Nota descriptiva N°194, Consultado el 18/08/15, Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Orsaria, L., L. Paoletti and H. C. Gramajo. 1998. Characterization of stationary-phase proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiol. Lett. 162:275-281.
- Peces, R., E. Gago, F. Tejada, A. S. Lares and J. Alvarez-Grande. 1997. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. Nephrol Dial Transplant. 12(11):2428-2429.
- Poutou, R., M. Burbano, S. Sierra, K. Torres, A. K. Carrascal and M. Mercado. 2005. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. Univ. Sci. 10(2):61-78.

- Pospiech, A. and B. Neumann. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*. 11(6):217-8.
- Potter, A., H. Ceotto, M. L. Coelho, A. J. Guimarães and M. C. Bastos. 2014. The gene cluster of aureocyclicin 4185: the first cyclic bacteriocin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 160(Pt 5):917-928.
- Rateb, M. E., Y. Zhai, E. Ehrner, C. M Rath, X. Wang, J. Tabudravu, R. Ebel, M. Bibb, K. Kyeremeh, P. C. Dorrestein, K. Hong, M. Jaspars y Deng H. 2015. Legonaridin, a new member of linaridin RiPP from a Ghanaian *Streptomyces* isolate *Organic and Biomolecular Chemistry*. 13:9585–9592.
- Rea, M. C., C. S. Sit, E. Clayton, P. M. O’Connor, R. M. Whittal, J. Zheng, J. C. Vederas, R. P. Rossa and C. Hill. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Microbiology*. 107(20):9352-9357.
- Reid, K. C., F. R. Cockerill III, R. Patel. 2001. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clin. Infect. Dis.* 32(11):1540-1546.
- Rintala, H., A. Nevalainen, E. Ronka and M. Suutari. 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Mol. Cell. Probes*. 15:337-347.
- San Lucas, C. H. y P. J. Cáceres. 2012. Uso de Natamicina en pan de molde sin corteza para aumentar el tiempo de vida útil. Tesis doctoral, Consultado el 12/08/15. Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/20712>

- Scott, L. J., K. McKeage, S. J. Keam and G. L. Plosker. 2003. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 63:1247–1297.
- Sharma, N., A. Gupta and A. Gautam. 2014. Characterization of Bacteriocin like inhibitory substance produced by a new Strain *Brevibacillus borstelensis* AG1 Isolated from ‘Marcha’. *Braz. J. Microbiol.* 45(3):1007-1015.
- Shepherd, M. D., M. K. Kharel, M. A. Bosserman and J. Rohr. 2010. Laboratory Maintenance of *Streptomyces* species. *Curr. Protoc. Microbiol.* 18:E:10E.1:10E.1.1–10E.1.8.
- Smith, M. H. 1966. The amino acid composition of proteins. *J. Theor. Biol.* 13:261-282.
- Stein, T., S. Heinzmann, I. Solovieva and K. D. Entian. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes nisl and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 278(1):89-94
- Téllez, G. A. y Castaño J. C. 2010. Péptidos antimicrobianos. *Infectio.* 14(1):55:67.
- Tillotson, R. D., H. A. B. Wosten, M. Richter and J. M. Willey. 1998. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophillum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol. Microbiol.* 30:595–602.
- Soohyun, U., T. Joon Choi, H. Kim, B. Yong Kim, K. Seong-Hwan, L. Sang Kook, O. Ki-Bong , S. Jongheon and O. Dong-Chan. 2013. Ohmyungsamycins A

- and B: Cytotoxic and Antimicrobial Cyclic Peptides Produced by *Streptomyces* sp. from a Volcanic Island. J. Org. Chem. 78(24):12321–12329.
- Verluyten, J., F. Leroy and L. De Vuyst. 2004. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolate *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. Appl Environ Microbiol. 70:5081–5088.
- Vivier D., R. Ratomahenina, P. Galzy. 1994. Characteristics of micrococci from the surface of Roquefort cheese. J. Appl. Microbiol. 76(6):546-552
- Voet, D., J. G. Voet and C. Pratt. 2009. Fundamentos de Bioquímica. Editorial Medica Panamericana S. A. pp 344-345.
- Völler, G. H., J. M. Krawczyk, A. Pesic, B. Krawczyk, J. Nachtigall and R. D. Süssmuth. 2012. Characterization of New Class III Lantibiotics Erythreapeptin, Avermipeptin and Griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* Demonstrates Stepwise N-Terminal Leader Processing. ChemBioChem. 13(8):1174-1183
- Wang, G., D. C. Manns, J. J. Churey and R. W. Worobo. 2014. Short communication: Naturally sensitive *Bacillus thuringiensis* EG10368 produces thurincin H and acquires immunity after heterologous expression of the one-step-amplified thurincin H gene cluster. Int. J. Dairy Sci. 97(7):4115-4119.
- Watve, M.G., R. Tickoo, M. M. Jog, B. D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch. Microbiol. 176:386–90

- Wells, C. L. and T. D. Wilkins. 1996. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 18
Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli.
- Willey, J. M., R. Santamaria, J. Guijarro, M. Geistlich and R. Losick. 1991.
Extracellular complementation of a developmental mutation implies a small
sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. Cell.
65:641-650.
- Wohlleben, W., Mast Y., Muth G., Röttgen M., Stegmann E., Weber T. 2012.
Synthetic Biology of secondary metabolite biosynthesis in actinomycetes:
Engineering precursor supply as a way to optimize antibiotic production.
FEBS Lett. 586(15):2171-2176
- World Health Organization. 2015. WHO estimates of the global burden of
foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference
group 2007-2015. 24/12/2019. World Health Organization Sitio web:
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_e
ng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf)
- Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka, M. Okazaki. Purification and
characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis*
strain RJ-11. Appl. Environ. Microbiol. 69(10):5746-5753.
- Zenebergh, A. and A. Trouet. 1982. Cellular pharmacokinetics of spiramycin in
cultured macrophages. Annales d' Immunologie, 133(3):235-44.

