



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**Estudio de sustancias antimicrobianas de interés
biotecnológico y biomédico.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M.C. Catherine Cesa Luna

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Verónica Quintero Hernández

CODIRECTOR DE TESIS:

D.C. Antonino Baez Rogelio

PUEBLA, PUE.

ABRIL, 2020

Puebla, Pue. a 14 de mayo 2020.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Catherine Cesa Luna**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio de sustancias antimicrobianas de interés biotecnológico y biomédico"

A nuestro juicio, la alumna **Catherine Cesa Luna** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"



D.C. Jesús Muñoz Rojas



D.C. Lucía Martínez Martínez



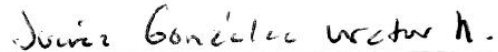
D.C. Alma Rosa Netzahuatl Muñoz



D.C. Griselda Karina Guillén Navarro



D.C. Vianey Marin Cevada



D.C. Victor Rivelino Juárez González

DEDICATORIA

A **Dios**, por darme salud, sabiduría y fortaleza para lograr concluir satisfactoriamente mis estudios de doctorado.

A mis **padres** Luis Cesa Bulbarela y Teresita Luna Sandoval. Gracias por su cariño, apoyo incondicional y consejos a lo largo de mi trayectoria académica, así como los valores y principios que me inculcaron desde pequeña. Cada día aprendo mucho de ustedes y son un claro ejemplo de esfuerzo y dedicación. Siempre estaré muy orgullosa y agradecida de tenerlos como padres.

También dedico este trabajo a mi **familia**, en especial a mis sobrinas que me llenan de alegría. Les agradezco porque con mucho cariño han puesto su confianza en mí para lograr un objetivo más en mi vida profesional.

Gracias a todos por consentirme cuando estoy en casa. A pesar de la distancia siempre los llevo en mi corazón, ¡Los quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por otorgarme la beca No. 538125/294272 para llevar a cabo mis estudios de Doctorado en Ciencias (Microbiología).

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM)**, a la dirección del **Instituto de Ciencias (ICUAP)** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** por los apoyos otorgados para la asistencia a congresos y estancias de investigación.

Agradezco con mucho cariño a mi directora de tesis **D.C. Verónica Quintero Hernández**, por apoyarme y guiarme en este proyecto. Por los conocimientos, experiencias y el tiempo compartido para mi crecimiento personal y profesional. Por confiar en mí y en impulsarme a nunca rendirme. Además de ser una excelente científica es una gran amiga. Deseo que la vida nos permita seguir colaborando en muchos proyectos como hasta ahora.

Mi más sincero agradecimiento a mi codirector de tesis **D.C. Antonino Baez Rogelio**, por su tiempo, dedicación y apoyo brindado, por los consejos y experiencias compartidas. Sus conocimientos fueron indispensables para mi formación académica. Estoy muy agradecida por haber tenido la oportunidad de ser guiada por excelentes personas como usted y mi asesora.

A los miembros de mi comité tutorial, **D.C. Alma Rosa Netzahuatl Muñoz**, **D.C. Jesús Muñoz Rojas**, **D.C. Griselda Karina Guillén Navarro** y **D.C. Lucía Martínez Martínez**, por sus comentarios, sugerencias y asesoría durante estos cuatro años. Gracias **D.C. Vianey Marín Cevada**, por su amistad y su valiosa aportación en la revisión de esta tesis.

Al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en especial al **Dr. Lourival D. Possani Postay** por otorgarme las facilidades durante mi estancia de investigación, y a **Leonel Vargas Jaimes** por guiarme en la realización de mis ensayos.

Al **Dr. Steffen Graether**, del Department of Molecular and Cellular Biology de la University of Guelph (Ontario, Canadá), por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo, conocimiento, y el material necesario durante mi estancia de investigación. Agradezco también a **Kanu, Tylor** y **Margaret** por sus consejos y atenciones.

Al **D.C. Víctor Rivelino Juárez González** y **D.C. Gloria Saab Rincón** por su apoyo y colaboración en la caracterización de los péptidos antimicrobianos.

Al **M.C. Roberto Llano Villarreal**, por su gran amistad y apoyo brindado desde la maestría. También le agradezco por su contribución en la identificación molecular del modelo bacteriano.

A mis **compañeros, amistades e investigadores** del **CICM**, por brindarme su amistad, consejos y apoyo desde mi llegada al instituto, ¡Muchas gracias!

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
AA	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AHL	Acil Homoserin Lactona
ARN	Ácido ribonucleico
ATB	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bacterias ácido lácticas
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CaCl₂	Cloruro de calcio
CD	<i>Circular dichroism</i> (dicroísmo circular)
cm	Centímetros
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Da	Dalton
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> (deoxinucleósido trifosfato)
DO	Densidad óptica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América)
g	Gramos
h	Horas
H₂O	Agua
HC₂₅	<i>Hemolytic concentration 25</i> (concentración hemolítica 25)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
IsCT	Péptido lineal citotóxico del alacrán <i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (encontrado en Isalo, Madagascar).
L	Litros
LB	Luria-Bertani
M	Masa molar
MDR	Multidrogo-resistente

MgSO₄	Sulfato de magnesio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDBP	<i>Non-disulfide-bridge-peptide</i> (péptido sin puentes disulfuro)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
PAM	Péptido antimicrobiano
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón Fosfato Salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RNA-seq	Secuenciación de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
SD	<i>Standard deviation</i> (desviación estándar)
Tm	<i>Melting temperature</i> (temperatura de alineamiento)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltio
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Péptidos antimicrobianos y mecanismos de actividad antimicrobiana	4
2.1.1. Bacteriocinas	4
2.1.2. Péptidos antimicrobianos del veneno de alacrán.....	9
2.2. Modelos seleccionados para el estudio de actividad antimicrobiana	13
2.2.1. Modelo bacteriano con actividad antagonista	13
2.2.2. Péptidos antimicrobianos del alacrán <i>Urodacus yaschenkoi</i>	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
4.1. Objetivos particulares	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Elaboración de los medios de cultivo	18
5.2. Cepas utilizadas.....	18
5.3. Identificación molecular del modelo bacteriano	19
5.3.1. Purificación de ADN genómico de la cepa antagonista EMM-1	19
5.3.2. Amplificación del gen <i>rrs</i> (ADNr 16S)	19
5.3.3. Amplificación de genes “housekeeping”	20
5.3.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas	20
5.4. Evaluación de la actividad inhibitoria del modelo bacteriano	21
5.4.1. Preparación de los inóculos.....	21
5.4.2. Ensayos de antagonismo.....	21
5.4.3. Obtención y evaluación de un extracto con actividad inhibitoria.....	22
5.4.4. Evaluación de la producción de sustancias inhibitorias en medio líquido	22
5.5. Búsqueda de bacteriocinas en el genoma de la cepa EMM-1	23
5.5.1. Búsqueda de bacteriocinas en especies de <i>Pseudomonas protegens</i>	23
5.5.2. Amplificación del gen <i>lpa</i>	24
5.5.3. Clonación en el vector pJET1.2/blunt	25
5.5.4. Preparación de células competentes	25

5.5.5.	Ensayos de transformación bacteriana.....	25
5.6.	Síntesis química de péptidos antimicrobianos (PAMs) del veneno del alacrán <i>Urodacus yaschenkoj</i>	26
5.6.1.	Diseño del péptido QnCs-BUAP	27
5.6.2.	Preparación de los PAMs sintetizados.....	28
5.7.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los PAMs	28
5.7.1.	Preparación de los inóculos bacterianos	28
5.7.2.	Concentración mínima bactericida (CMB)	28
5.8.	Determinación de actividad citotóxica de los PAMs	30
5.9.	Ensayos de sinergismo mediante combinación de los PAMs evaluados	31
5.9.1.	Combinaciones de los péptidos antimicrobianos	31
5.9.2.	Determinación de la concentración fraccional inhibitoria (CFI)	31
5.10.	Análisis de la estructura secundaria de los PAMs y espectro de dicroísmo circular (CD).....	32
6.	RESULTADOS	33
6.1.	La identificación molecular de la cepa antagonista permitió asignarla como <i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1	33
6.2.	Efecto antagónico de <i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 contra bacterias y hongos.....	36
6.3.	El extracto crudo de <i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 presenta actividad antimicrobiana contra <i>Streptococcus</i>	38
6.4.	<i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 produce sustancias inhibitorias en medio líquido en condiciones de aireación limitada	39
6.5.	<i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 contiene un gen que codifica para la bacteriocina LlpA	41
6.6.	Los péptidos antimicrobianos del veneno del alacrán <i>Urodacus yaschenkoj</i> tienen actividad antibacteriana de amplio espectro	42
6.7.	Las combinaciones de los péptidos antimicrobianos presentan mayor actividad antimicrobiana que de manera independiente	44
6.8.	Los PAMs Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP presentan baja actividad citotóxica contra eritrocitos humanos.....	46
6.9.	Confirmación de la estructura secundaria de los PAMs Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP	47
7.	DISCUSIÓN	50
8.	CONCLUSIONES	58
9.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	59

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	80

RESUMEN

El incremento de bacterias multidrogo-resistentes (MDR) representa un problema de salud pública a nivel mundial. Actualmente, las terapias antimicrobianas disponibles no son suficientes para eliminar a patógenos MDR, por lo que resulta indispensable el estudio de antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción que favorezcan el control de estos patógenos.

El uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) ha sido sugerido como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas pues poseen mecanismos de acción diferentes a los de los antibióticos de amplio espectro; desafortunadamente, son pocos los PAMs que han sido aprobados para su uso terapéutico. Los PAMs del veneno de alacrán son un ejemplo de sustancias bioactivas con potencial para su uso contra bacterias MDR.

En este estudio, determinamos la concentración bactericida mínima (CMB) de tres PAMs del alacrán *Urodacus yaschenkoi* (Uy234, Uy17 y Uy192) contra aislados clínicos de bacterias MDR. Además, evaluamos la actividad de un nuevo péptido antimicrobiano diseñado en nuestro laboratorio a partir de una secuencia consenso que contiene los aminoácidos más conservados de PAMs de tipo IsCT del veneno de diversos alacranes. Todos los péptidos mostraron alta actividad antibacteriana, con mayor actividad contra *Streptococcus* beta-hemolíticos. La actividad hemolítica de estos péptidos contra eritrocitos humanos fue significativamente menor que la de otros PAMs del veneno de alacrán y su estructura α -helicoidal se confirmó mediante dicroísmo circular (CD); sugiriendo que los cuatro péptidos pueden ser herramientas valiosas para el diseño y desarrollo de PAMs para su uso en la inhibición de bacterias patógenas MDR. Adicionalmente, se encontró un claro índice de sinergismo y aditividad para la combinación de QnCs-BUAP + Uy234, por lo que estos péptidos son los candidatos más prometedores para su uso contra bacterias patógenas.

Por otra parte, se evaluó un modelo bacteriano antagonista que produce sustancias inhibitorias con propiedades interesantes. Esta bacteria, identificada molecularmente en este trabajo como *Pseudomonas protegens* EMM-1, es capaz de antagonizar a un amplio espectro de bacterias MDR y hongos fitopatógenos. Además, se ha logrado caracterizar

parcialmente a sustancias inhibitorias de tipo bacteriocina que son altamente efectivas para inhibir el crecimiento de *Streptococcus* beta-hemolíticos.

En este trabajo, se demostró que *P. protegens* EMM-1 contiene genes que codifican para algunos metabolitos interesantes como la bacteriocina LlpA, 2,4-diacetilfloroglucinol y pioluteorina. Se comprobó que la bacteria sí produce sustancias inhibitorias en medio líquido y se infiere que la producción de estas sustancias es influenciada por la presencia de oxígeno, posible razón por la cual anteriormente no se había detectado actividad inhibitoria en medio líquido. Estas características le brindan a *P. protegens* EMM-1 la posibilidad de ser utilizada tanto a nivel clínico como agronómico, pues es candidata ejemplar para el control de bacterias MDR y de hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The rise of MDR bacteria represents a significant public health problem worldwide. Currently, the available antimicrobial therapies are not sufficiently effective in eliminating MDR pathogens, so it is essential to study antimicrobials with new mechanisms of action that favor the control of these pathogens.

The use of antimicrobial peptides (AMPs) has been suggested as an alternative in the treatment of infectious diseases because the mechanisms of action differ from those of broad-spectrum antibiotics; unfortunately, only a few antimicrobial peptides have been approved for therapeutic use. Antimicrobial peptides from scorpion venoms are an example of bioactive substances with potential for use against MDR bacteria.

In this study, we determined the minimum bactericidal concentration (MBC) of three AMPs from *Urodacus yaschenko* scorpion (Uy234, Uy17, and Uy192) against the clinical isolates of MDR bacteria. In addition, we tested the activity of a consensus AMP designed in our laboratory based on some previously reported IsCT-type (cytotoxic linear peptide) AMPs. All peptides showed high bactericidal activity, with the highest activity against beta-hemolytic *Streptococcus*. The hemolytic activity of these peptides against human erythrocytes was significantly lower than that of previously reported scorpion AMPs, and the α -helical structure was confirmed by circular dichroism (CD); suggesting that the four peptides can be valuable tools for the design and development of AMPs for use in the inhibition of MDR pathogenic bacteria. A precise index of synergism and additivity was found for the combination of QnCs-BUAP + Uy234, which makes these peptides the most promising candidates against pathogenic bacteria.

On the other hand, an antagonistic bacterium that produces inhibitory substances with interesting properties was evaluated. This bacterium, molecularly identified in this work as *Pseudomonas protegens* EMM-1, is capable of antagonizing a broad spectrum of MDR bacteria and phytopathogenic fungi. Besides, it has been possible to partially characterize bacteriocin-like inhibitory substances which are highly effective in inhibiting the growth of beta-hemolytic *Streptococcus*.

In this work, it was proven that *P. protegens* EMM-1 carries genes involved in the production of some interesting metabolites such as bacteriocin LlpA, 2,4-

diacetylphloroglucinol, and pyoluteorin. The production of inhibitory substances in liquid medium was confirmed, and it is inferred that the production of these substances is influenced by the presence of oxygen, a probable reason because it did not produce inhibitory activity in the liquid medium before. These characteristics give *P. protegens* EMM-1 the possibility of being used both clinically and agronomically, as it is an ideal candidate for the control of MDR bacteria and phytopathogenic fungi.

1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias antimicrobianas son definidas como sustancias químicas que a bajas concentraciones provocan la muerte de un microorganismo o detienen su crecimiento. Generalmente, los antimicrobianos son producidos por un microorganismo o pueden obtenerse mediante síntesis química [1]; no obstante, la producción de sustancias antimicrobianas ha sido evidenciada en los tres dominios de la vida [2] y se ha propuesto su producción como un mecanismo de defensa y competencia para el dominio de un nicho ecológico [3,4].

En el dominio Eukarya, se han descrito diversas sustancias antimicrobianas provenientes de hongos microscópicos, como la penicilina, aislada por primera vez del hongo *Penicillium notatum*; algunas plantas medicinales como el ajo, con más de 150 sustancias antimicrobianas, han resultado ser muy beneficiosas para combatir infecciones bacterianas [5]. Otros compuestos antimicrobianos han sido descritos en insectos, arácnidos y algunos vertebrados, conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs), éstos desempeñan una función muy importante en el sistema de defensa de los seres vivos [6]; ejemplo de estos PAMs son las defensinas y lactoferrinas [7,8].

En los dominios Bacteria y Archaea, los microorganismos han desarrollado diversas estrategias de competencia, como es la producción de sustancias inhibitorias [9,10] entre las cuales se encuentran los antibióticos de amplio espectro, sideróforos, lisozimas, compuestos orgánicos volátiles, antifúngicos, bacteriocinas, entre otros [11–14]. Algunos ejemplos de estas sustancias inhibitorias son el cloranfenicol, antibiótico producido por bacterias del género *Streptomyces* [15]; pioverdina, sideróforo producido por bacterias del género *Pseudomonas* [16]; nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* [17,18]; antifúngicos como el 2,4-diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG) y anfotericina B [19,20], entre otros.

A pesar de la diversidad de sustancias antimicrobianas conocidas, la resistencia antimicrobiana ha sido reportada y representa una de las mayores amenazas para la salud humana, la salud animal y la agricultura [21]. La resistencia a antimicrobianos surge cuando un microorganismo desarrolla la habilidad para resistir los efectos de un antibiótico, de manera que se reduce la eficacia de los medicamentos diseñados para el

tratamiento de enfermedades infecciosas [22]. Existen diversos factores que contribuyen al incremento de resistencia antimicrobiana; uno de ellos es el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, ya que a través de “presión selectiva” se promueve el desarrollo de microorganismos resistentes, de modo que disminuye el número de microorganismos sensibles [22,23].

En la actualidad, se conocen microorganismos resistentes a múltiples antimicrobianos. Por ejemplo, aquellos microorganismos que son resistentes a 3 o más clases de antimicrobianos diferentes se les conoce como multidrogo-resistentes (MDR) [24]. A principios del año 2017, la organización mundial de la salud (OMS) publicó una lista de microorganismos MDR para los cuales se requiere desarrollar nuevos antibióticos [25]; entre estos microorganismos se incluyen *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Otro microorganismo de importancia clínica a nivel mundial es *Mycobacterium tuberculosis*, el cual causa la muerte de millones de personas cada año debido al incremento de cepas MDR; además, se han reportado infecciones por tuberculosis ampliamente resistente a los medicamentos (XDR-TB) en todo el mundo [26].

Por otra parte, la resistencia antimicrobiana también ha afectado otras áreas como la agricultura donde comúnmente se utilizan productos químicos para el control de bacterias y hongos fitopatógenos. Por ejemplo, la resistencia a estreptomina (antibiótico utilizado para el control de enfermedades bacterianas en diversos cultivos) se ha reportado en patógenos de plantas como *Pseudomonas syringae* y *Xantomonas campestris* [27]. La aparición de hongos resistentes a fungicidas también ha sido reportada, reduciendo la disponibilidad de compuestos activos para el control de hongos fitopatógenos y dificultando el manejo agronómico de enfermedades en los cultivos [28].

Debido a la alta incidencia de microorganismos MDR en diversos sectores a nivel mundial [29] y a la limitación de nuevos antimicrobianos efectivos contra estos microorganismos [30], la resistencia antimicrobiana es considerada una amenaza global y un problema crítico para el cuidado de la salud, aumentando el riesgo de propagación y prolongación de enfermedades infecciosas. Por esa razón, es indispensable buscar nuevas estrategias para el control de microorganismos MDR, por lo que el estudio de

nuevas sustancias antimicrobianas resulta de gran importancia para determinar su actividad biológica y seleccionar aquellas con potencial para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.

Algunas de las estrategias que se han propuesto para combatir el desarrollo de microorganismos resistentes a los antimicrobianos son: el uso de microorganismos antagonistas, los cuales se han utilizado como agentes de biocontrol o conservadores alimenticios [31]; el uso de bacteriocinas y péptidos antimicrobianos, debido a su alta especificidad, baja toxicidad y baja inducción de resistencia antimicrobiana [32]; así como el uso de bacteriófagos, nanopartículas magnéticas y terapias combinadas con antimicrobianos que incluyan diferentes mecanismos de acción [33–35].

En este trabajo, el objetivo principal fue evaluar la actividad de diversas sustancias antimicrobianas contra aislados clínicos de bacterias MDR. Para ello se evaluó la actividad bactericida de tres PAMs de cadena corta provenientes del veneno del alacrán *Urodacus yaschenkoj*, así como de un péptido antimicrobiano diseñado a partir de una secuencia consenso. Además, se evaluó la actividad hemolítica contra eritrocitos humanos y se determinaron las estructuras secundarias mediante dicroísmo circular (*CD*, por sus siglas en inglés).

Adicionalmente, se identificó molecularmente a una bacteria antagonista (cepa EMM-1) aislada de la rizósfera de maíz, y se evaluaron y caracterizaron algunos de los metabolitos secundarios producidos por esta bacteria. Además, se determinó la actividad inhibitoria contra los mismos aislados clínicos, de algunos compuestos de tipo bacteriocina producidos por la cepa EMM-1.

2. ANTECEDENTES

2.1. Péptidos antimicrobianos y mecanismos de actividad antimicrobiana

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas de bajo peso molecular formadas por 10 a 100 aminoácidos, especialmente de tipo arginina y lisina, por lo que la mayoría tienen carga positiva a pH fisiológico [6,36]. Generalmente son hidrofóbicos y anfipáticos, además de ser propensos a adoptar estructuras alfa helicoidales. Su actividad principal es inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos y algunos virus.

A la fecha se han descrito cientos de PAMs y se han aislado de organismos vertebrados e invertebrados, bacterias, hongos y plantas [37–42]. En este capítulo únicamente nos enfocaremos en describir las características y modos de acción de algunos PAMs provenientes de bacterias (bacteriocinas) y PAMs obtenidos de venenos de alacrán.

2.1.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de origen peptídico sintetizadas ribosomalmente por miembros del dominio Bacteria y representan al grupo más abundante y diverso del sistema de defensa bacteriano [43]. Anteriormente eran conocidas por inhibir únicamente a especies relacionadas filogenéticamente con la bacteria productora [44], sin embargo, diversos estudios han reportado su potencial para inhibir a un amplio espectro microbiano, incluyendo levaduras y parásitos [45].

Las bacteriocinas han sido clasificadas de acuerdo con su naturaleza química y procedencia. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, tienen un tamaño que varía de 2 a 30 kDa y sus estructuras pueden contener aminoácidos no comunes como la lantionina (lantibióticos) o pueden ser más complejas incluyendo azúcares (glicoproteínas) o lípidos (lipoproteínas). Otras bacteriocinas como Enterocina As-48 (producida por *Enterococcus faecalis*), se caracterizan por tener estructura circular [46]. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas son capaces de permeabilizar la membrana a través de la formación de poros y además pueden inhibir

la síntesis de pared celular y la actividad de la enzima fosfolipasa A2, que participa en la reparación de las membranas bacterianas [47].

Las principales bacterias Gram-positivas productoras de bacteriocinas son las bacterias ácido lácticas; el ejemplo más conocido es *Lactococcus lactis* que produce nisina [43]. Algunos miembros del género *Bacillus* también son conocidos por producir diversas bacteriocinas, especialmente de tipo lipopéptido [48]; por ejemplo, subtilina (producida por *Bacillus subtilis*) y coagulina (producida por *Bacillus coagulans*) [49]. *Bacillus thuringiensis* también ha sido considerado como potencial productor de bacteriocinas, la mayoría con actividad de amplio espectro, inhibiendo a diversas especies bacterianas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, además de hongos como *Aspergillus*.

Las bacterias Gram-negativas producen bacteriocinas de alto peso molecular (30-80 kDa) y de bajo peso molecular (<10 kDa) [50]. El estudio de este tipo de bacteriocinas surgió a partir del descubrimiento de la primer bacteriocina producida por *Escherichia coli*, conocida como colicina [9]. Se ha reportado que el mecanismo de acción de las colicinas es a través del reconocimiento de receptores de superficie celular de una célula blanco, mediante la maquinaria Tol o TonB [51]. Su estructura está organizada en tres diferentes dominios: i) dominio de translocación (T), localizado en el sitio N-terminal de la proteína, ii) dominio central, que es el sitio de unión al receptor celular (R), y iii) dominio de citotoxicidad (C), responsable de eliminar a otros microorganismos a través de mecanismos como la formación de poros en la membrana, degradación de ADN, o inhibición de la síntesis de mureína, lipopolisacárido u otras proteínas [52]. Otro tipo de bacteriocinas más pequeñas son las microcinas, producidas principalmente por diversas enterobacterias. Las microcinas se producen como péptidos precursores incluyendo un péptido líder en el sitio N-terminal, y pueden presentar o no modificaciones post-traduccionales. Su tamaño varía de <5 a 10 kDa y el mecanismo de acción puede ser a través de la formación de poros en la membrana, actividad ADNasa o ARNasa, o inhibiendo la síntesis de proteínas [51,53].

En el género *Pseudomonas* se han descrito otro tipo de bacteriocinas denominadas “piocinas” [54]. Las piocinas, al igual que las colicinas, actúan a nivel de la superficie

celular reconociendo receptores específicos [55]. Basada en su estructura, la clasificación de las piocinas incluye las tipo R, F y S [56]. Se cree que las piocinas de tipo R han evolucionado a partir de colas de fagos, ya que su estructura se asemeja con las colas no flexibles y contráctiles de los bacteriófagos. Las piocinas de tipo F son similares a las tipo R excepto que su estructura es flexible y no contráctil, similar a una barra; las piocinas de tipo S son similares y constan de un componente con actividad ADNasa o ARNt-asa, y otro considerado como una proteína inmunitaria que protege a la célula de su propia destrucción [57].

Anteriormente se creía que las piocinas presentaban un espectro antimicrobiano limitado ya que solo se había demostrado su actividad antimicrobiana contra otras especies del género *Pseudomonas* y cepas del complejo *Burkholderia cepacia*; sin embargo, las piocinas de tipo R también son capaces de inhibir a otras especies como *Campylobacter* sp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus ducreyi* [58]. Dado que el mecanismo de acción de las piocinas depende de un receptor celular, se ha sugerido su uso para sustituir a los antibióticos de amplio espectro y así disminuir los daños generalmente causados al microbioma humano.

Se han descrito bacteriocinas similares a la cola de fagos, particularmente en especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas. Estas moléculas conocidas como "tailocinas" son estructuras grandes con colas contráctiles o flexibles. Ambas llevan a cabo un mecanismo de acción similar a la infección por fagos donde primero se unen al receptor celular y después se punza la membrana citoplásmica, donde se produce la liberación masiva de iones [59]. Estudios recientes han revelado que las tailocinas no están restringidas al género *Pseudomonas*. Por ejemplo, *Burkholderia cenocepacia* BC0425 produce una tailocina de amplio espectro (BceTMilo) capaz de inhibir a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a través de un posible mecanismo que implica la unión a un receptor de D-glucosa para su absorción a través de la superficie celular [60]. Las bacterias Gram-positivas como *Clostridium difficile* también producen estructuras similares a las tailocinas que podrían servir para tratar infecciones por *C. difficile* [61].

Recientemente se han descubierto bacteriocinas caracterizadas por contener dos dominios de unión a carbohidratos, similares a las lectinas de unión a manosa de las plantas monocotiledóneas (MML). Estas bacteriocinas de tipo lectina (LlpAs) se han

reportado en bacterias como *Pseudomonas putida* (putidacin L1), *Pseudomonas syringae* (LlpAPss642) y *Pseudomonas protegens* (LlpA1Pf-5) [62] y han mostrado actividad antibacteriana contra diversas especies del género *Pseudomonas*, pero no se ha reportado actividad antimicrobiana fuera de este género.

2.1.1.1. Métodos de extracción de bacteriocinas

Antes de extraer y caracterizar una bacteriocina es necesario identificar una bacteria productora de sustancias antimicrobianas, para ello se realizan ensayos de antagonismo como los ensayos de inhibición simultánea, agar en doble capa o antagonismo en medio líquido [63].

Una vez identificada la bacteria productora mediante ensayos de antagonismo, es indispensable conocer las condiciones adecuadas para la producción de bacteriocinas en medios de cultivo, pues se ha descrito que la actividad inhibitoria de las bacteriocinas puede alterarse debido a variables del crecimiento bacteriano como: i) la composición del medio de cultivo, ii) el tiempo de crecimiento, iii) pH y temperatura, iv) biomasa, v) adición de nutrientes o vitaminas y vi) condiciones de aireación [64–66].

Debido a que la naturaleza química y los mecanismos de biosíntesis de bacteriocinas son muy diversos, no existe un protocolo específico para su extracción y purificación, por lo que el proceso de extracción de bacteriocinas generalmente consiste en generar litros de cultivo de la bacteria productora para posteriormente obtener sobrenadantes libres de células o inactivar cultivos bacterianos por calor. Posteriormente, se puede recurrir a métodos tradicionales como la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, purificación por ultrafiltración, uso de solventes orgánicos, entre otros [18,67,68].

A partir de esta etapa de extracción ya es posible medir la actividad inhibitoria de un extracto crudo de proteínas por ensayos de difusión en agar. Sin embargo, en algunos ensayos es requerido reducir el volumen de los extractos para concentrar los metabolitos de interés previo a los pasos de purificación. Algunas técnicas que han sido empleadas para la concentración de los extractos bacterianos incluyen el uso de rotavapores (cuando el método de extracción involucra el uso de solventes orgánicos), así como la liofilización, por lo que es indispensable conocer la estabilidad del extracto a cambios de temperatura y desecación.

Algunos métodos que comúnmente se utilizan para purificar bacteriocinas incluyen: cromatografías de intercambio iónico o de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión o filtración en gel, cromatografía líquida de alta presión en fase inversa, entre otros [64]. Desafortunadamente, se ha demostrado que a medida que continúan los pasos de purificación, la estabilidad y actividad de las bacteriocinas disminuye [65], por lo que en muchos ensayos no se logra caracterizar por completo a estas moléculas y únicamente se propone su uso de manera semi-purificada.

En algunos trabajos se han reportado modelos bacterianos que no presentan actividad antimicrobiana en medios líquidos, dificultando la obtención de bacteriocinas por los métodos tradicionales; por lo que se ha implementado el uso de membranas de nitrocelulosa para lograr la obtención de sustancias inhibitorias de medios de cultivo sólidos [69–71]. Es probable que en estos modelos bacterianos la presencia de oxígeno afecte a la molécula una vez secretada al medio de cultivo o que se requiera la adición de inductores para favorecer la expresión génica.

Pese a la diversidad de bacteriocinas con gran potencial biotecnológico solo algunas de ellas han logrado comercializarse, exclusivamente para la industria alimenticia. La mayoría de las aplicaciones alimentarias que involucran bacteriocinas incluyen: i) bacteriocinas parcialmente purificadas, como es el caso de Nisaplin (que contiene Nisina); ii) productos fermentados que contienen bacteriocinas en forma de fermentado crudo, como Micro-GARD 200® (que contiene metabolitos de la fermentación de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*); iii) cultivos liofilizados productores de bacteriocinas como HOLDBAC YM-C® 100 DCU (cultivo multiespecie de *Lactobacillus paracasei* y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*), y Lyofast FPR2® (cultivo multiespecie de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*) [31,66].

La limitación en la disponibilidad de bacteriocinas en el mercado podría atribuirse a múltiples factores, incluyendo el alto costo de su producción, la interacción desfavorable con otros constituyentes de los alimentos, las alteraciones de las propiedades fisicoquímicas durante las diversas etapas de procesamiento de los alimentos y el bajo rendimiento de estos compuestos por los métodos de purificación tradicionales. Una alternativa ante estas situaciones, sería la optimización de las condiciones de producción

y purificación, realizar combinaciones de bacteriocinas con otros agentes antimicrobianos, así como aprovechar nuevas tecnologías que favorezcan a su uso. En la actualidad, algunos estudios han sugerido el uso de diversas tecnologías para mejorar las propiedades y actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Por ejemplo, el uso de la nanotecnología para brindar mayor estabilidad y actividad antimicrobiana [72], el uso de bacterias encapsuladas en polímeros como el alginato donde se ha comprobado un incremento en la producción de bacteriocinas [73], el uso de bacteriocinas recombinantes [56], y la síntesis química para su producción a gran escala; sin embargo, pocas bacteriocinas se han sintetizado con éxito por tales medios.

2.1.2. Péptidos antimicrobianos del veneno de alacrán

Los alacranes son artrópodos que pertenecen al grupo de los arácnidos y han vivido en nuestro planeta durante más de 400 millones de años. Actualmente, se han descrito alrededor de 1500 especies de alacranes y el estudio de sus venenos ha resultado en el descubrimiento de un gran arsenal de péptidos bioactivos [74]; entre ellos toxinas que modulan la función de canales iónicos y receptores de membrana de ciertas células, y péptidos antimicrobianos que se caracterizan por inhibir a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras, virus y algunos protozoarios [75].

Los péptidos del veneno de alacrán se clasifican principalmente en dos grupos: péptidos unidos por medio de puentes disulfuro (*disulfide-bridged peptides*, DBP) y péptidos sin puentes disulfuro (*non-disulfide-bridged-peptides*, NDBP) [76]. Los DBP poseen entre 30 y 70 residuos de aminoácidos y tres o cuatro puentes disulfuro, con un peso molecular entre 4 y 7 kDa, y se caracterizan por tener estructura tipo α -hélice anfipática, similar a otros péptidos con actividad antimicrobiana. El veneno de los alacranes de la familia Buthidae está compuesto por péptidos de tipo DBP. En este grupo destacan las toxinas que afectan a los canales iónicos de sodio, potasio, cloro o calcio del sistema nervioso, y son los responsables de los síntomas de envenenamiento en mamíferos e insectos. Por otra parte, los NDBP son de interés por su actividad citolítica, inmunomoduladora, anticancerígena y antimicrobiana. El veneno de los alacranes que no pertenecen a la familia Buthidae se caracterizan por contener péptidos NDBP; además, los venenos de estos alacranes resultan de gran importancia ya que no

representan ningún riesgo para la salud humana pues las toxinas presentes solo afectan a los canales iónicos de insectos [77].

La mayoría de los PAMs de veneno de alacrán son sintetizados como grandes precursores que contienen una o más copias del segmento activo (péptido maduro) que es liberado por proteólisis. Posteriormente pueden sufrir modificaciones postraduccionales que pueden alterar su actividad de manera significativa; algunas de estas modificaciones incluyen la amidación del grupo carboxilo terminal, halogenación, formación de puentes disulfuro, entre otras [36,78]. Estos PAMs se han clasificado en varios grupos en función de su tamaño y estructura: PAMs de tipo escorpina, PAMs de cadena larga y PAMs de cadena corta. [74,77]. Los PAMs de tipo escorpina están compuestos por un dominio N-terminal con actividad antimicrobiana, estructurados por una α -hélice sin puentes disulfuro, y por un dominio C-terminal estructurado por tres puentes disulfuro (similar a las secuencias de toxinas de potasio) [79]. La primer escorpina caracterizada se aisló del veneno del alacrán *Pandinus imperator*, está formada por 75 aminoácidos y ha mostrado actividad antimicrobiana principalmente contra *B. subtilis*, aunque también tiene un efecto inhibitor en las etapas de oocinetos de *Plasmodium berghei* [80].

Los PAMs de cadena larga, como la hadrurina (aislada del alacrán mexicano *Hadrurus aztecus*), pertenecen a la superfamilia de péptidos sin puentes disulfuro [81]. Este péptido de 41 aminoácidos forma estructuras helicoidales y tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas como *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras. Otros péptidos relacionados como Opistoporin-1 (*Opisththalmus carinatus*) y Pandinin-1 (*Pandinus imperator*), ambos con 44 aminoácidos, tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente [82,83].

Los PAMs del alacrán *Heterometrus spinifer* han sido reportados dentro de los péptidos de cadena de tamaño intermedio; uno de ellos es HsAp (29 aminoácidos) el cual tiene actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como actividad antifúngica [84]; sin embargo, su uso terapéutico resulta limitado debido a que es altamente hemolítico contra eritrocitos humanos.

También se han reportado algunos péptidos con actividad antimalárica, como meucina-24 y meucina-25, pero carecen de actividad antibacteriana [85].

Los PAMs de cadena corta se caracterizan por contener alrededor de 13 residuos de aminoácidos. A la fecha, se han reportado más de 67 PAMs de cadena corta [74]; ejemplo de estos péptidos es el péptido IsCT del veneno del alacrán *Opisthacanthus madagascariensis*, el cual presenta un amplio espectro antibacteriano además de baja actividad hemolítica [86]. Otros péptidos de cadena corta se han aislado de alacranes mexicanos, como VmCT1 y VmCT2 del alacrán *Vaejovis mexicanus*. Las secuencias de estos péptidos fueron obtenidas mediante bibliotecas de ADNc (generadas con ARNm de las glándulas venenosas de este alacrán) y los péptidos sintetizados químicamente (con amidación C-terminal) mostraron actividad antibacteriana, así como baja actividad hemolítica [87].

Aunque el mecanismo de acción de la mayoría de estos PAMs se desconoce, se ha propuesto que actúan como formadores de poros causando rotura de la membrana celular [88]. La característica anfipática de los PAMs hace que algunos péptidos se inserten en la membrana formando poros, o bien, formando un “tapete” donde se agrupan en zonas cargadas positivas de la membrana [76,89–91]. Además de la muerte celular por permeabilidad de la membrana, se han descrito otros mecanismos de acción que intervienen en la síntesis de proteínas, síntesis de pared celular, daño al ADN y activación de autolisinas. Las membranas de las células animales son ricas en fosfolípidos neutros y colesterol, sustancias que inhiben la incorporación de estos péptidos a la membrana y la consecuente formación de poros; por lo que las concentraciones que dañan la membrana células eucariontes deben ser mucho mayores comparadas a las que se requieren para inhibir bacterias [37], y resulta una ventaja para el uso terapéutico de estos péptidos.

A la fecha, se han reportado diversos PAMs de venenos de alacrán con potencial uso a nivel clínico y posible aplicación para el control de plagas [76,82,92]. Por ejemplo, VmCT1 y VmCT2 de *Vaejovis mexicanus smithi* han mostrado actividad antimicrobiana de amplio espectro además de baja actividad citotóxica contra eritrocitos humanos [93]. Adicionalmente, la baja actividad citotóxica de otros PAMs de venenos de alacrán se ha demostrado con ensayos *in vivo* [94].

En el veneno del alacrán *Diplocentrus melici* se han encontrado compuestos con efectos antimicrobianos contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus* [95], a partir de los cuales se ha desarrollado un nuevo fármaco eficaz contra la tuberculosis, sin embargo sigue en espera de pruebas clínicas.

Pese al potencial farmacológico descubierto en los venenos de alacrán, ningún PAM de este tipo ha sido comercializado, posiblemente debido a la falta de pruebas preclínicas y clínicas necesarias para autorizar su producción, por lo que resulta de gran interés continuar explorando su potencial biotecnológico. Una alternativa al estudio de PAMs del veneno de alacrán es el diseño *in silico* de péptidos antimicrobianos utilizando la información disponible en diversas bases de datos, proveniente del análisis de nuevos transcriptomas completos de glándulas venenosas de alacrán [96,97].

2.1.2.1. Aislamiento de PAMs de venenos de alacrán

Los venenos de alacrán se obtienen mediante estimulación eléctrica del telson (sitio donde se ubica el aguijón del alacrán) seguida por la separación cromatográfica de los componentes del veneno [98]. Posteriormente la actividad antimicrobiana de las fracciones del veneno es evaluada y la estimación de los pesos moleculares de los péptidos de interés es realizada mediante electroforesis de proteínas [99,100].

Alternativamente, estos PAMs pueden obtenerse mediante librerías de ADNc. La preparación de librerías de ADNc consiste en i) obtención de ARNm de las glándulas venenosas, ii) fragmentación del ARNm, iii) síntesis del ADNc, iv) ligación de los extremos (3'ends), v) amplificación por PCR y vi) secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq, Illumina Next-Gen) [80,85,97,101].

Actualmente, en virtud de los análisis transcriptómicos de las glándulas venenosas de los alacranes, podemos conocer secuencias de nuevos péptidos antimicrobianos que pueden sintetizarse químicamente. La síntesis química de estos PAMs resulta atractiva pues permite la obtención de variantes con mayor actividad antimicrobiana y menor actividad citotóxica, así como el diseño de nuevos péptidos sintéticos [102,103].

Además, con la síntesis química se favorece al rápido estudio de estos péptidos, se evita la manipulación de alacranes potencialmente dañinos para los humanos, y se protege a la fauna de aquellos alacranes beneficiosos en el ambiente.

2.2. Modelos seleccionados para el estudio de actividad antimicrobiana

2.2.1. Modelo bacteriano con actividad antagonista

Se utilizó un modelo bacteriano con propiedades de antagonismo, previamente aislado de la rizósfera de maíz (Tlaxcala, México) por parte del Grupo de Ecología y Supervivencia de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El modelo bacteriano fue identificado en este trabajo como *Pseudomonas protegens* EMM-1. La cepa EMM-1 es una bacteria Gram-negativa fluorescente (**Fig. 17, anexo 1**) que ha mostrado ser altamente competitiva debido al antagonismo que presenta contra diversas cepas bacterianas [104]. Los primeros ensayos de antagonismo realizados con EMM-1 revelaron su potencial para inhibir a 120 cepas bacterianas de 18 géneros, incluyendo bacterias rizosféricas como *Acetobacter* sp. y *Bradyrhizobium* sp. [105]. Asimismo, se reportó la capacidad de EMM-1 para inhibir el crecimiento de diversos fitopatógenos, de manera independiente (en ensayos de antagonismo) y en asociación con plantas; entre los fitopatógenos que inhibe se incluyen especies pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Fusarium* y *Aspergillus* [106]. Debido al potencial que presenta la cepa EMM-1 para inhibir a fitopatógenos de importancia en la agricultura, su uso se ha propuesto para el control biológico. Por otra parte, se demostró que EMM-1 antagoniza mediante ensayos de agar en doble capa a bacterias de interés clínico (incluyendo cepas MDR) entre las que destacan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia* y *Streptococcus* beta-hemolíticos [104,107].

La búsqueda de las sustancias inhibitorias responsables del antagonismo por parte de EMM-1 se realizó por Aguayo-Acosta, utilizando diversas metodologías de extracción, incluyendo el uso de solventes orgánicos [69]. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de bacterias productoras de sustancias inhibitorias exploradas a la fecha, la cepa EMM-1 no mostró actividad en medios de cultivo líquidos, por lo que fue necesario diseñar una metodología especial para extraer las sustancias inhibitorias desde medios de cultivo sólidos, denominada “lixiviación en frío” [69,108].

Mediante la metodología de lixiviación en frío fue posible obtener un extracto crudo con sustancias inhibitorias de naturaleza parcialmente hidrofílica, con un tamaño que oscila entre 3 y 10 kDa, estabilidad a rangos de pH de 3 a 9 y temperatura de -4 a 60 °C. Dicho extracto no presentó actividad de captación de hierro y fue parcialmente sensible a la actividad de proteasas. Debido a estas propiedades se ha sugerido el contenido de moléculas de tipo bacteriocina en el extracto de EMM-1. La actividad del extracto crudo de EMM-1 ha sido evaluada para determinar el espectro de inhibición de las moléculas extraídas. Además, se realizó la purificación parcial del extracto mediante cromatografía de capa fina. Finalmente, la actividad inhibitoria del extracto parcialmente purificado fue evaluada mediante la metodología de agar en doble capa y se confirmó su actividad bactericida, al inhibir el desarrollo de bacterias Gram-positivas [107]. No obstante, muchas sustancias inhibitorias producidas por la cepa EMM-1 quedan por explorarse.

Dado el potencial biotecnológico que presenta la cepa EMM-1, resulta de gran interés la caracterización de nuevas sustancias inhibitorias, pero se requiere de rigurosos estudios para su caracterización. Como se ha mencionado, existen diversas variables que pudieran afectar en la producción de sustancias inhibitorias en medios líquidos. Es por ello que en muchas ocasiones, los sobrenadantes libres de células no presentan actividad inhibitoria. La cepa EMM-1 es un ejemplo de modelo bacteriano que no ha mostrado actividad en medios líquidos [69] y es probable que los metabolitos producidos por la bacteria sean influenciados por las concentraciones de oxígeno del medio de cultivo o que se requiera la adición de inductores que favorezcan la expresión génica a través de mecanismos de “*quorum sensing*”. Por lo que en este trabajo se incluyó la evaluación de la actividad inhibitoria en diferentes condiciones de aireación, así como utilizando un inductor de acil homoserin lactona (AHL).

Se ha reportado que *P. protegens* produce bacteriocinas similares a las lectinas de unión a manosa encontradas en las plantas monocotiledóneas (*MMBL*, por sus siglas en inglés); ejemplo de estas bacteriocinas es LlpA, producida por *Pseudomonas protegens* Pf5, la cual presenta actividad inhibitoria contra otras especies de *Pseudomonas*, sin embargo, no se ha reportado actividad inhibitoria fuera de este género bacteriano [62]. Por lo que adicionalmente, se incluyó la búsqueda de bacteriocinas en el genoma de *P. protegens* EMM-1, utilizando herramientas bioinformáticas.

2.2.2. Péptidos antimicrobianos del alacrán *Urodacus yaschenkoi*

U. yaschenkoi es un alacrán perteneciente a la subfamilia Urodacinae nativo de Australia Central que se caracteriza por ser inofensivo para los mamíferos, ya que en su veneno solo contiene toxinas que afectan a canales iónicos de insectos.

Recientemente, como resultado del análisis transcriptómico de las glándulas venenosas del alacrán *U. yaschenkoi* (realizado mediante *RNA-seq*), se descubrió la existencia de un gran número de péptidos (principalmente del tipo NDBP) [109–111]; ejemplo de ellos son los péptidos UyCT1, UyCT3 y UyCT5. La actividad antimicrobiana de estos péptidos ha sido evaluada y se caracterizan por tener potente actividad antimicrobiana y baja actividad hemolítica. Además, poseen una estructura de cadena corta similar a los péptidos de tipo ISCT. Esta última característica los hace atractivos para el diseño de nuevas armas terapéuticas debido al bajo costo que representa su producción por síntesis química. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) mostraron para el péptido UyCT1 actividad de 15 μM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 y 10 μM contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. El péptido UyCT3 mostró valores de CMI de 6 μM contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 10 μM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 y 15 μM contra *Escherichia coli* ATCC 25922. El péptido UyCT5 mostró actividad antimicrobiana más marcada con una CMI de 1 μM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 y 2 μM contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 [111].

Por otra parte, el análisis transcriptómico reveló que el veneno de *U. yaschenkoi* consta de 210 secuencias que codifican para 111 secuencias únicas de aminoácidos que pertenecen a: toxinas que reconocen a canales de potasio (8% de alfa-toxinas y 2% de beta-toxinas), toxinas que reconocen a canales de calcio (calcinas, 4%), péptidos inhibidores de proteasas tipo áscaris (3%), proteínas de veneno (9%), enzimas (31%), toxinas que reconocen a canales de sodio de insectos (1%), péptidos tipo toxinas (15%), alérgenos de veneno (2%), péptidos tipo La1 (4%) y PAMs (21%) [109]. Del análisis transcriptómico, destacó un alto porcentaje de secuencias precursoras de posibles PAMs similares a los péptidos de tipo escorpiña, tipo hadrurina y tipo IsCT. Algunas de las secuencias precursoras que codifican para posibles PAMs cortos (Uy234, Uy17, Uy192) no han sido caracterizadas, por lo que se propuso determinar su estructura y actividad

antimicrobiana en este trabajo. Adicionalmente, se propuso el diseño de un nuevo péptido sintético de cadena corta, realizado a partir del alineamiento múltiple de secuencias de PAMs de venenos de alacrán reportadas hasta el año 2016.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro ha conducido a la rápida selección de patógenos MDR, ocasionando un incremento en la propagación y prolongación de enfermedades infecciosas a nivel mundial.

En la actualidad existen diversas terapias antimicrobianas, pero estas no eliminan a patógenos MDR. Por lo tanto, se deben investigar antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción que favorezcan el control de estos microorganismos, con la intención de mejorar las terapias antimicrobianas conocidas.

El uso de péptidos antimicrobianos ha sido sugerido por diversos grupos de investigación como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas; sin embargo, pocos de ellos han sido aprobados para su uso.

En este trabajo, se propuso evaluar el efecto antimicrobiano de compuestos provenientes de un modelo procarionte (*Pseudomonas protegens* EMM-1), de un modelo eucarionte (PAMs del veneno del alacrán *Urodacus yaschenkoï*), y de un nuevo péptido sintético diseñado en nuestro grupo; con la finalidad de contribuir a la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

La evaluación de estos modelos permitió descubrir nuevos péptidos antimicrobianos que podrían ser valiosos para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos eficaces contra microorganismos multidrogo-resistentes a los antibióticos actualmente disponibles.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad inhibitoria de algunas sustancias antimicrobianas de interés biotecnológico y biomédico.

4.1. Objetivos particulares

- Caracterizar molecularmente a la bacteria antagonista (EMM-1).
- Evaluar la actividad inhibitoria de EMM-1 contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos fitopatógenos.
- Identificar y purificar compuestos relacionados con la actividad inhibitoria de EMM-1.
- Evaluar la actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos encontrados en el veneno del alacrán *Urodacus yaschenko*, y de un péptido sintético diseñado a partir de una secuencia consenso, tanto de forma independiente como en combinación.
- Evaluar la actividad citotóxica de los péptidos antimicrobianos Uy234, Uy17, Uy192 (*U. yaschenko*) y QnCs-BUAP (consenso) contra eritrocitos humanos.
- Determinar la estructura secundaria de los péptidos antimicrobianos de *U. yaschenko* y del péptido QnCs-BUAP mediante dicroísmo circular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Elaboración de los medios de cultivo

Para los ensayos de antagonismo, evaluación del extracto de EMM-1 y la evaluación antimicrobiana de los péptidos de alacrán, se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani modificado por Miller (LB) de acuerdo con la siguiente fórmula en gramos por litro de agua destilada: peptona de caseína 10.0 extracto de levadura 5.0 y cloruro de sodio 10.0 (pH 7.2 ± 0.2).

Para la evaluación de la producción de sustancias inhibitorias en medio líquido se utilizó caldo soya tripticaseína (TSB) que contiene la siguiente fórmula en gramos por litro de agua destilada: tripteína 17.0 peptona de soya 3.0 cloruro de sodio 5.0 fosfato dipotásico 2.5 y glucosa 2.5 (pH 7.3 ± 0.2).

5.2. Cepas utilizadas

En este trabajo se evaluaron las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 13883™); *Burkholderia cepacia* y *Paraburkholderia silvatlantica* (aisladas de caña de azúcar) [112]; tres aislados clínicos con multidrogo-resistencia, provenientes de pacientes con infecciones de vías respiratorias, donados por el Hospital ISSSTEP (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores al Servicio de los Poderes del Estado de Puebla), Puebla, México: *Klebsiella* sp. KP8, *Streptococcus* sp. SP10 y *Streptococcus* sp. ST9 (identificados mediante el sistema API 20E).

Para los ensayos de antagonismo bacteriano, se incluyeron además tres hongos fitopatógenos: *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp. y *Rhizopus* sp. [113] y la cepa *Microbacterium* sp. UAPS01-201 (anteriormente designada como 4mepi7) [104] como control positivo; esta cepa es altamente sensible a la actividad antagónica de EMM-1.

5.3. Identificación molecular del modelo bacteriano

5.3.1. Purificación de ADN genómico de la cepa antagonista EMM-1

La extracción de ADN se realizó por el método de lisis enzimática utilizando el kit “*Bacteria DNA Preparation Kit*” (Jena Bioscience). Se inocularon 10 mL de medio LB con la cepa EMM-1 y se incubó toda la noche a 30 °C en agitación (200 rpm). Posteriormente se transfirió 1 mL del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se realizó la extracción de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

5.3.2. Amplificación del gen *rrs* (ADNr 16S)

Con el objetivo de amplificar un fragmento del gen *rrs* se realizó la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) utilizando como templado ADN genómico de la cepa EMM-1 (previamente purificado) y un par de oligonucleótidos universales [114] (**Tabla 1**). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL utilizando GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega) que contiene la enzima *Taq* ADN polimerasa. La amplificación fue realizada siguiendo el protocolo de la **figura 18 (anexo 1)**, y los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 V/50 min) teñido con GelRed® (Biotium) y visualizados en un transiluminador de luz UV. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador GeneRuler™ DNA *ladder* de 1 kb (Thermo Scientific™). Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado y se incluyó un control negativo que incluía todos los reactivos excepto el ADN bacteriano.

Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético de secuencias de ADNr 16S utilizando 24 cepas del grupo *Pseudomonas fluorescens*. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa CLUSTAL W [115] y se corrigió en BIOEDIT. El árbol se dedujo mediante Neighbor-Joining [116] a partir de distancias evolutivas calculadas con el método de 2 parámetros Kimura utilizando MEGA v10.1.7 [117], y el análisis de confianza se realizó con bootstrap de 1000 repeticiones.

5.3.3. Amplificación de genes “housekeeping”

Para la identificación molecular a nivel de especie se amplificaron por PCR algunos genes altamente conservados en cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*: *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa), *rpoD* (factor σ^{70} de la ARN polimerasa), *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa) [118]. Adicionalmente, se consideraron genes que codifican para la biosíntesis de compuestos antimicrobianos producidos por especies de *Pseudomonas protegens*: *phlD* (biosíntesis de 2,4-DAPG), y se diseñaron oligonucleótidos a partir del cluster de biosíntesis de pioluteorina (Plt) [119,120] (Tabla 1). Las reacciones de PCR se realizaron de la misma forma que en el apartado 5.3.2 y los protocolos de amplificación se muestran en los anexos (Fig. 19-22, anexo 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización molecular.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	TM (°C)	Tamaño del amplificado ¹	Referencia
1. <i>rrs</i>	UN27F UN1392R	TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CAGGGGCGGTGTGTACA	52	1500	[114]
2. <i>rpoB</i>	rpoBf1 rpoBr1	CAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCT CCCATCAACGCACGGTTGGCGTC	60	508	[118]
3. <i>rpoD</i>	rpoDf rpoDr	ACTTCCCTGGCACGGTTGACCA TCGACATGCGACGGTTGATGTC	60	695	[118]
4. <i>gyrB</i>	gyrBf gyrBr2	TTCAGCTGGGACATCCTGGCCAA TCGATCATCTTGCCGACRACCA	65	586	[118]
5. <i>phlD</i>	Phl2a (F) Phl2b (R)	GAGGACGTCGAAGACCACCA ACCGCAGCATCGTGTATGAG	62	745	[119,120]
6. <i>plt</i>	catplt (F)* pltR (R)*	GCAGCAGCGTCAATGATGAAC CATGCTCGCGCTCGAACAGTTC	62	2444	Este trabajo

¹Tamaño aproximado de los amplificados en pares de bases (pb).

5.3.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas

Una vez realizadas las reacciones de PCR, los productos de interés fueron purificados utilizando el kit “*High Pure PCR Product Purification Kit*” (Roche) y cuantificados en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Posteriormente las muestras fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron analizadas utilizando el

programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar la similitud con otras secuencias nucleotídicas de bacterias.

5.4. Evaluación de la actividad inhibitoria del modelo bacteriano

5.4.1. Preparación de los inóculos

La cepa productora y los microorganismos de estudio fueron crecidos hasta su fase estacionaria en 10 mL de medio de cultivo LB a 30 °C. Para la realización de la doble capa en los ensayos de antagonismo, se inocularon 10 mL de agar LB suave (8 g/L) con 50 µL de cultivo de cada microorganismo a evaluar.

5.4.2. Ensayos de antagonismo

Para determinar si la cepa antagonista EMM-1 tenía actividad inhibitoria contra los microorganismos utilizados en este trabajo, se realizó el ensayo de antagonismo por agar en doble capa [121] siguiendo el protocolo descrito por Cesa-Luna *et al.*, [63]. Para ello, se colocó una gota de 20 µL de la cepa EMM-1 en el centro de placas Petri de vidrio de 100 x 15 mm, previamente vertidas con agar LB. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Después del periodo de incubación, las colonias se eliminaron con un portaobjetos estéril y las placas se sometieron a vapores de cloroformo (invertidas) durante 1.5 h; por este motivo, se colocaron discos de papel absorbente en cada tapa y se impregnaron con aproximadamente 1 mL de solvente, manteniendo los discos húmedos constantemente. Para finalizar, las placas se dejaron semiabiertas durante 20 minutos para eliminar el cloroformo remanente. Las placas se vertieron con una segunda capa de agar suave inoculada con cada microorganismo a evaluar (**ver apartado 5.4.1**) y se incubaron por 24 h.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los diámetros de los halos de inhibición se midieron para su análisis posterior. En los ensayos de antagonismo, se incluyó la cepa bacteriana *Microbacterium* sp. UAPS01-201 como control positivo; esta cepa es altamente sensible a la actividad antagonista de EMM-1. Adicionalmente se incluyó un control negativo de antagonismo (*E. coli* ATCC 25922).

5.4.3. Obtención y evaluación de un extracto con actividad inhibitoria

En estudios anteriores, se reportó que la cepa EMM-1 no produce actividad inhibitoria en medio líquido. Por tal motivo, para extraer y evaluar la actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por EMM-1 se obtuvo un extracto crudo a partir de agar LB siguiendo el protocolo de lixiviación en frío diseñado por Cesa-Luna *et al.*, [108] utilizando etanol absoluto como solvente para la extracción. El extracto fue concentrado con ayuda de un rotavapor, se esterilizó con filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm , y posteriormente se evaluó su actividad inhibitoria por el método de difusión en pozos contra las cepas indicadas en el apartado 5.2 [122]. Para ello, placas con agar LB fueron inoculadas con 10 mL de agar LB suave (previamente inoculado con cada microorganismo); una vez gelificado el agar, se realizaron pozos de aproximadamente 6 mm de diámetro con ayuda de una punta estéril. En cada pozo se colocaron 100 μL del extracto crudo y 100 μL de un extracto control, obtenido sin previo crecimiento de la cepa EMM-1 (control negativo). Una vez evaporados los extractos, las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C. La presencia de un halo de inhibición alrededor del pozo fue considerada como indicativa de actividad inhibitoria. Cada ensayo se realizó por triplicado y se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

Adicionalmente, se realizaron diluciones dobles del extracto para determinar las unidades arbitrarias (UA/mL). Las unidades arbitrarias son definidas como el recíproco de la dilución más alta que causó inhibición, multiplicado por 1000 y dividido entre el volumen de extracto añadido al pozo [123].

5.4.4. Evaluación de la producción de sustancias inhibitorias en medio líquido

Como se mencionó anteriormente, la cepa EMM-1 no produce actividad inhibitoria en medio líquido [69]; sin embargo, se ha reportado que la producción de sustancias inhibitorias puede ser influenciada por la presencia o ausencia de nutrientes, vitaminas, oxígeno, inductores que favorezcan la expresión génica, entre otros [64,65,124]. Por lo que en este trabajo, decidimos evaluar si la presencia de un inductor de AHL y diferentes condiciones de aireación favorecen la producción de sustancias inhibitorias de EMM-1 en medio líquido. Para ello, a partir de un cultivo “overnight” de la cepa EMM-1 se

inocularon 15 mL de caldo TSB hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.05, utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL. La DO se midió en un espectrofotómetro a 620 nm. Posteriormente, se realizaron los tratamientos indicados en la **Tabla 2** para cada cultivo. Una vez inoculados los matraces y agregado el inductor en los tratamientos correspondientes, se incubaron a 30 °C y se evaluaron a las 24 y 48 horas (**Fig. 23, anexo 1**).

Tabla 2. Tratamientos realizados para la evaluación de la producción de sustancias inhibitorias de EMM-1 en medio líquido.

Tratamiento	Agitación (rpm)	Volumen de inductor agregado
Tratamiento 1 con AHL	50	5 µL
Tratamiento 2 sin AHL	50	Sin inductor
Tratamiento 3 con AHL	180	5 µL
Tratamiento 4 sin AHL	180	Sin inductor

Después del periodo de incubación, se recolectaron alícuotas de cada tratamiento, se midió la DO a 620 nm y se cuantificaron las UFC/mL mediante el método de goteo en placa [125]. Posteriormente, se evaluó la actividad inhibitoria del sobrenadante mediante la metodología de difusión en pozos, por lo que las alícuotas se centrifugaron a 13,000 rpm/20 min y se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm. Para la evaluación de la actividad inhibitoria se utilizó como cepa sensible a *Streptococcus* sp. SP10; esta cepa ha sido reportada como altamente sensible a la actividad inhibitoria del extracto crudo (obtenido por lixiviación en frío) de la cepa EMM-1 [107,126].

5.5. Búsqueda de bacteriocinas en el genoma de la cepa EMM-1

5.5.1. Búsqueda de bacteriocinas en especies de *Pseudomonas protegens*

Debido a que se ha reportado que especies de *P. protegens* producen bacteriocinas del tipo LlpA, y en virtud de que nuestra cepa fue identificada como parte de la misma especie, en este trabajo se incluyó la búsqueda de bacteriocinas en el genoma de *P. protegens* EMM-1, utilizando herramientas bioinformáticas. Para ello, se utilizó la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) en donde encontramos reportada la

bacteriocina LlpA2 de *P. protegens* Pf-5 (número de acceso Q4KEU9). Posteriormente, la secuencia de aminoácidos de LlpA2 se analizó mediante BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) restringiendo la búsqueda a la especie *P. protegens* y se encontraron 5 secuencias de aminoácidos de bacteriocinas tipo LlpA.

Las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para estas 5 bacteriocinas (*llpA*) fueron recolectadas y se realizó un alineamiento múltiple en el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>) (datos no mostrados) para el diseño de oligonucleótidos, con el objetivo de amplificar alguna secuencia homóloga de *llpA* utilizando como templado el ADN genómico de la cepa EMM-1. Los oligonucleótidos diseñados incluyeron los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *llpA*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia con sitios de restricción ¹ (5' → 3')	TM (°C)
<i>llpA</i>	BACT- <i>NcoI</i> (F)	T ACCATGG CTTGGATTCGATACGAC	65
	BACT- <i>XhoI</i> (R)	T ACTCGAG GAACACGTTGTCCCAGGTGTAG	

¹La secuencia nucleotídica del sitio de restricción se encuentra resaltada en negrita.

5.5.2. Amplificación del gen *llpA*

Con el objetivo de amplificar un fragmento del gen *llpA* se realizó la técnica de PCR utilizando como templado el ADN genómico de la cepa EMM-1 y los oligonucleótidos BACT-*NcoI* y BACT-*XhoI* (**Tabla 3**). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL utilizando el kit ThermoPol® Reaction Buffer Pack (New England Biolabs®) que contiene la enzima Vent® ADN polimerasa. La reacción contenía 5 µL de Buffer 10X, 1 µL de una solución de dNTP mix (10 mM), 0.5 µL de cada oligonucleótido, 1 µL de ADN genómico de EMM-1, 1.5 µL de MgSO₄ (50 mM) y 0.5 µL de la enzima VENT polimerasa. El volumen final se ajustó con agua libre de nucleasas.

Las amplificaciones fueron realizadas siguiendo el protocolo de la **figura 24 (anexo 1)**, y los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 V/50 min) teñido con GelRed® (Biotium) y visualizados en un transiluminador de luz UV. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador GeneRuler™ DNA ladder de 1 kb (Thermo Scientific™). Las reacciones se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo que incluía todos los reactivos excepto el ADN bacteriano. El producto de interés fue purificado utilizando “High Pure PCR Product

Purification Kit' (Roche) y cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Para corroborar la secuencia del fragmento amplificado, fue necesario realizar la clonación en un vector molecular conocido para su posterior secuenciación.

5.5.3. Clonación en el vector pJET1.2/blunt

Una vez purificado el producto de interés (**ver apartado 5.5.2**), se realizó la clonación en el vector pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/μL) de acuerdo con las indicaciones del kit (Thermo Scientific). La ligación se llevó a cabo en relación molar 3:1 (inserto:vector) en buffer de reacción 2X y se adicionaron 0.5 μL de T4 ADN ligasa. La reacción se incubó a temperatura ambiente toda la noche y posteriormente se almacenó a -20 °C. El producto de ligación fue transformado en células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

5.5.4. Preparación de células competentes

Las células competentes requeridas para la transformación del producto de ligación se prepararon de acuerdo con Sambrook *et al.*, [127] con ligeras modificaciones. Para ello se inocularon 50 mL de medio LB con 1 mL de un precultivo de la cepa *Escherichia coli* DH5α y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.4 a 0.7 a 600 nm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm/4 °C (Eppendorf 5810 R) durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el precipitado bacteriano fue resuspendido en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M (previamente colocado en hielo). La suspensión se incubó en hielo durante 1 hora y se repitió el procedimiento 3 veces. Después de eliminar el sobrenadante en el último paso, se resuspendió el precipitado bacteriano con 1 mL de una mezcla de CaCl₂ 0.1 M con glicerol al 15% (previamente colocada en hielo). Por último, se realizaron alícuotas de 150 μL y se conservaron a -80 °C.

5.5.5. Ensayos de transformación bacteriana

La transformación se realizó mediante choque térmico como se indica a continuación: las células competentes fueron descongeladas en hielo y se agregaron 10 μL del producto de ligación (**ver apartado 5.5.3**). Se incluyó un control positivo agregando 10 μL de un plásmido con resistencia a ampicilina, y un control negativo agregando 10 μL de agua. Las muestras se incubaron en hielo durante 25 minutos. Una

vez transcurrido este tiempo, se realizó el choque térmico incubando los tubos en baño maría a 42 °C por 45 segundos. Inmediatamente, los tubos fueron retirados y colocados en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de medio de cultivo LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación constante (200 rpm).

Después del periodo de incubación, se plaquearon 200 µL de las muestras en el medio de selección (agar LB^{Amp100}) con ayuda de una varrilla de vidrio estéril. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y las colonias crecidas fueron resembradas en placas nuevas con el mismo medio de selección. La presencia del inserto fue corroborada mediante PCR de colonia. Finalmente, se purificó el plásmido utilizando QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) y se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia obtenida se analizó mediante BLASTn.

5.6. Síntesis química de péptidos antimicrobianos (PAMs) del veneno del alacrán *Urodacus yaschenkoi*

Como se mencionó anteriormente, el estudio transcriptómico de las glándulas venenosas de los alacranes ha brindado la posibilidad de tener acceso a secuencias de nuevos péptidos antimicrobianos que pueden ser obtenidos por síntesis química. Por lo que en este trabajo, se evaluaron tres PAMs del alacrán *U. yaschenkoi* (Uy234, Uy17 y Uy192) obtenidos mediante síntesis química.

Las secuencias de los tres PAMs de *U. yaschenkoi* fueron obtenidas del análisis transcriptómico de las glándulas venenosas de este alacrán realizado en 2015 [109]. Adicionalmente, se diseñó un posible péptido antimicrobiano, diseñado a partir de una secuencia consenso que contiene los aminoácidos más conservados de PAMs de tipo ISCT reportados hasta el año 2016 (**ver apartado 5.6.1**). Este péptido fue nombrado QnCs-BUAP.

Todos los péptidos antimicrobianos fueron sintetizados por la empresa Biomatik (Ontario, CA) con amidación en el sitio C-terminal y purificados mediante HPLC con una pureza mayor al 95%. Las masas moleculares se confirmaron por espectrometría de masas y sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Propiedades físicoquímicas de los PAMs utilizados en este trabajo.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Longitud (AA)	Peso Molecular (Da)	Carga neta	GRAVY ¹	Pureza
1. Uy234	FPFLLSLIPSAISAIKRL-NH ₂	18	1985.51	+3	1.328	> 99%
2. Uy17	ILSAIWSGIKGLL-NH ₂	13	1369.73	+2	1.500	> 99%
3. Uy192	FLSTIWNIGIKGLL-NH ₂	13	1460.80	+2	0.969	> 99%
4. QnCs-BUAP	FFSLIPSLISGLI-NH ₂	13	1405.76	+1	2.008	> 99%

¹Índice de hidropatía

5.6.1. Diseño del péptido QnCs-BUAP

Para este trabajo se diseñó un péptido antimicrobiano nombrado QnCs-BUAP que consistió en una secuencia consenso obtenida del alineamiento múltiple de 14 PAMs reportados para especies de alacranes hasta el año 2016, con tamaños en un rango de 13 a 19 aminoácidos (**Fig. 1**), considerando aquellos que tenían los aminoácidos más conservados en sus secuencias. Para el alineamiento se utilizó el programa en línea T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>) [128].

UNIPROT KB/GENBANK* Número de acceso	PÉPTIDO	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS	ESPECIE DE ALACRÁN (FAMILIA)
		1 10 20	
comp234_c0_seq1*	Uy234	FPFLLSLIPSAISAIKRL---	<i>U. yaschenkoi</i> (Scorpionidae)
NDB4A_CHATC	Ctriporin	F--LWGLIPGAISAVTSLIKK	<i>C. tricostatus</i> (Chaerilidae)
NDB43_MESMA	BmKb1	F--LFSLIPSAISGLISAFK-	<i>M. martensii</i> (Buthidae)
A9NJH6_MESEU	Caerin_2	F--LFSLIPSAISGLISAFK-	<i>M. eupeus</i> (Buthidae)
NDB4S_ANDCR	AcrAP1	F--LFSLIPHAISGLISAFK-	<i>A. crassicauda</i> (Buthidae)
NDB4T_ANDCR	AcrAP2	F--LFSLIPNAISGLISAFK-	<i>A. crassicauda</i> (Buthidae)
NDB47_ISOMC	Imcroporin	F---FSLPGLIGGLVSAIK-	<i>I. maculatus</i> (Buthidae)
PMC2573117*	AP6_TITCO	F---FSLIPSLIGGLVSAIK-	<i>T. costatus</i> (Buthidae)
NDB45_LYCMC	Mucroporin	L---FGLIPSLIGGLVSAFK-	<i>L. mucronatus</i> (Buthidae)
NDBM_TITSE	TsAP_1	F---LSLIPSLVGGSI SAFK-	<i>T. serrulatus</i> (Buthidae)
NDB4N_TITSE	TsAP_2	F---LGMIPGLIGGLISAFK-	<i>T. serrulatus</i> (Buthidae)
NDB4S_TITCO	AP4_TITCO	F---LGMIPGLIGGLISAFK-	<i>T. costatus</i> (Buthidae)
comp17_c0_seq5*	Uy17	I---LSAIWSGIKGLL----	<i>U. yaschenkoi</i> (Scorpionidae)
comp192_c0_seq1-2*	Uy192	F---LSTIWNIGIKGLL----	<i>U. yaschenkoi</i> (Scorpionidae)
Consensus	QnCs-BUAP	F---FSLIPSLISGLI----	

Figura 1. Alineamiento de secuencias de PAMs de venenos de alacrán utilizados para obtener el péptido consenso QnCs-BUAP. El alineamiento múltiple fue realizado en el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>). U = *Urodacus*; C = *Chaerilus*; M = *Mesobuthus*; A = *Androctonus*; I = *Isometrus*; T = *Tityus*; L = *Lychas*.

5.6.2. Preparación de los PAMs sintetizados

Los PAMs se obtuvieron en estado liofilizado, por lo que tuvieron que resuspenderse en agua tetradesilada o acetonitrilo-H₂O (1:4) dependiendo su solubilidad, para evitar la formación de precipitados. De acuerdo con el test de solubilidad realizado por Biomatik, los péptidos se resuspendieron de la siguiente forma: los péptidos Uy234 y Uy17 (solubles en agua) fueron resuspendidos en 10 mL de agua tetradesilada, obteniendo una concentración final de 380 µM y 745 µM, respectivamente. Los péptidos Uy192 y QnCs-BUAP fueron resuspendidos en 10 mL de acetonitrilo-H₂O (1:4) obteniendo una concentración final de 1,357.3 µM y 1,412.6 µM, respectivamente. Para los ensayos de actividad antimicrobiana, las concentraciones más altas evaluadas de cada PAM fueron las siguientes: péptido Uy234 = 380 µM, péptido Uy17 = 372.5 µM, péptido Uy192 = 339.3 µM, péptido QnCs-BUAP = 353.1 µM.

5.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los PAMs

5.7.1. Preparación de los inóculos bacterianos

Las cepas bacterianas fueron crecidas hasta su fase estacionaria en 10 mL de medio de cultivo LB a 30 °C. Posteriormente fueron diluidas en agua destilada para ajustar la concentración celular a 10⁵-10⁶ UFC/mL. Las suspensiones bacterianas obtenidas se cuantificaron mediante el método de goteo por sellado en placa masivo (GSPM) [129].

5.7.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Para este ensayo se realizó la metodología de microdilución en caldo de acuerdo con Li *et al.*, [130] con ligeras modificaciones. Se realizaron diluciones dobles de los PAMs y del péptido QnCs-BUAP en microplacas de 96 pozos (Costar[®] 3595) de la siguiente manera: se agregaron 100 µL de medio LB a los pozos de la primera fila (fila A) y 95 µL del mismo medio al resto de los pozos, excepto por la fila B; en la fila B se agregaron 190 µL de cada péptido sin diluir por duplicado (concentración más alta evaluada); posteriormente, utilizando una pipeta multicanal (VWR[®]) se tomaron 95 µL de los péptidos sin diluir y se añadieron a la siguiente fila (fila C) para realizar la primer dilución (1:2), se homogeneizó con precaución y se repitió el procedimiento con las

siguientes filas descartando los últimos 95 μL de la dilución final (1:32) (**Fig. 2**). Por último, se adicionaron 5 μL de los inóculos bacterianos a los pozos de las filas B-G (péptido concentrado y diluciones) y H (control de crecimiento), dejando sin inóculo a la fila A (control de esterilidad).

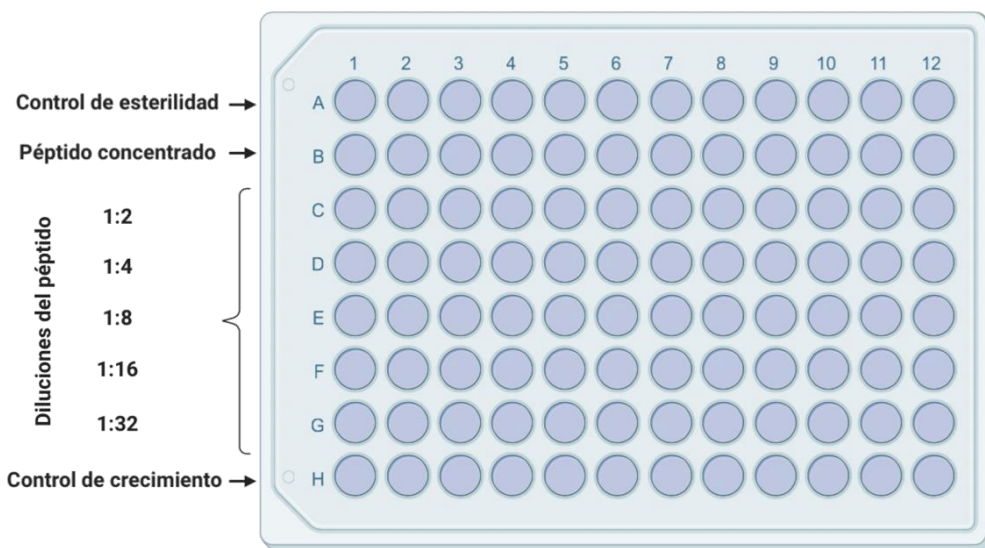


Figura 2. Representación gráfica de la evaluación de los PAMs por el método de microdilución en caldo. Creado con BioRender (www.biorender.com).

Después de la inoculación las placas se incubaron a 30 °C por 18 horas a 180 rpm y se leyó la DO a 620 nm en un lector de microplacas (BIOTEK®/KC4™). Para confirmar la completa inhibición del crecimiento bacteriano se utilizó un replicador metálico de 8 x 6 (Sigma-Aldrich) con el cual se recolectaron las muestras de los pozos y se sellaron en placas de agar LB (**Fig. 3**). La CMB se estimó como la concentración más baja que mostró inhibición total del crecimiento bacteriano. Los péptidos fueron evaluados por duplicado.

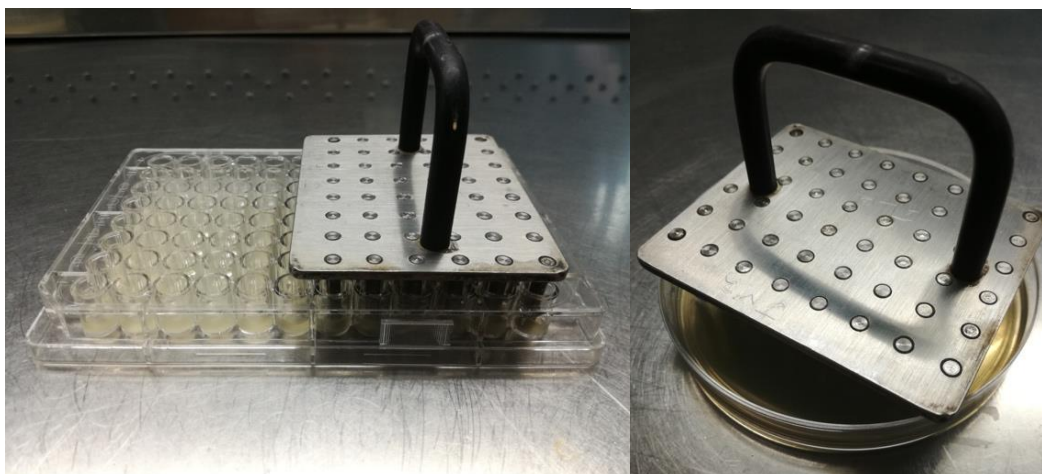


Figura 3. Sellado en placa. Fuente: Cesa, C. 2017.

5.8. Determinación de actividad citotóxica de los PAMs

Para determinar la actividad citotóxica de los PAMs se utilizaron eritrocitos de humano provenientes de un donador sano. Las muestras fueron recolectadas por venopunción y cuantificadas en un hemocitómetro (Kamprol Lab, Puebla, México) obteniendo una concentración celular de 4.4×10^6 células/mL. Los eritrocitos recolectados fueron lavados con buffer PBS 1X pH 7.4 a 5000 rpm durante 5 minutos. Una vez realizado el lavado, se colocaron 195 μ L de la suspensión celular en tubos Eppendorf y se agregaron 5 μ L de las diferentes concentraciones de los PAMs evaluados en los ensayos de CMB. Los tubos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Como control positivo se utilizó el 10 por ciento de Triton X-100 (100% de lisis), y como control negativo, buffer 1X PBS. Después del periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, los sobrenadantes se trasladaron a microplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (BIOTEK®/KC4™) [131]. Las muestras se evaluaron por triplicado y la actividad hemolítica se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A_{\text{péptido}})}{(A_{\text{tritón X-100}})} \times 100$$

Los datos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism versión 6.0. La concentración hemolítica 25 (HC₂₅, por sus siglas en inglés) se determinó por extrapolación lineal y fue considerada como la concentración de PAM que produjera el 25% de hemólisis.

5.9. Ensayos de sinergismo mediante combinación de los PAMs evaluados

5.9.1. Combinaciones de los péptidos antimicrobianos

Para evaluar las interacciones entre los PAMs utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron combinaciones del péptido QnCs-BUAP con los tres PAMs de *U. yaschenkoi*. Las combinaciones fueron las siguientes: Uy234 + QnCs-BUAP, Uy17 + QnCs-BUAP y Uy192 + QnCs-BUAP. Todas las combinaciones de los PAMs se ajustaron a una concentración final de 300 µM. Posteriormente, se determinó la CMB de las 3 combinaciones (**ver apartado 5.7.2**).

Para confirmar la completa inhibición del crecimiento bacteriano se utilizó un replicador metálico de 8 x 6 (Sigma-Aldrich) con el cual se recolectaron las muestras de los pozos y se sellaron en placas de agar LB. La CMB se estimó como la concentración más baja que mostró inhibición total del crecimiento bacteriano. Las combinaciones de los péptidos fueron evaluadas por duplicado.

5.9.2. Determinación de la concentración fraccional inhibitoria (CFI)

Después de evaluar la CMB de los péptidos en combinación (**apartado 5.9.1**), los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo con Almaaytah *et al.*, [132] para la determinación de la concentración fraccional inhibitoria (CFI), utilizando la siguiente fórmula:

$$CFI = \frac{CMB_{A \text{ en presencia de } B}}{CMB_{A \text{ individual}}} + \frac{CMB_{B \text{ en presencia de } A}}{CMB_{B \text{ individual}}}$$

El índice CFI fue interpretado como se indica a continuación: ≤ 0.5 = sinergismo; 0.5-1 = efecto aditivo; 1-4 = indiferencia; > 4 = antagonismo.

5.10. Análisis de la estructura secundaria de los PAMs y espectro de dicroísmo circular (CD)

La estructura secundaria de los cuatro PAMs se predijo utilizando el programa en línea NetWheels: *Peptides Helical Wheel and Net Projections Maker* (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>). Posteriormente, las estructuras secundarias se confirmaron mediante el análisis por dicroísmo circular (CD) en colaboración con el Instituto de Biotecnología-UNAM. Para ello, las soluciones de los PAMs se prepararon en una concentración de 500-730 μM como se indica a continuación: los péptidos Uy234 y Uy17 se disolvieron en agua; y los péptidos Uy192 y QnCs-BUAP se disolvieron en acetonitrilo: H_2O (1:4). Las soluciones se filtraron a través de filtros de nylon de 0.22 μm .

Los espectros de CD de UV lejano se registraron de 190 a 260 nm utilizando un espectropolarímetro Jasco J-715 CD (instrumentos analíticos JASCO), equipado con un soporte de celdas de temperatura controlada Peltier (PTC-4235, JASCO); utilizando una celda de cuarzo de trayectoria óptica de 0.1 cm. Para reducir el ruido en los resultados se promediaron tres espectros independientes. Los espectros fueron obtenidos cada 1 nm con un tiempo promedio de ocho segundos por punto y paso de banda de 1 nm. La estructura secundaria se estimó a partir de los espectros de CD utilizando el servidor dichroweb y el algoritmo CDSSTR con los datos de referencia [133].

6. RESULTADOS

6.1. La identificación molecular de la cepa antagonista permitió asignarla como *Pseudomonas protegens* EMM-1

El género bacteriano de la cepa EMM-1 se identificó amplificando el gen *rrs* (ADNr 16S). La secuencia de ADNr 16S obtenida (No. De acceso en GenBank: MN959751.1) tuvo una longitud de 1337 pb (**ver anexo 2**). El análisis comparativo utilizando BlastN [134] con secuencias completas de ADNr 16S de NCBI, sugirió que la cepa EMM-1 está estrechamente relacionada con otras especies del género *Pseudomonas*. La secuencia más relacionada fue de *Pseudomonas protegens* CHA0 con 99.77% de identidad. Las secuencias de ADNr 16S de 26 cepas pertenecientes al grupo *Pseudomonas fluorescens* se seleccionaron para la elaboración de un árbol filogenético (**Fig. 4**).

Después de realizar el árbol filogenético, la cepa EMM-1 se agrupó dentro de cepas de *Pseudomonas protegens* con una cercanía filogenética del 100%.

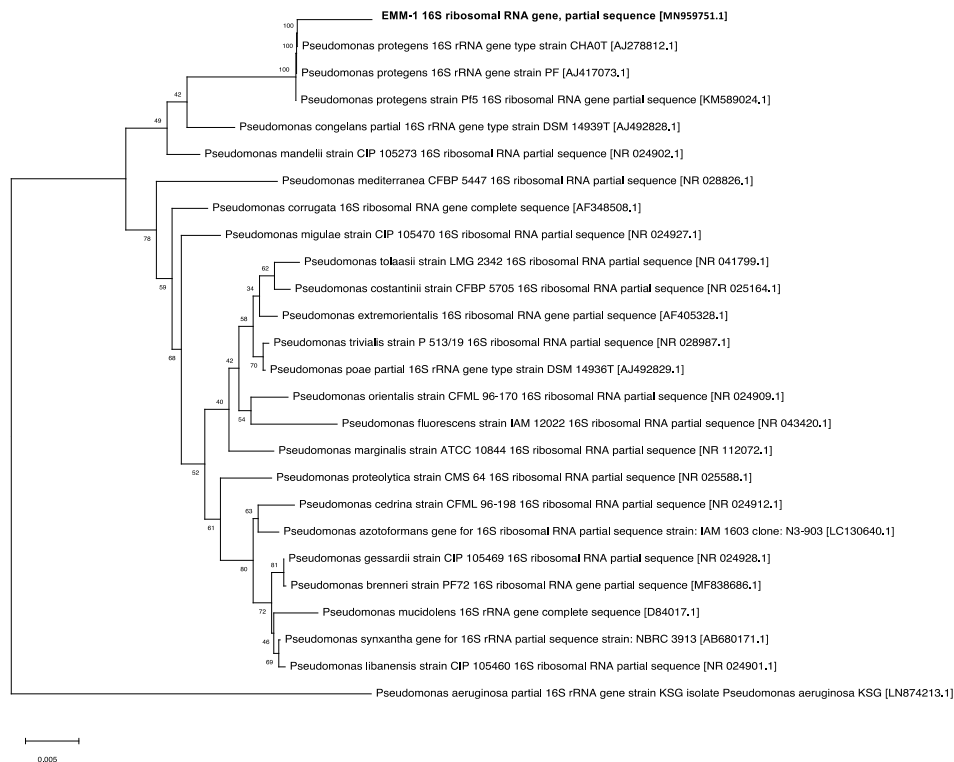


Figura 4. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen *rrs* (ADNr 16S). El árbol se diseñó a partir de secuencias del gen *rrs* (ADNr 16S) del grupo

Pseudomonas fluorescens. Los números de acceso se muestran entre corchetes. La secuencia del ADNr 16S de *Pseudomonas aeruginosa* KSG se usó como raíz. La barra de escala indica una distancia filogenética de 0.005 sustituciones de nt por sitio.

Debido a que la evaluación de las secuencias de ADNr 16S no tiene resolución a nivel de especie [135], se amplificaron cuatro genes altamente conservados en especies del género *Pseudomonas*: *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, y *phlD*, para obtener una identificación molecular más precisa de la cepa EMM-1 a nivel de especie (**Fig. 5**).

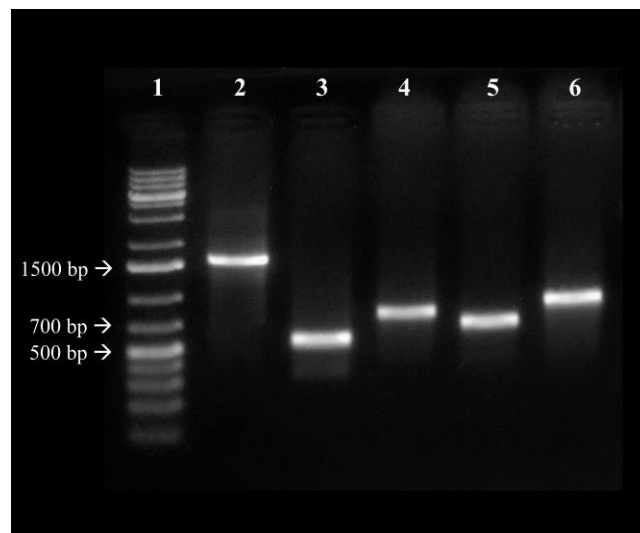


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del DNA genómico de la cepa EMM-1. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 kb (*Thermo Scientific™*); carril 2, *rrs*; carril 3, *rpoB*; carril 4, *rpoD*; carril 5, *gyrB*; carril 6, *phlD*.

Las longitudes de las secuencias obtenidas fueron 381 pb (*rpoB*), 631 pb (*rpoD*) y 470 pb (*gyrB*). El análisis de homología realizado mediante el uso del software BLAST dio como resultado más del 94% de identidad principalmente con cepas de la especie *Pseudomonas protegens* como se indica a continuación:

- Para el análisis de *rpoB*, encontramos las identidades más altas con *Pseudomonas* sp. MP12 (95.43%) y *Pseudomonas protegens* UCT (95.20%). Asimismo, se reportó una identidad del 95.16% con *Pseudomonas protegens*

pf5-k3, *Pseudomonas protegens* FDAARGOS_307 y *Pseudomonas protegens*14B2.

- Para el análisis de *rpoD*, el análisis resultó en más del 99% de identidad con las siguientes cepas: *Pseudomonas* sp. JV391_D9 (99.83%), cepa BR3c de *Pseudomonas protegens* (99.68%), *Pseudomonas* sp. RW09-C30 (99.66%), *Pseudomonas* sp. Irchel 2B15 (99.52%) y *Pseudomonas* sp. S3Bt35 (99.51%).
- El análisis de *gyrB* mostró una identidad del 99-100% con las cepas *Pseudomonas fluorescens* PGNL1 (100.0%), *Pseudomonas protegens* 1B1 (99.58%), *Pseudomonas protegens* H78 (99.58%), *Pseudomonas protegens* UCT (99.58%) y *Pseudomonas protegens* Pf2 (99.58%).

Se ha reportado que *phlD* es un gen altamente conservado en cepas de *Pseudomonas protegens* [136], por lo que amplificamos este gen para complementar la identificación a nivel de especie de la cepa EMM-1. La secuencia obtenida (681 pb) mostró 99.41% de identidad para *Pseudomonas protegens* Cab57, y 98.97% para *Pseudomonas protegens* pf5-k2, *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas protegens* FDAARGOS_307 y *Pseudomonas protegens* H78. Adicionalmente, EMM-1 fue positiva para la amplificación del cluster de genes biosintéticos de pioluteorina (**Fig. 6**) con una identidad > 99% con cepas de *Pseudomonas protegens* después del análisis de secuencia.

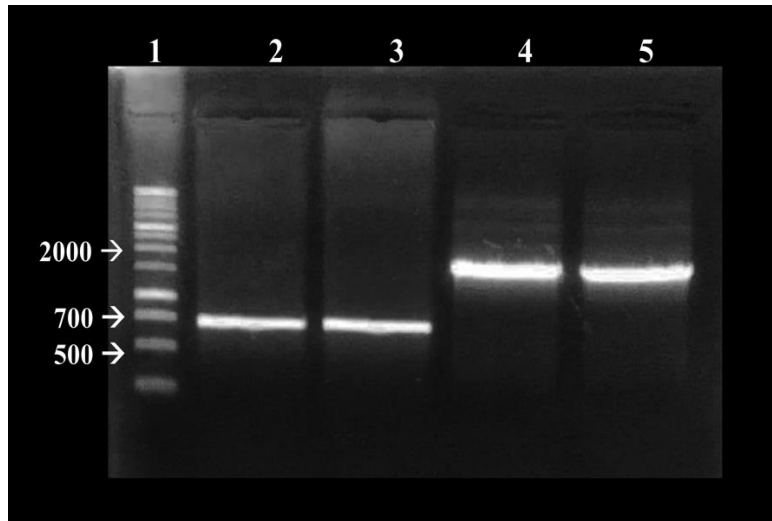


Figura 6. Amplificación de genes relacionados con la producción de antibióticos en especies de *P. protegens* mediante PCR, utilizando ADN genómico de la cepa EMM-1. Carril 1: marcador molecular de ADN de 1 kb (Thermo Scientific™); 2-3: gen *phlD*; 4-5: cluster de genes biosintéticos de pioluteorina (Plt).

En la actualidad, la mayoría de los taxónomos aceptan un porcentaje de identidad de secuencias de 97% a 99% para clasificar un microorganismo por género y especie. Además, para la identificación a nivel de especie es aceptada la amplificación de al menos dos genes de mantenimiento (como *rpoB*, *rpoD* y *gyrB*) [137]. Por lo que nuestros datos proporcionan evidencia suficiente para designar a la cepa EMM-1 como *Pseudomonas protegens* EMM-1.

6.2. Efecto antagónico de *Pseudomonas protegens* EMM-1 contra bacterias y hongos

Los ensayos de antagonismo se realizaron por la metodología de agar en doble capa, utilizando como microorganismo productor a *P. protegens* EMM-1. Los resultados mostraron que todas las bacterias evaluadas fueron sensibles a la actividad antagónica de *P. protegens* EMM-1. Los mayores halos de inhibición se observaron contra las cepas de *Streptococcus* sp. (cepas SP10 y ST9) y *Burkholderia silvatlantica*, con diámetros de 54 ± 3.00 mm y 49 ± 2.00 mm, respectivamente. Los hongos evaluados que fueron sensibles en los ensayos de antagonismo fueron *Botrytis* sp. con halos de inhibición de

38.8 ± 2.93 mm, y *Aspergillus* sp., con halos de inhibición de 39 mm (Fig. 7 y 8). *Rhizopus* sp. fue considerada resistente al no observarse halos de inhibición en las placas.

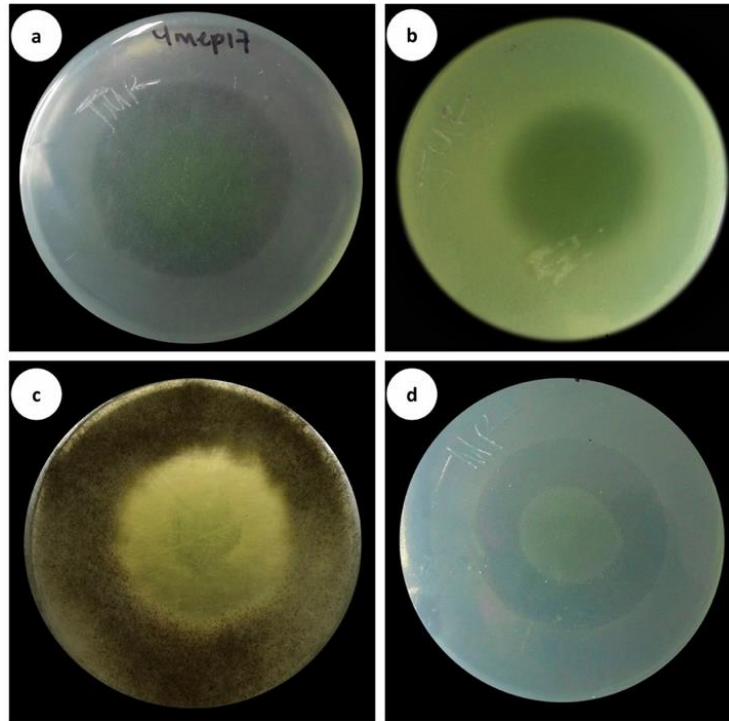


Figura 7. Halos de inhibición presentados en la metodología de agar en doble capa por la cepa antagónica *P. protegens* EMM-1. (a) control positivo, antagonismo de *Microbacterium* sp. UAPS01-201; (b) *Klebsiella* sp. KP8; (c) *Aspergillus* sp.; (d) *Streptococcus* sp. SP10. Fuente: Cesa, C. 2016.

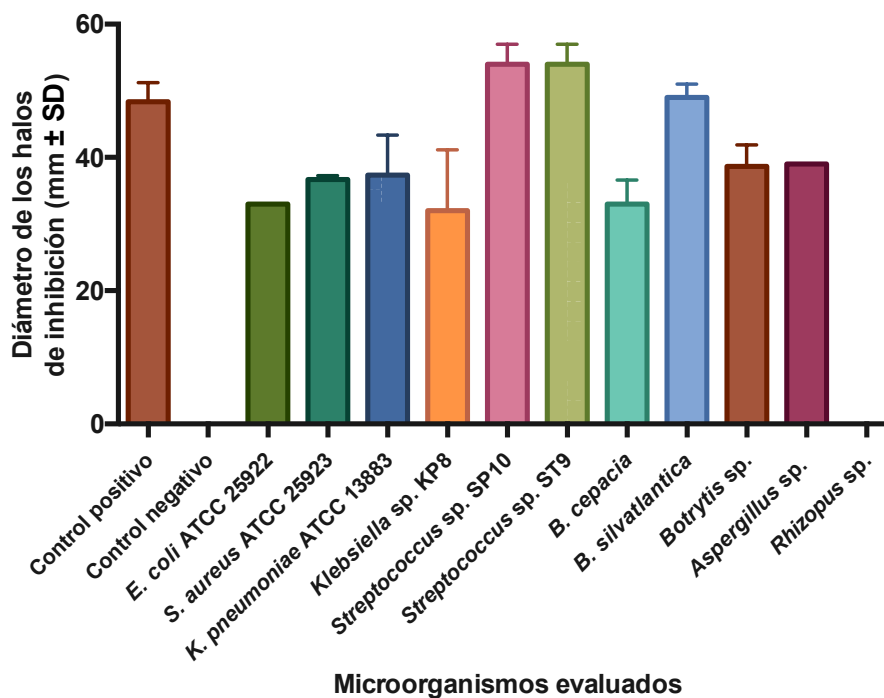


Figura 8. Halos de inhibición presentados en la metodología de agar en doble capa por la cepa antagonista *P. protegens* EMM-1. Los valores representan el promedio de tres ensayos independientes. El gráfico fue elaborado utilizando el programa GraphPad Prism Versión 6.0.

6.3. El extracto crudo de *Pseudomonas protegens* EMM-1 presenta actividad antimicrobiana contra *Streptococcus*

El extracto obtenido mediante lixiviación en frío fue evaluado por la metodología de difusión en pozos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como tres hongos fitopatógenos que no habían sido evaluados en estudios anteriores. Los resultados confirmaron que el extracto sigue siendo activo únicamente contra las cepas de *Streptococcus* sp. SP10 y la cepa *Microbacterium* sp. UAPS01-201 (**Tabla 5**); cabe destacar que la actividad inhibitoria es mayor contra *Streptococcus* (640 UA/mL).

No se observaron halos de inhibición contra los hongos evaluados, por lo que se descartó la presencia de sustancias antifúngicas en el extracto.

Tabla 5. Actividad inhibitoria de diferentes diluciones del extracto crudo obtenido de *Pseudomonas protegens* EMM-1.

Microorganismo	Extracto concentrado	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1. <i>Microbacterium</i> sp. UAPS01-201	S	R	R	R	R	R	R	R
2. <i>Streptococcus</i> sp. SP10	S	S	S	S	S	S	S	R
3. <i>Streptococcus</i> sp. ST9	S	S	S	S	S	S	S	R
4. <i>E. coli</i> ATCC 25922	R	R	R	R	R	R	R	R
5. <i>S. aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	R	R	R	R	R
6. <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	R	R	R	R	R	R	R	R
7. <i>Klebsiella</i> sp. KP8	R	R	R	R	R	R	R	R
8. <i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
9. <i>B. silvatlantica</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
10. <i>Rhizopus</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
11. <i>Botrytis</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
12. <i>Aspergillus</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R

S: sensible; R: resistente

6.4. *Pseudomonas protegens* EMM-1 produce sustancias inhibitorias en medio líquido en condiciones de aireación limitada

Anteriormente se había reportado que *P. protegens* EMM-1 no producía sustancias inhibitorias en medio líquido. Por lo que se planteó la posibilidad de que la presencia de oxígeno afectase la producción de sustancias inhibitorias o que fuera requerida la presencia de un inductor de Acil-Homoserin-Lactona (AHL) que emulara una señal de “*quorum sensing*” que indujera la actividad inhibitoria independientemente de la concentración celular o fase de crecimiento.

De acuerdo con los resultados, consideramos que la presencia del inductor de AHL no favorece el aumento en la producción de sustancias inhibitorias (ni a las 24 h ni a las 48 h de incubación), pues no se observa actividad inhibitoria cuando se eleva la velocidad de agitación. Interesantemente, la actividad inhibitoria se logró con una velocidad de agitación de 50 rpm, independientemente de la presencia o ausencia de AHL (**Tabla 6, Fig. 9 y 10**). Se puede inferir que una menor agitación limite la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, favoreciendo la producción de sustancias inhibitorias para este modelo bacteriano.

Tabla 6. Evaluación de la actividad inhibitoria en medio líquido, en presencia y ausencia de un inductor de acil-homoserin-lactona (AHL) y diferentes condiciones de aireación.

Adición de inductor (AHL)	Tiempo de incubación (horas)	UFC/mL	Densidad óptica (620 nm)	Actividad inhibitoria	Halo de inhibición (mm ± SD)
Matraces en agitación a 180 rpm					
Sí	24	5x10 ⁹	4.23	Ausente	-
No	24	1.8x10 ⁹	5.19	Ausente	-
Sí	48	2.5x10 ⁹	6.89	Ausente	-
No	48	2.5x10 ⁹	6.38	Ausente	-
Matraces en agitación a 50 rpm					
Sí	24	2x10 ⁹	5.38	Presente	20 ± 0.70
No	24	5x10 ⁹	5.99	Presente	19 ± 0.70
Sí	48	2x10 ⁹	4.83	Presente	20
No	48	1.8x10 ⁹	7.62	Presente	22 ± 0.70

* Los valores de los halos de inhibición representan el promedio de dos ensayos independientes.

* En todos los tratamientos se evaluaron 100 µL de sobrenadante, mediante la metodología de difusión en pozos.



Figura 9. Actividad inhibitoria del sobrenadante de *P. protegens* EMM-1 en condiciones de baja aireación (50 rpm). (a) 24 horas de incubación; (b) 48 horas de incubación. Pozo izquierdo: con inductor; pozo derecho: sin inductor. Fuente: Cesa, C. 2018.

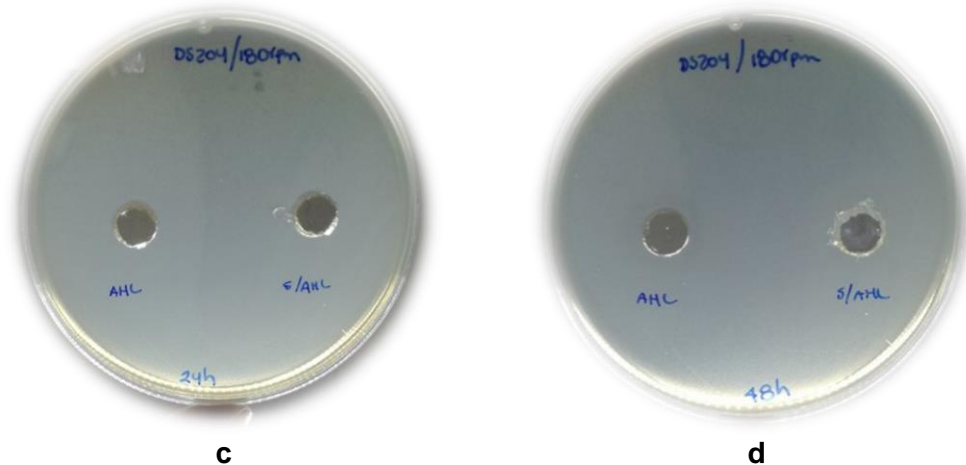


Figura 10. Evaluación del sobrenadante de *P. protegens* EMM-1 en condiciones de alta aireación, sin presencia de actividad inhibitoria (180 rpm). (a) 24 horas de incubación; (b) 48 horas de incubación. Pozo izquierdo: con inductor; pozo derecho: sin inductor. Fuente: Cesa, C. 2018.

6.5. *Pseudomonas protegens* EMM-1 contiene un gen que codifica para la bacteriocina LlpA

Las bacteriocinas LlpA son producidas por especies de *P. protegens* y se caracterizan por tener un dominio de unión a manosa, similar a las lectinas que producen algunas plantas monocotiledóneas como mecanismo de defensa contra microorganismos.

Con la finalidad de evaluar la presencia del gen que codifica para LlpA (*llpA*) en el genoma de *P. protegens* EMM-1, se realizó la amplificación por PCR y el producto amplificado fue clonado en el vector pJET1.2/blunt. La construcción obtenida fue denominada pJET1.2blunt-llpArs (**Fig. 11**) y fue secuenciada por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

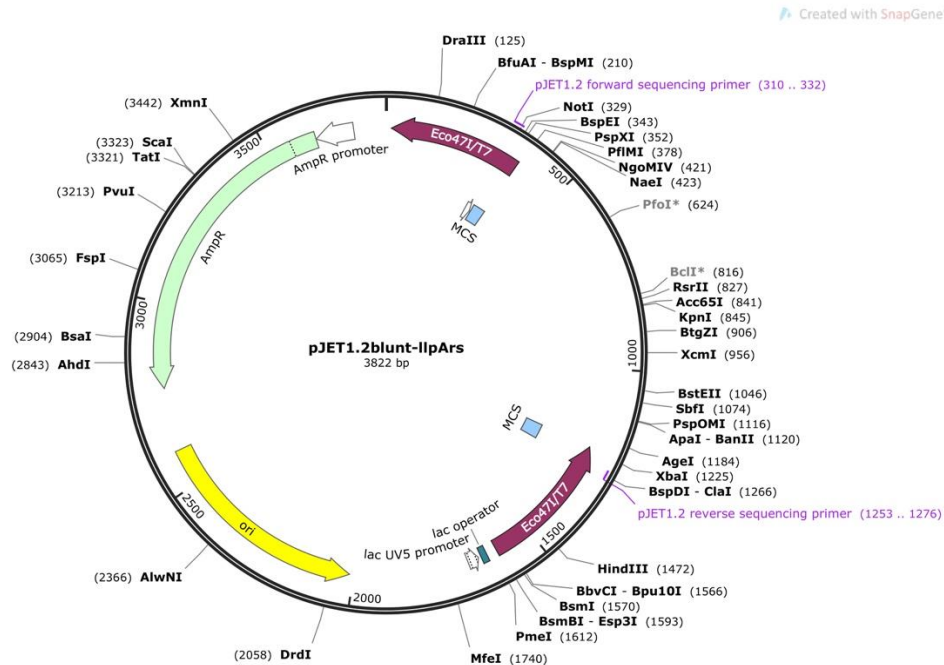


Figura 11. Mapa de la construcción pJET1.2blunt-llpArs obtenido con el programa SnapGene versión 4.3.11.

La secuencia del gen clonado en el vector pJET1.2/blunt tuvo un tamaño de 848 pb y el análisis de esta secuencia realizado con BLAST reportó más del 99% de identidad con secuencias del gen *llpA* de *P. protegens*.

Se ha reportado que el tamaño de la bacteriocina llpA es cercano a los 30 kDa. Este dato es muy interesante pues hasta la fecha solo se habían reportado sustancias inhibitorias de tamaños entre 3 y 10 kDa en *P. protegens* EMM-1, por lo que la construcción diseñada en este estudio (pJET1.2blunt-llpA) podría utilizarse como referencia para futuras investigaciones, por ejemplo, en la subclonación y expresión de la proteína recombinante para su posterior caracterización.

6.6. Los péptidos antimicrobianos del veneno del alacrán *Urodacus yaschenko* tienen actividad antibacteriana de amplio espectro

Para la evaluación de los PAMs se determinó la CMB (**ver apartado 5.7.2**) de los péptidos Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP. Después de incubar las placas por 18

horas, se formaron colonias resistentes y no hubo crecimiento de las colonias sensibles, lo que confirmó la CMB del PAM a la concentración micromolar correspondiente (**Fig. 12**).

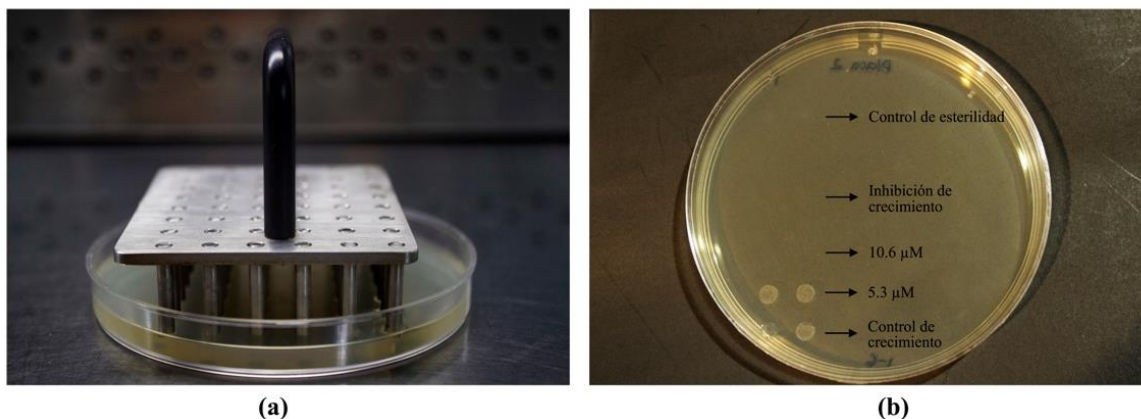


Figura 12. Representación del ensayo de actividad antimicrobiana, evaluando el péptido Uy192.

(a) Sellado de las muestras en placa de agar LB; (b) Crecimiento de colonias de *Streptococcus* sp. SP10 después del periodo de incubación. Se observa actividad bactericida en la concentración 10.6 µM, y resistencia a la concentración más baja evaluada (5.3 µM). Fuente: Cesa-Luna, *et al.*, 2019.

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Paraburkholderia silvatlantica*, *Streptococcus* sp. SP10, y *Streptococcus* sp. ST9 fueron las cepas más sensibles al tratamiento con Uy234, Uy17 y Uy192. El péptido Uy234 mostró la mayor actividad inhibitoria contra *Streptococcus* sp. SP10 y *Streptococcus* sp. ST9 (aislados clínicos), con CMB de 2.9 µM y 5.9 µM, respectivamente. El péptido diseñado, QnCs-BUAP, mostró la menor actividad antimicrobiana, y *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883, *Burkholderia cepacia* y *Klebsiella* sp. KP8 (aislado clínico) fueron resistentes a la concentración más alta evaluada (353.1 µM); sin embargo, QnCs-BUAP mostró gran actividad inhibitoria contra los aislados clínicos MDR de *Streptococcus*. *Burkholderia cepacia* fue resistente a los 4 péptidos evaluados (**Tabla 7**).

Tabla 7. Concentración mínima bactericida de los péptidos antimicrobianos.

Cepas bacterianas	CMB ^a ± SD (µM)			
	Uy234	Uy17	Uy192	QnCs-BUAP
1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	190	186.2	> 339.3	> 353.1
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	29.6 ± 25	23.2	42.4	> 353.1
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	190	372.5	169.6	> 353.1
4. <i>Klebsiella</i> sp. KP8 (aislado clínico)	190	186.2	> 339.3	> 353.1
5. <i>Burkholderia cepacia</i>	> 380	> 372.5	> 339.3	> 353.1
6. <i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	95	23.2	10.6	353.1
7. <i>Streptococcus</i> sp. SP10 (aislado clínico)	2.9	23.2	10.6	33.1 ± 16
8. <i>Streptococcus</i> sp. ST9 (aislado clínico)	5.9	11.6	15.9 ± 7	88.2

^a Los valores de CMB representan el promedio de dos ensayos independientes. La desviación estándar (SD) solo se muestra en los ensayos que mostraron CMB diferente en cada réplica.

6.7. Las combinaciones de los péptidos antimicrobianos presentan mayor actividad antimicrobiana que de manera independiente

Para evaluar las interacciones entre los PAMs utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana, se combinó el péptido QnCs-BUAP con los péptidos Uy234, Uy17 y Uy192, y se evaluó su sinergia antimicrobiana. Cuando se combinaron los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP incrementó la actividad bactericida, lo que sugiere un efecto sinérgico o aditivo. A su vez, esta mezcla de péptidos mostró actividad antimicrobiana contra *Burkholderia cepacia*, que era resistente a la exposición de los péptidos de forma independiente (Tabla 8).

Tabla 8. CMB para las combinaciones de los péptidos antimicrobianos.

Cepas bacterianas	CMB ^a ± SD (µM)		
	Uy234 + QnCs-BUAP	Uy17 + QnCs-BUAP	Uy192 + QnCs-BUAP
1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	75	300	300
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37.5	150	300
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	150	300	300
4. <i>Klebsiella</i> sp. KP8 (aislado clínico)	150	300	300
5. <i>Burkholderia cepacia</i>	150	> 300	300
6. <i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	28.12 ± 13.26	37.5	14.06 ± 6.63
7. <i>Streptococcus</i> sp. SP10 (aislado clínico)	2.34	9.37	7.025 ± 3.32

8. *Streptococcus* sp. ST9 (aislado clínico)

2.34

9.37

3.51 ± 1.65

^a Los valores de CMB representan el promedio de dos ensayos independientes. La desviación estándar (SD) solo se muestra en los ensayos que mostraron CMB diferente en cada réplica.

La CMB requerida para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Paraburkholderia silvatlantica* y *Streptococcus* sp. ST9 disminuyó más de 2 veces en comparación con lo observado para los péptidos Uy234, Uy17 y Uy192 de manera independiente, con valores que variaron de 2.34 µM a 75 µM. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, no hubo diferencias significativas entre la combinación y los tratamientos individuales.

La mezcla de los péptidos Uy17 y QnCs-BUAP mostró una fuerte actividad bactericida contra *Streptococcus* sp. SP10, con un CMB de 9.37 µM, mientras que *Burkholderia cepacia* se mantuvo resistente (**Tabla 8**).

La actividad sinérgica de Uy192 y QnCs-BUAP fue notable, ya que QnCs-BUAP de manera independiente era incapaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella* sp. KP8 (aislado clínico) y *Burkholderia cepacia* (Tabla CMB). Además, gracias a esta combinación la actividad bactericida aumentó más de 4 veces contra *Paraburkholderia silvatlantica*, *Streptococcus* sp. SP10, y *Streptococcus* sp. ST9 (**Tabla 8**) comparado con la actividad del péptido de forma individual (**Tabla 7**).

Para describir con más detalle el comportamiento sinérgico de las combinaciones de los péptidos, se calculó el índice de CFI. La interpretación de los resultados se proporciona en la **Tabla 9**. Tal como lo sugieren los resultados descritos anteriormente, las combinaciones de los péptidos con QnCs-BUAP mostraron efectos sinérgicos o aditivos contra todas las bacterias analizadas, excepto para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, los resultados mostraron efectos indiferentes o antagónicos, a pesar de que esta cepa era resistente al péptido QnCs-BUAP.

Un resultado significativo de este ensayo fue el efecto sinérgico de las tres combinaciones de péptidos contra *Burkholderia cepacia*, incluso cuando esta cepa había sido resistente a los péptidos evaluados de manera independiente (**Tabla 7**).

Tabla 9. Índices de concentración fraccional inhibitoria para las combinaciones de los PAMs.

Cepa bacteriana	Índice FIC			Interpretación		
	Uy234 + QnCs- BUAP	Uy17 + QnCs- BUAP	Uy192 + QnCs- BUAP	Uy234 + QnCs- BUAP	Uy17 + QnCs- BUAP	Uy192 + QnCs- BUAP
1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.39	1.61	1	S	I	Ad
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.27	6.47	9.08	I	A	A
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	0.79	0.81	2.77	Ad	Ad	I
4. <i>Klebsiella</i> sp. KP8 (aislado clínico)	0.79	1.61	1	Ad	I	Ad
5. <i>Burkholderia cepacia</i>	0	0	0	S	S	S
6. <i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	0.38	1.72	1.70	S	I	I
7. <i>Streptococcus</i> sp. SP10 (aislado clínico).	0.88	0.69	1.41	Ad	Ad	I
8. <i>Streptococcus</i> sp. ST9 (aislado clínico).	0.42	0.91	0.60	S	Ad	Ad

S: Sinergismo, Ad: Aditividad, I: Indiferencia, A: Antagonismo

6.8. Los PAMs Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP presentan baja actividad citotóxica contra eritrocitos humanos

La actividad hemolítica se evaluó mediante la coincubación de eritrocitos humanos con cada péptido a diferentes concentraciones (**ver apartado 5.8**). Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores experimentales se normalizaron con los resultados para el buffer PBS 1X (hemólisis al 0%) y Triton X-100 al 10% (hemólisis al 100%).

Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP fueron los péptidos menos hemolíticos (actividad inferior al 6%), incluso en las concentraciones más altas analizadas, mientras que el péptido Uy234 mostró un 26.18% de actividad hemolítica a la concentración más alta evaluada (380 µM) (**Fig. 13**).

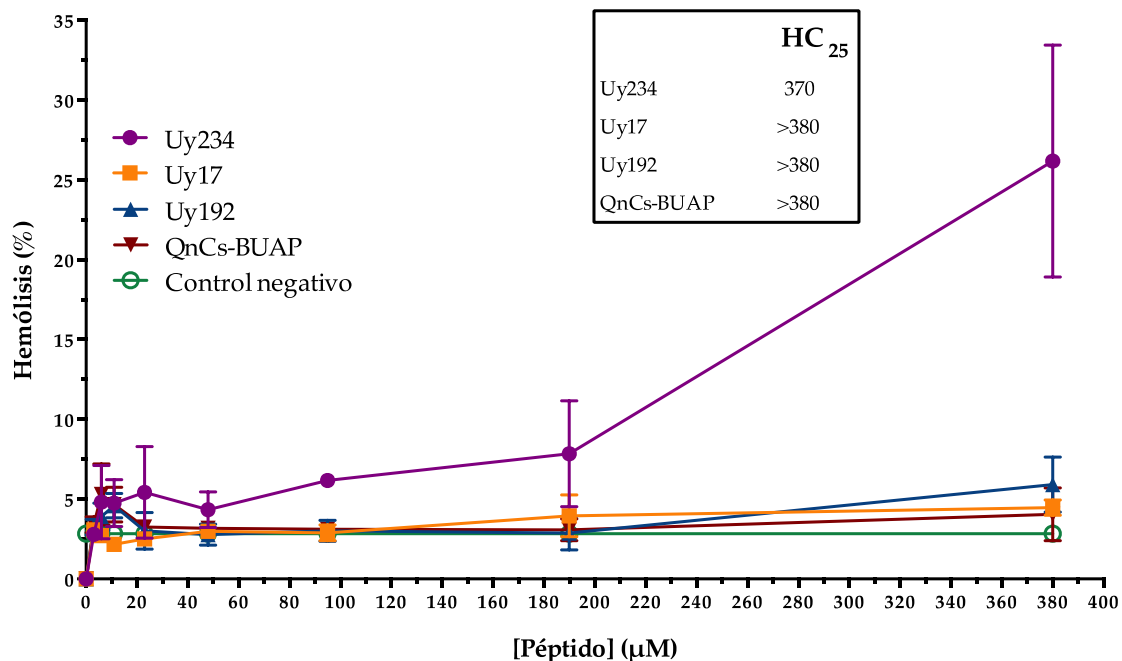


Figura 13. Actividad hemolítica de los cuatro péptidos antimicrobianos. El análisis se realizó utilizando GraphPad Prism versión 6.0. La concentración hemolítica (HC₂₅) obtenida para cada péptido se indica en el recuadro dentro de la figura.

6.9. Confirmación de la estructura secundaria de los PAMs Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP

La estructura secundaria se predijo mediante el programa en línea NetWheels: *Peptides Helical Wheel and Net Projections* (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) en donde se indicó que todos los péptidos eran compatibles con una α -hélice típica con una cara hidrofílica e hidrofóbica (**Fig. 14**) lo cual fue confirmado con los ensayos de dicroísmo circular (**Tabla 10; Fig. 16**).

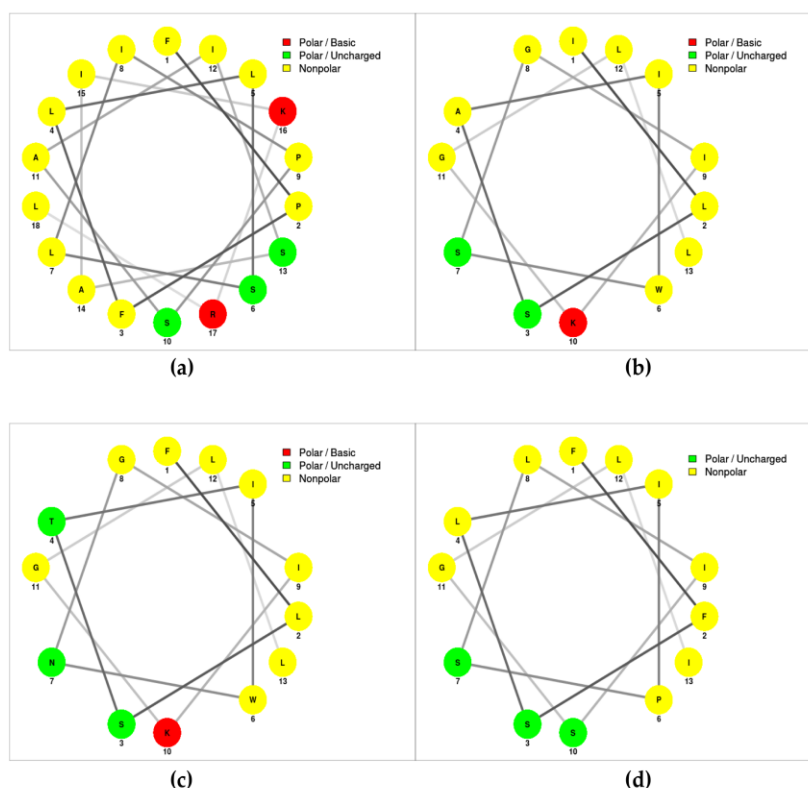


Figura 14. Representación de la rueda helicoidal y proyecciones de red de los cuatro péptidos analizados. a) péptido Uy234: FPFLSLIPSAISAIKRL; b) péptido Uy17: ILSAIWSGIKGLL; c) péptido Uy192: FLSTIWNIGIKGLL; y d) péptido QnCs-BUAP: FFSLIPSLISGLI.

Los espectros de CD mostraron que los péptidos estaban principalmente desordenados; además, los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP mostraron una señal más alta a aproximadamente 220 nm, indicativa de alguna formación de estructura tipo α -hélice. La información de la estructura secundaria fue estimada a partir de los espectros de CD con el programa CDSTTR del servidor Dichroweb [138] (**Tabla 10**).

Tabla 10. Estimación de los elementos de la estructura secundaria de los PAMs utilizados en este trabajo.

%	Hélice 1	Hélice 2	Hebra 1	Hebra 2	Giros	Desorden	Total
1. Uy234	0.05	0.1	0.21	0.1	0.26	0.27	0.99
2. Uy17	0.03	0.08	0.3	0.1	0.19	0.29	0.99
3. Uy192	0.02	0.1	0.25	0.11	0.23	0.28	0.99
4. QnCs-BUAP	0.04	0.07	0.23	0.11	0.25	0.31	1.01
5. Uy192 (dilución)	0.02	0.09	0.2	0.11	0.26	0.32	1

Tal como lo sugieren las proyecciones helicoidales, los péptidos tienen el potencial de formar hélices anfipáticas, con mayor porcentaje de hélice 1 en los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP y mayor porcentaje de hélice 2 en los péptidos Uy234 y Uy192 (**Tabla 10**). La cara hidrofóbica de estas hélices debería estabilizarse para evitar la agregación, lo cual se puede lograr mediante la dimerización y la formación de una especie de bobina. Decidimos diluir uno de estos péptidos (Uy192) de 684 μM a 228 μM y se observó que el pico mínimo observado para este péptido se movió de 208 nm a 198 nm (**Fig. 15**), lo que indica un cambio conformacional dependiente de concentración. Todas las estructuras fueron confirmadas por el análisis de CD que se muestra en la **figura 16**.

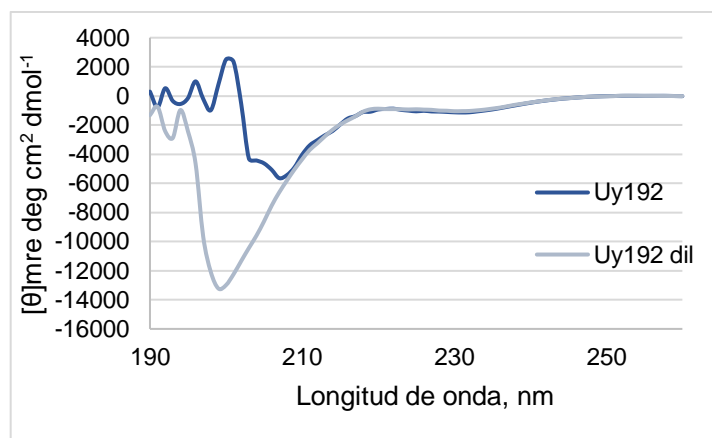


Figura 15. Espectros de CD de UV lejano del péptido Uy192 diluido. Péptido Uy192 a 684 μM (azul oscuro) y a 228 μM (azul claro).

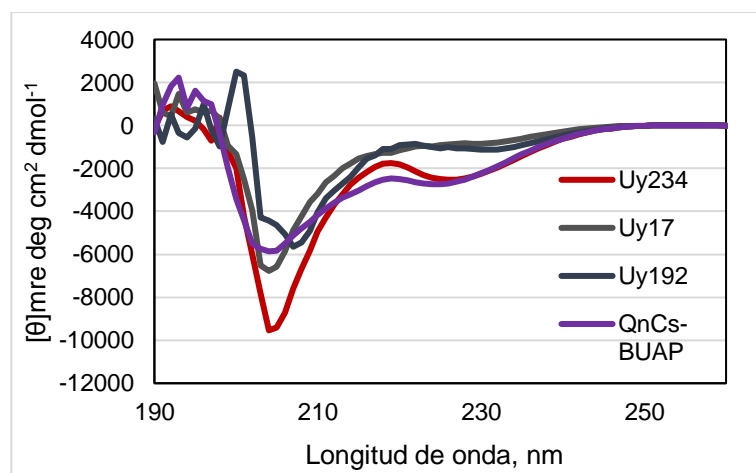


Figura 16. Espectros de CD de UV lejano de los cuatro PAMs. Los péptidos se analizaron a concentraciones que varían entre 500 y 730 μM .

7. DISCUSIÓN

El incremento de cepas multidrogo-resistentes (MDR) representa un importante problema de salud pública a nivel mundial [139]; por esta razón, la investigación global se centra en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Los venenos de alacrán representan una inmensa fuente de péptidos bioactivos, incluidas toxinas que afectan a canales de sodio de mamíferos e insectos, y péptidos antimicrobianos [103,140,141]. Sin embargo, solo algunos péptidos de alacrán con actividad antimicrobiana han sido caracterizados y evaluados contra cepas bacterianas MDR [74,79,142,143]. Entre los péptidos de alacrán de tipo NDBPs con actividad antimicrobiana se incluyen péptidos como opistoporina, pandinina o los de tipo IsCT [82,86,92]. *Urodacus yaschenkoi* es un alacrán australiano que recientemente fue caracterizado y contiene un arsenal de biomoléculas con diversas funciones, incluidos los PAMs. Estudios previos han informado que tres de estos péptidos (UyCT1, UyCT3 y UyCT5) han sido eficaces en la inhibición de un amplio espectro de bacterias [144], incluidos patógenos MDR como *Acinetobacter baumannii* [89], y además se ha demostrado que estos péptidos requieren amidación de su residuo C-terminal para ser activos. En este trabajo, se evaluó la estructura, la actividad hemolítica y bactericida de cuatro PAMs sintéticos de *U. yaschenkoi*: Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP (que es un péptido consenso completamente nuevo). Todos los péptidos en este estudio se amidaron en el residuo C-terminal para mejorar su solubilidad y potenciar su actividad [145].

Para determinar la actividad antimicrobiana, se determinó la CMB de cada péptido contra aislados clínicos, dos aislados de caña de azúcar y tres cepas de referencia (ATCC). Los aislados clínicos incluyeron cepas de *Klebsiella* y *Streptococcus* beta-hemolíticos, que se obtuvieron a partir de exudados faríngeos de pacientes con diversas enfermedades en vías respiratorias y que además son MDR (*Klebsiella* sp. KP8 es resistente a eritromicina, ampicilina, penicilina, dicloxacilina y gentamicina; mientras que las cepas de *Streptococcus* sp. son resistentes a ampicilina, netilmicina, enoxacina, penicilina, dicloxacilina, amikacina y gentamicina) [107].

Adicionalmente, el crecimiento bacteriano de cada cepa se cuantificó mediante el método de "goteo en placa por sellado masivo" [129], ajustando la concentración de

células bacterianas a 10^5 - 10^6 UFC/mL y, para confirmar la actividad bactericida (comúnmente determinada por absorbancia), se realizó un sellado en placa que garantizara la ausencia de crecimiento de las bacterias sensibles.

En contraste con la mayoría de estudios de PAMs de alacrán en los que la CMI es el único parámetro determinado [87,94,103,142,146–148], en este trabajo se determinó la estructura, la actividad hemolítica y bactericida de los cuatro PAMs. Los resultados de la CMB (**Tabla 7**) indican que el péptido Uy234 es el más efectivo, al mostrar la CMB más baja. *Streptococcus* sp. SP10 y *Streptococcus* sp. ST9 fueron las cepas más sensibles con CMB de 2.9 μ M y 5.9 μ M, respectivamente. Las cepas restantes también fueron sensibles, pero a concentraciones más altas del péptido. *Burkholderia cepacia* es la única cepa resistente al péptido Uy234, incluso a la concentración más alta evaluada (380 μ M).

El péptido Uy17 también es eficaz en la inhibición de *Streptococcus* sp. SP10 y *Streptococcus* sp. ST9 a bajas concentraciones (23.2 μ M y 11.6 μ M, respectivamente); además, es el único péptido capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentraciones micromolares bajas (23.2 μ M). La cepa Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 fue sensible solo a la concentración más alta de Uy17 evaluada (372.5 μ M). Por otro lado, el péptido Uy192 mostró una baja CMB para *Streptococcus* sp. SP10 (**Fig. 12**) y *Streptococcus* sp. ST9 (10.6 μ M y 15.9 μ M, respectivamente) siendo el más efectivo para inhibir a *Paraburkholderia silvatlantica*, con una CMB de 10.6 μ M.

Pocos estudios han revelado la eficacia de los PAMs de alacrán diseñados a partir de secuencias consenso de aminoácidos altamente conservados, lo que representa una estrategia muy interesante para aumentar la actividad antimicrobiana. Entre estas secuencias se encuentra el consenso Pepcon, que tiene actividad antimicrobiana de amplio espectro a concentraciones micromolares muy bajas contra cepas MDR como *Acinetobacter baumannii* (20 μ M) y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (5 μ M) [149]. En este estudio, el péptido consenso QnCs-BUAP (**Fig. 1**), es capaz de inhibir completamente el crecimiento de *Streptococcus* sp. SP10 (33.1 μ M) y *Streptococcus* sp. ST9 (88.2 μ M).

Por otra parte, las cepas de *Klebsiella* (ATCC 13883 y el aislado clínico) fueron resistentes incluso a las concentraciones más altas que se probaron para los péptidos

Uy192 y QnCs-BUAP (339.3 μM y 353.1 μM , respectivamente). Este resultado probablemente se deba a la presencia de cápsula y la producción de exopolisacárido, que con frecuencia son responsables de la resistencia a diversos antimicrobianos [150]. Además, la presencia de lipopolisacáridos ricos en "lípidos altamente ácidos" en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas podría influir en la carga negativa de la membrana, interfiriendo en la unión electrostática de los PAMs a la superficie celular [149].

Burkholderia cepacia, que es un patógeno oportunista inusual que amenaza a pacientes inmunocomprometidos [151,152], fue resistente a todos los péptidos cuando se evaluaron individualmente, incluso a las concentraciones más altas evaluadas. No obstante, la combinación de QnCs-BUAP con los péptidos Uy234 y Uy192 mostró una actividad prometedora contra *Burkholderia cepacia*, con CMBs de 150 μM y 300 μM , respectivamente. La efectividad de diversas combinaciones de péptidos antimicrobianos ha sido reportada, y se han propuesto diferentes ventajas de su uso, como son el uso de dosis más bajas, disminución de costos y prevención del desarrollo de resistencia [153]. La combinación del péptido QnCs-BUAP con los péptidos Uy234, Uy17 y Uy192 dio como resultado la reducción de la CMB en casi todas las cepas bacterianas evaluadas. Además, se observa un comportamiento sinérgico con el 25% de las combinaciones resultantes, el 37.5% muestra un efecto aditivo y solo el 8% mostró antagonismo (**Tabla 9**).

Algunos PAMs de venenos de alacrán muestran un gran potencial para inhibir el crecimiento de un amplio espectro de bacterias, incluidos aislados clínicos MDR; sin embargo, su alta citotoxicidad y su actividad hemolítica han impedido su uso clínico [147,154]. La evaluación de la actividad hemolítica es necesaria ya que los PAMs de veneno de alacrán no son receptor-específicos y pueden formar poros en otras membranas celulares [155].

De acuerdo con nuestros resultados, los tres PAMs de *U. yaschenkoi* y el péptido consenso QnCs-BUAP tienen una actividad hemolítica notablemente baja en comparación con la de otros PAMs de venenos de alacrán [87,144,148,154,155]. La concentración hemolítica de los péptidos Uy17, Uy192 y Uy234 hacia eritrocitos porcinos se reportó previamente con $\text{HC}_{25} = 26.65 \mu\text{M}$, $35.85 \mu\text{M}$ y $55.14 \mu\text{M}$, respectivamente

[156]; en nuestro trabajo, las mismas secuencias peptídicas mostraron una actividad hemolítica más baja contra eritrocitos humanos, lo que significa que se requieren mayores concentraciones de los péptidos ($> 370 \mu\text{M}$) para lograr el mismo HC_{25} (**Fig. 13**).

Además, el análisis de la estructura predicha de las proyecciones helicoidales (**Fig. 14**) sugiere que estos péptidos tienen una estructura catiónica helicoidal, dato que fue confirmado experimentalmente por los espectros de CD (**Fig. 16**). Estas características catiónicas brindan una característica peculiar a este tipo de PAMs [87,144], pues también son necesarias para unirse a las membranas bacterianas [94]. Tomando en cuenta los valores de la carga positiva neta de cada péptido (**Tabla 4**), el péptido Uy234 es considerado el mejor péptido antimicrobiano, lo cual coincide con los resultados de las pruebas antibacterianas (**Tabla 7**). Los péptidos Uy17 y Uy192 mostraron una estructura helicoidal que no fue tan definida como la de Uy234; sin embargo, la carga positiva de estos péptidos fue mayor que la carga de QnCs-BUAP, lo cual puede explicar por qué presentan una mayor actividad bactericida contra las cepas evaluadas.

A pesar de que la formación de poros en membrana se ha propuesto como el principal mecanismo de acción de los PAMs, este mecanismo aún debe confirmarse para nuestros péptidos antimicrobianos. El mecanismo de acción antimicrobiana de los PAMs de alacrán no se ha comprendido completamente, se sabe que la actividad antimicrobiana de los PAMs depende de su capacidad para unirse a sus membranas [157,158]. En el caso de las PAMs de cadena corta sin cisteína, la estructura helicoidal de los PAMs es la clave para lograr la interacción con la membrana blanco, al igual que la carga positiva más alta que proporciona la amidación del residuo C-terminal [159]. Los péptidos IsCT e IsCT2 del veneno del alacrán africano *Opisthacanthus madagascariensis* fueron los primeros péptidos estudiados de este tipo de PAMs [86,88]. Se ha reportado que la actividad antimicrobiana reducida de los PAMs no amidados se debe a la disminución de la carga superficial positiva y la alteración estructural de la hélice, lo cual afecta la capacidad del PAM para romper la membrana celular [160].

Cuando se evaluó el péptido consenso (QnCs-BUAP) en combinación con otros PAMs de *U. yaschenkoi*, se mostraron resultados interesantes: la mejor actividad bactericida se presentó mediante la combinación del péptido QnCs-BUAP y el péptido

Uy234 (**Tabla 8**), ya que una menor CMB se logró contra 7 de las 8 cepas bacterianas evaluadas con esta combinación. Además, esta combinación de péptidos logró un efecto bactericida contra *Burkholderia cepacia* (**Tabla 8**), la cual fue resistente a todos los péptidos cuando se evaluaron individualmente (**Tabla 7**). La mayor actividad antimicrobiana lograda con la combinación de estos péptidos, puede deberse a que tienen una estructura más helicoidal y una carga positiva total de + 4. Los ensayos de sinergismo revelaron la efectividad del uso combinado de los cuatro péptidos; sin embargo, los mecanismos de sinergismo no se elucidaron. Todos nuestros hallazgos sugieren que los péptidos Uy234, Uy17, Uy192 y QnCs-BUAP tienen un gran potencial para su uso como agentes terapéuticos contra patógenos MDR y varias combinaciones de estos péptidos podrían usarse como nuevas terapias antimicrobianas.

Por otra parte, como parte de la búsqueda y evaluación de sustancias antimicrobianas, incluimos una bacteria antagonista con gran potencial para descubrir nuevos agentes antimicrobianos, identificada en este trabajo como *Pseudomonas protegens* EMM-1. La especie *Pseudomonas protegens* produce característicamente los compuestos antimicrobianos pioluteorina y 2,4-DAPG [161,162] y ha sido estudiada por sus propiedades de biocontrol, ya que inhibe a diversos insectos y fitopatógenos. Además, se ha reportado que produce otras sustancias inhibitorias como sideróforos, ácido cianhídrico, análogos de rizoxina, orfamida A, entre otros [162–164]. Sin embargo, la actividad antibacteriana de *P. protegens* contra aislados clínicos con multirresistencia no ha sido evaluada [165,166].

En este trabajo, *P. protegens* EMM-1 se identificó molecularmente después del análisis filogenético de los genes *rrs*, *rpoB*, *rpoD* y *gyrB* (**Fig. 4 y 5**). Adicionalmente, esta cepa porta un fragmento del grupo de genes biosintéticos de 2,4-DAPG (*phlD*) y pioluteorina (**Fig. 6**); por lo cual se puede inferir que produce metabolitos antifúngicos relevantes para ser identificados en futuros trabajos. Además, la producción de antifúngicos por *P. protegens* EMM-1 cual coincide con el antagonismo revelado contra diversos hongos [106,113].

La actividad antibacteriana de la especie *P. protegens* contra aislados clínicos MDR no ha sido evaluada. En este estudio, *P. protegens* EMM-1 mostró un fuerte antagonismo contra diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas MDR, a través de la

producción de sustancias inhibitorias en medios sólidos (**Fig. 7**). Los ensayos de antagonismo muestran la inhibición de patógenos oportunistas como *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus* beta-hemolíticos (**Fig. 8**), responsables de enfermedades infecciosas principalmente en vías respiratorias [167]. El antagonismo contra *Streptococcus* sp. SP10 y *Streptococcus* sp. ST9 mostró un halo en forma de anillo después del ensayo de agar de doble capa, a diferencia del halo de inhibición tradicional (**Fig. 7d**). Hasta donde sabemos, este fenómeno no se ha reportado antes y la causa sigue siendo desconocida; sin embargo, el amplio espectro antibacteriano mostrado por *P. protegens* EMM-1 en los ensayos de agar de doble capa sugiere la presencia de sustancias inhibitorias de naturaleza química diversa, involucradas en el antagonismo, como se ha informado para otras especies de *Pseudomonas* como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* [168,169]. La formación de este anillo coincide con lo reportado por Cesa-Luna y Hernández-Luna *et al.*, quienes han sugerido que *P. protegens* EMM-1 produce moléculas de diferentes tamaños que podrían secretarse a través del medio sólido y, en consecuencia, las moléculas pequeñas podrían exhibir una migración variable a través del agar para formar el anillo de inhibición, mientras que las moléculas más grandes permanecen en el centro de la placa sin inhibir el crecimiento de las cepas de *Streptococcus*. En efecto, el extracto crudo evaluado contiene moléculas con actividad inhibitoria con tamaño de 3-10 kDa que inhiben principalmente a las cepas de *Streptococcus*, pero no a los demás géneros bacterianos.

El papel de *P. protegens* para colonizar eficientemente plantas e interactuar con fitopatógenos, competidores bacterianos y otros estreses de sus hábitats naturales ha sido demostrado [161,166,170,171], la mayoría de ellos a través de la producción de antibióticos y bacteriocinas [50,172]. La evaluación de las sustancias inhibitorias producidas por *P. protegens* EMM-1 consistió en el uso de un extracto crudo obtenido por la "metodología de lixiviación en frío" [108], ya que anteriormente se había reportado que *P. protegens* EMM-1 no producía sustancias inhibitorias en medio líquido [69,107]. Este extracto mostró fuerte actividad inhibitoria contra *Streptococcus* sp SP10 y *Streptococcus* ST9 e inhibió en menor cantidad a *Microbacterium* sp. UAPS01-201 (**Tabla 5**); además, se descartó la presencia de sustancias con actividad fungicida. La

evaluación fisicoquímica del extracto crudo reveló en estudios anteriores que la actividad antimicrobiana corresponde a moléculas de tamaño de 3-10 kDa; además, permanece activa a amplios rangos de pH y no se ve afectada por el tratamiento térmico. Asimismo, después del tratamiento con proteasa, la actividad antimicrobiana disminuye 90%; estas propiedades han sugerido la presencia de moléculas de tipo bacteriocina en el extracto [69]. Además, se ha reportado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) que el extracto crudo contiene diversos compuestos químicos relacionados con benzoquinolinas [107]; las benzoquinolinas han sido ampliamente reportadas por estar relacionadas con compuestos antimicrobianos [173], por lo tanto, su presencia en el extracto crudo podría estar relacionada con la actividad inhibitoria.

Se ha propuesto que más del 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina y la mayoría de ellas permanecen sin explorarse [174]. Asimismo, se ha establecido que las bacteriocinas generalmente muestran espectros inhibitorios contra especies filogenéticamente relacionadas con la bacteria productora [9]; sin embargo, algunas bacteriocinas han mostrado actividad inhibitoria contra diferentes géneros bacterianos e incluso contra levaduras [48,175]. En nuestros ensayos, el extracto crudo obtenido de *P. protegens* EMM-1 presentó actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas (*Streptococcus* sp. y *Microbacterium* sp. UAPS01-201), similar a la actividad inhibitoria que muestran algunas bacteriocinas producidas por *Pseudomonas putida* [176].

Aunque *P. protegens* EMM-1 inhibió a la mayoría de las cepas bacterianas y fúngicas evaluadas en los ensayos de antagonismo (**Fig. 8**), la metodología utilizada solo permite extraer metabolitos que inhiben el desarrollo de *Streptococcus* sp., hecho que coincide con los resultados reportados en 2017 [71]. Por lo tanto, se sugiere realizar diferentes métodos de purificación para explorar otras sustancias inhibitorias producidas por *P. protegens* EMM-1.

Un descubrimiento interesante de este trabajo es que *P. protegens* EMM-1 sí produce sustancias inhibitorias en medio líquido, pero en condiciones de baja agitación, por lo que se infiere que disminuye la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo y esto favorece a la producción de sustancias inhibitorias (**Tabla 6, Fig. 9**). Este

es el primer modelo bacteriano perteneciente a la especie *P. protegens* que reporta esta característica, aunque existe evidencia de que otros géneros bacterianos como *Pediococcus* y *Bacillus* producen bacteriocinas únicamente en condiciones de aireación reducida [177,178]. Además, es posible que la actividad inhibitoria en estas condiciones ocurra debido a la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOCs); los VOCs bacterianos pueden tener efectos antagonistas contra bacterias y hongos [179,180], y se ha reportado que su producción puede ser influenciada por la presencia de oxígeno [181,182]; por lo que es probable que la producción de VOCs u otras sustancias inhibitorias por *P. protegens* EMM-1 sea afectada cuando la bacteria crece en condiciones de alta oxigenación.

Diversos estudios han reportado que cepas de *P. protegens* producen bacteriocinas de tipo lectina, denominadas LlpA [62,183,184]. Este tipo de bacteriocinas son proteínas de 31 kDa, homóloga a las lectinas de unión a manosa encontradas en monocotiledóneas [183,185]. De acuerdo con Aguayo-Acosta [69], el extracto crudo de *P. protegens* EMM-1 contiene compuestos de tipo bacteriocina más pequeños (3-10 kDa) sin excluir la posibilidad que mediante otras metodologías se puedan obtener otras sustancias inhibitorias producidas por esta cepa. En este trabajo se demuestra este planteamiento al confirmarse que *P. protegens* EMM-1 contiene un gen con una homología mayor al 99% con secuencias del gen *llpA* que codifica para la bacteriocina LlpA (**Fig. 11**). Este hallazgo brinda una excelente oportunidad para la expresión, purificación y evaluación de una nueva bacteriocina recombinante.

Durante varios años las sustancias inhibitorias, como las bacteriocinas, se han propuesto para su uso como conservadores alimenticios y se ha evaluado su eficacia para disminuir el número de patógenos en modelos *in vivo* [186,187]. Además, algunas bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Planomonospora* sp., entre otras, han resultado más efectivas que algunos antibióticos aprobados para el tratamiento contra patógenos MDR [188–190]. Sin embargo, actualmente la nisina es la única bacteriocina que ha sido aprobada para su uso en la industria alimenticia [191], por lo que las bacterias que producen sustancias inhibitorias son candidatas potenciales para el desarrollo nuevas terapias antimicrobianas, pero es indispensable continuar trabajando en la caracterización y evaluación *in vitro* de nuevas sustancias inhibitorias.

Aunque nuestros resultados no incluyen la evaluación de un compuesto puro, diversos estudios han propuesto el uso de bacteriocinas semipurificadas [43]. Por lo que proponemos evaluar a futuro la citotoxicidad del extracto crudo antes de proponer su uso como agente antibacteriano contra *Streptococcus*.

Hoy en día, existe una necesidad urgente de descubrir nuevos antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción, ya que el incremento de los patógenos MDR se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial [192,193]. De hecho, por cada nuevo antimicrobiano que se descubre, se van seleccionando rápidamente bacterias resistentes, reduciendo su efectividad para el tratamiento de enfermedades infecciosas [194]. En este sentido, el uso de sustancias inhibitorias producidas por bacterias antagónicas también podría complementar en el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que los péptidos antimicrobianos del alacrán *U. yaschenkoi* y un nuevo péptido, diseñado a partir de secuencias consenso de PAMs de alacranes, presentan actividad bactericida de amplio espectro contra patógenos con multirresistencia. Además, presentan baja actividad citotóxica contra eritrocitos humanos lo cual los hace candidatos ideales para el estudio, diseño y desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Los ensayos de sinergismo revelaron que los péptidos Uy234 y QnCs-BUAP (consenso) tienen una mayor actividad bactericida a concentraciones menores. No obstante, resulta indispensable evaluar su actividad citotóxica en combinación.

Finalmente, los ensayos de dicroísmo circular confirmaron que la estructura secundaria de los péptidos es de tipo alfa hélice y se ha sugerido que esta característica les podría brindar la posibilidad de unirse a las membranas bacterianas para la formación de poros; por lo que sería interesante evaluar el mecanismo de acción en estos PAMs.

Por otra parte, se logró la identificación molecular de *P. protegens* EMM-1, una cepa bacteriana con propiedades antagónicas que podría utilizarse para el biocontrol de hongos fitopatógenos y contra bacterias multirresistentes. Se demostró que el extracto

crudo de *P. protegens* EMM-1 no contiene sustancias antifúngicas, pero mantiene su actividad bactericida contra *Streptococcus* beta-hemolíticos. Por lo que sería interesante evaluar su actividad citotóxica para su uso de manera semipurificada como se ha sugerido para otras bacteriocinas.

Adicionalmente, determinamos que *P. protegens* EMM-1 produce sustancias inhibitorias en medio líquido dependientes de las condiciones de aireación en el crecimiento bacteriano, y sugerimos que algunas de ellas podrían corresponder a compuestos orgánicos volátiles, por lo que sería importante confirmar a futuro la presencia de estos compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Otro aspecto importante fue que *P. protegens* EMM-1 también codifica para compuestos como 2,4-DAPG, Plt, y una bacteriocina relacionada con las bacteriocinas similares a lectinas (LlpA); una perspectiva de este resultado es la subclonación en un vector de expresión para la purificación y caracterización de la bacteriocina recombinante.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El experimento relacionado con la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paredes F, Roca JJ. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Ámbito Farmarmacol.* 2004; 23: 116–124.
2. Maróti Gergely G, Kereszt A, Kondorosi É, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol.* 2011; doi:10.1016/j.resmic.2011.02.005
3. Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 2001; doi:10.1093/jexbot/52.suppl_1.487
4. Montaña-Pérez K, Vargas-Albores F. Péptidos antimicrobianos: Un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia.* 2002.
5. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter.* 2003; 16: 385–393.
6. Tonarelli G, Simonetta A. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *Fabicib.* 2014; 17: 137–177. doi:10.14409/fabicib.v17i0.4316
7. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002; doi: 10.1038/415389a
8. Konovalova MV., Zubareva AA, Lutsenko GV., Svirshchevskaya EV. Antimicrobial Peptides in Health and Disease (Review). *Appl Biochem Microbiol.* 2018; doi:10.1134/S0003683818030079
9. Riley MA. Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. *Encycl Microbiol.* 2009; 32–44. Disponible en: https://works.bepress.com/margaret_riley/6/
10. Atanasova NS, Pietilä MK, Oksanen HM. Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. *Microbiology open.* 2013; 2: 811–825. doi:10.1002/mbo3.115
11. Li D, Ni K, Pang H, Wang Y, Cai Y, Jin Q. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2015; 28: 620–631. doi:10.5713/ajas.14.0439
12. Li W, Rokni-zadeh H, Vleeschouwer M De, Ghequire MGK, Sinnaeve D. The Antimicrobial Compound Xantholysin Defines a New Group of *Pseudomonas* Cyclic

- Lipopeptides. PLoS One. 2013; 8: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0062946
13. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. 2002; 117–137. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
 14. Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ Sci Pollut Res. 2016; 23: 3984–3999. doi:10.1007/s11356-015-4294-0
 15. Morales-García YE, Herrera MC, Muñoz-Rojas J. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. Rev Mex Ciencias Farm. 2007; 38: 58–69.
 16. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2013. doi:10.3389/fcimb.2013.00075
 17. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microb Cell Fact. 2014; 13: 1–13. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3
 18. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnology Advances. 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.007
 19. Quecine MC, Kidarsa TA, Goebel NC, Shaffer BT, Henkels MD, Zabriskie TM, *et al.* An interspecies signaling system mediated by fusaric acid has parallel effects on antifungal metabolite production by *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 and antibiosis of *Fusarium* spp. Appl Environ Microbiol. 2016; 82: 1372–1382. doi:10.1128/AEM.02574-15
 20. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Rev Iberoam Micol. 2006; 23: 39–49. doi:10.1016/S1130-1406(06)70012-2
 21. Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: An emerging crisis. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2014. doi:10.1155/2014/541340
 22. Munro N. Antimicrobial resistance. AACN Adv Crit Care. 2015; doi:10.1097/NCI.0000000000000102
 23. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, *et al.*

- Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*. 2016. doi:10.1016/S0140-6736(15)00473-0
24. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect. European Society of Clinical Infectious Diseases*. 2012; 18: 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
 25. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
 26. Rumende CM. Risk Factors for Multidrug-resistant Tuberculosis. *Acta medica Indonesiana*. 2018. doi:10.3126/ijasbt.v5i4.18771
 27. McManus PS. Uso de antibioticos en el control de enfermedades de las plantas. *Enfermedades Infecc y Microbiol*. 1999.
 28. Carmona M, Sautua F. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Rev la Fac Agron UBA*. 2017.
 29. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; doi:10.1016/j.eimc.2013.03.016
 30. Cabrera CE, Gómez RF, Zuñiga AE, Corral RH, López B, Chávez M. Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. *Colomb Med*. 2011; 42: 117–125.
 31. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.011
 32. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ. Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x
 33. García MG, San IJ, Galán J, Fidel II, Morales E. Péptidos antimicrobianos:

- potencialidades terapéuticas. Antimicrobial peptides: their therapeutic potential. Rev Cubana Med Trop. 2017.
34. Reina J, Reina N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? Revista Espanola de Quimioterapia. 2018.
 35. Nallelyt SA, Efrén HB, Oliver L V., Oscar TA. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas. 2010.
 36. González García M, San Juan Galán J, Morales Vicente FE, Otero González AJ. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. Rev Cubana Med Trop. 2017; 69: 1–13.
 37. Castrillón Rivera LE, Ramos AP, Desgarenes CP. Péptidos antimicrobianos: Antibióticos naturales de la piel. Dermatologia Revista Mexicana. 2007.
 38. Corrales-García LL, Ciro GL. Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos. Rev Fac Quim Farm. 2010; 17: 181–190.
 39. Martínez B, Rodríguez A, Suárez E. Antimicrobial peptides produced by bacteria: The bacteriocins. New Weapons to Control Bacterial Growth. 2016. doi:10.1007/978-3-319-28368-5_2
 40. Fry DE. Antimicrobial peptides. Surg Infect (Larchmt). 2018; doi:10.1089/sur.2018.194
 41. Tam JP, Wang S, Wong KH, Tan WL. Antimicrobial peptides from plants. Pharmaceuticals. 2015. doi:10.3390/ph8040711
 42. Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebole DJ, *et al.* Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. J Biol Chem. 2002; doi:10.1074/jbc.M201654200
 43. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. Front Microbiol. 2018; 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00594
 44. Riley MA. Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities. Prokaryotic Antimicrob Pept From Genes to Appl. 2011; 13–27. doi:10.1007/978-1-4419-7692-5
 45. Hawlena H, Bashey F, Lively CM. Bacteriocin-mediated interactions within and

- between coexisting species. *Ecol Evol.* 2012; doi:10.1002/ece3.354
46. Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB. Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 6854–6862. doi:10.1128/AEM.02284-14
 47. López M. JE, Ochoa Z. A, Santoyo P. G, Anaya L. JL, Medina M. E, Martínez T. M, *et al.* Bacteriocins of Gram positive bacteria: a potential source of new biomedical treatments. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2008; 39: 49–57. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/579/57911110007.pdf>
 48. Abriouel H, Franz CMAP, Omar N Ben, Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35: 201–232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
 49. Keller D, Farmer S, McCartney A, Gibson G. *Bacillus coagulans* as a probiotic. *Food Sci Technol Bull Funct Foods.* 2010; 7: 103–109. doi:10.1616/1476-2137.16015.
 50. Rebuffat S. Microcins and Other Bacteriocins: Bridging the Gaps Between Killing Strategies, Ecology and Applications. En: *The Bacteriocins: Current Knowledge and Future Prospects.* Caister Academic Press; 2016. pp. 11–34. doi:10.21775/9781910190371.02
 51. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00241
 52. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00241
 53. Kaur S, Kaur S. Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 1–11. doi:10.3389/fphar.2015.00272
 54. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 2002; 84: 499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0
 55. Ghequire M, De Mot R. Turning Over a New Leaf: Bacteriocins Going Green. *Trends Microbiol.* 2018; 26: 1–3. doi:10.1016/j.tim.2017.11.001
 56. Oluyombo O, Diggle SP, Penfold CN. Competition in biofilms between

- Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates is driven by R-pyocins. BioRxiv. 2018; doi:10.1101/264580
57. Scholl D. Phage Tail–Like Bacteriocins. *Annu Rev Virol.* 2017;4: 453–467. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041632
 58. Naz SA, Jabeen N, Sohail M, Rasool SA. Biophysicochemical characterization of pyocin SA189 produced by *Pseudomonas aeruginosa* SA189. *Brazilian J Microbiol.* 2015; 46: 1147–1154. doi:10.1590/S1517-838246420140737
 59. Ghequire MGK, De Mot R. The Tailocin Tale: Peeling off Phage Tails. *Trends Microbiol.* 2015; 23: 587–590. doi:10.1016/j.tim.2015.07.011
 60. Yao GW, Duarte I, Le TT, Carmody L, LiPuma JJ, Young R, *et al.* A Broad-Host-Range Tailocin from *Burkholderia cenocepacia*. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 83. doi:10.1128/AEM.03414-16
 61. Gebhart D, Lok S, Clare S, Tomas M, Stares M, Scholl D, *et al.* A modified R-type bacteriocin specifically targeting *Clostridium difficile* prevents colonization of mice without affecting gut microbiota diversity. *MBio.* 2015; 6. doi:10.1128/mBio.02368-14
 62. Parret AHA, Temmerman K, De Mot R. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 5197–5207. doi:10.1128/AEM.71.9.5197-5207.2005
 63. Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, Muñoz-Rojas J, *et al.* The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colomb.* 2020; 140–154. doi:10.15446/abc.v25n1.76867
 64. Vera Pingitore E, Hebert EM, Sesma F, Nader-Macías ME. Influence of vitamins and osmolites on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 in a chemically defined medium. *Can J Microbiol.* 2009; doi:10.1139/W08-092
 65. Abbasiliasi S, Tan JS, Tengku Ibrahim TA, Bashokouh F, Ramakrishnan NR, Mustafa S, *et al.* Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. *RSC Advances.* 2017. doi:10.1039/c6ra24579j
 66. Mahrous H, Mohamed A, El-Mongy MA, El-Batal AI, Hamza HA. Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of *Lactobacillus* spp. Isolated from

- Some Dairy Products under Different Culture Conditions. *Food Nutr Sci.* 2013; doi:10.4236/fns.2013.43045
67. Ugras S, Sezen K, Kati H, Demirbag Z. Purification and characterization of the Bacteriocin thuricin Bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 isolated from a hazelnut pest. *J Microbiol Biotechnol.* 2013; 23: 167–176. doi:10.4014/jmb.1209.09056
 68. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007; 13: 194–199. doi:10.1159/000104752
 69. Aguayo-Acosta A. Identificación y caracterización parcial de una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2015.
 70. Cesa-Luna C, Aguayo-Acosta A, Hernández-Luna I, Ramírez-Valverde A, Aragón-Hernández C, López-Villa J, *et al.* Evaluación de una sustancia inhibitoria presente en un extracto obtenido a partir de *Sphingomonas* sp. DS-204 frente a cepas de *Streptococcus* β -hemolíticos. En: *Tendencias de Investigación en Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*; 2015. pp. 31–36. ISBN: 978-607-9453-08-4
 71. Cesa-Luna C, Báez-Rogelio A, Morales-García YE, Pérez-y-Terrón R, Muñoz-Rojas J, Quintero-Hernández V. Isolation, partial purification and antimicrobial activity of a bacteriocin-like compound produced by *Pseudomonas* spp. EMM-1. *Applied Microbiology: Open Access.* 2017. p. 52. doi:10.4172/2471-9315-C1-006
 72. Fahim HA, Rouby WMAE, El-Gendy AO, Khairalla AS, Naguib IA, Farghali AA. Enhancement of the productivity of the potent bacteriocin avicin A and improvement of its stability using nanotechnology approaches. *Sci Rep.* 2017; doi:10.1038/s41598-017-10157-9
 73. Khandare S, Patil S. Encapsulation of Lactic acid bacteria in calcium alginate beads for higher bacteriocin production. *Int J Life Sci.* 2016; 4: 539–546.
 74. Quintero-Hernández V, Cesa-Luna C, Muñoz-Rojas J. Péptidos antimicrobianos de alacrán. *Alianzas y Tendencias.* 2017; 2: 10–16.
 75. Almaaytah A, Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. *Peptides.* 2014; 51: 35–45. doi:10.1016/j.peptides.2013.10.021

76. Harrison PL, Abdel-Rahman MA, Miller K, Strong PN. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*. 2014; 88: 115–137. doi:10.1016/j.toxicon.2014.06.006
77. Zeng X-C, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*. 2005; 57: 13–21. doi:10.1080/15216540500058899
78. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 2014; doi:10.1016/s0123-9392(10)70093-x
79. Harrison PL, Abdel-Rahman MA, Miller K, Strong PN. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*. 2014; 88: 115–137. doi:10.1016/j.toxicon.2014.06.006
80. Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett*. 2000; 471: 165–168. doi:10.1016/S0014-5793(00)01384-3
81. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, A new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem*. 2000; 267: 5023–5031. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x
82. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, *et al*. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J*. 2001; 359: 35. doi:10.1042/0264-6021:3590035
83. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, *et al*. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem*. 2002; 269: 4799–4810. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x
84. Nie Y, Zeng XC, Yang Y, Luo F, Luo X, Wu S, *et al*. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*. 2012; 38: 389–394. doi:10.1016/j.peptides.2012.09.012
85. Gao B, Xu J, del Carmen Rodriguez M, Lanz-Mendoza H, Hernández-Rivas R, Du W, *et al*. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie*. 2010; 92: 350–359. doi:10.1016/j.biochi.2010.01.011
86. Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem*

- Biophys Res Commun. 2001; 286: 820–825. doi:10.1006/bbrc.2001.5472
87. Ramírez-Carretero S, Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Corzo G, Possani LD, Becerril B, *et al.* Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. *Peptides*. 2012; 34: 290–295. doi:10.1016/j.peptides.2012.02.002
 88. Dai L, Corzo G, Naoki H, Andriantsiferana M, Nakajima T. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293: 1514–1522. doi:10.1016/S0006-291X(02)00423-0
 89. Luna-Ramírez K, Sani MA, Silva-Sanchez J, Jiménez-Vargas JM, Reyna-Flores F, Winkel KD, *et al.* Membrane interactions and biological activity of antimicrobial peptides from Australian scorpion. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014; 1838: 2140–2148. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.022
 90. Zhao H. Mode of Action of Antimicrobial Peptides. University of Helsinki. 2003. ISBN: 952-10-1205-6 (PDF)
 91. Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005. doi:10.1038/nrmicro1098
 92. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. 2015; 93: 125–135. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.233
 93. Ramírez-Carretero S, Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Corzo G, Possani LD, Becerril B, *et al.* Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. *Peptides*. 2012; 34: 290–295. doi:10.1016/j.peptides.2012.02.002
 94. Liu G, Yang F, Li F, Li Z, Lang Y, Shen B, *et al.* Therapeutic potential of a scorpion venom-derived antimicrobial peptide and its homologs against antibiotic-resistant Gram-positive bacteria. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1–14. doi:10.3389/fmicb.2018.01159
 95. Carcamo-Noriega EN, Sathyamoorthi S, Banerjee S, Gnanamani E, Mendoza-Trujillo M, Mata-Espinosa D, *et al.* 1,4-Benzoquinone antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* derived from scorpion

- venom. Proc Nat Acad Sci USA. 2019; doi:10.1073/pnas.1812334116
96. Lee K, Shin SY, Kim K, Lim SS, Hahm KS, Kim Y. Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 323: 712–719. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.144
 97. Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Juárez-González VR, Possani LD. Whole Transcriptome of the Venom Gland from *Urodacus yaschenko* Scorpion. *PLoS One.* 2015; 10: e0127883. doi:10.1371/journal.pone.0127883
 98. Possani LD. El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina. *Biotecnología.* 2007; 14: 177–188.
 99. Rincón-Cortés CA, Reyes-Montaña EA, Vega-Castro NA. Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica C. *Biomédica.* 2017; 238–49. doi:10.7705/biomedica.v37i3.3265
 100. Valdez-Velazquéz LL, Romero-Gutierrez MT, Delgado-Enciso I, Dobrovinskaya O, Melnikov V, Quintero-Hernández V, *et al.* Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon.* 2016; 118: 95–103. doi:10.1016/j.toxicon.2016.04.046
 101. Zhao Z, Ma Y, Dai C, Zhao R, Li SR, Wu Y, *et al.* Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 3472–3477. doi:10.1128/AAC.01436-08
 102. De la Salud Bea R, Petraglia AF, Ascuitto MR, Buck QM. Antibacterial Activity and Toxicity of Analogs of Scorpion Venom IsCT Peptides. *Antibiotics.* 2017; 6: 13. doi:10.3390/antibiotics6030013
 103. Parente AMS, Daniele-Silva A, Furtado AA, Melo MA, Lacerda AF, Queiroz M, *et al.* Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. *Toxins.* 2018; 10: 1–16. doi:10.3390/toxins10040161
 104. Aguilera-Méndez N. Búsqueda de sustancias inhibitorias en *Sphingomonas* sp.

- Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2009.
105. Morales-García Y, Aguilera-Méndez N, Ramírez-Valverde A, Fuentes-Ramírez L, Ramos J, Muñoz-Rojas J. Inhibitory substances produced by *Sphingomonas* sp. as strategy of competition. 4th International meeting on biotechnology, towards a sustainable bioeconomy. 2008.
 106. De la Cruz-Enríquez J. *Sphingomonas* sp. DS204 como alternativa para antagonizar a hongos patógenos en cultivos de maíz. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2019.
 107. Cesa-Luna C. Avances en la caracterización de la (s) sustancia (s) producida (s) por *Sphingomonas* sp. DS-204, y su efecto contra cepas de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Streptococcus*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2015. doi:10.13140/RG.2.2.20224.64006/1
 108. Cesa-Luna C, Aguayo-Acosta A, Baez A, Muñoz-Rojas J, Quintero-Hernández V. Cold-leaching extraction. A new methodology for obtaining inhibitory substances produced by bacteria in solid media. protocols.io. 2020; 1–5. doi: 10.17504/protocols.io.bhs3j6gn
 109. Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Juárez-González VR, Possani LD. Whole transcriptome of the venom gland from *Urodacus yaschenkoi* scorpion. PLoS One. 2015; 10: 1–33. doi:10.1371/journal.pone.0127883
 110. Luna-Ramírez K, Skaljic M, Grotmann J, Kirfel P, Vilcinskis A. Orally delivered scorpion antimicrobial peptides exhibit activity against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and its bacterial symbionts. Toxins. 2017; 9. doi:10.3390/toxins9090261
 111. Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Vargas-Jaimes L, Batista CVF, Winkel KD, Possani LD. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. Toxicon. 2013; 63: 44–54. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.017
 112. Castro-González R, Martínez-Aguilar L, Ramírez-Trujillo A, Estrada-de los Santos P, Caballero-Mellado J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. Plant Soil. 2011; doi:10.1007/s11104-011-0768-0
 113. Cesa-Luna C, De la Cruz-Enríquez J, Hernández-Tenorio AL, Xicale-Nava F,

- Morales-García YE, Pérez-y-Terrón R, *et al.* Antagonism of *Pseudomonas* sp. EMM-1 and its potential as biocontrol agent. *Journal of Ecosystem & Ecography*. 2017. p. 66. doi:10.4172/2157-7625-C1-030
114. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramírez LE, *et al.* Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol*. 2011; 43: 287–293. doi:10.1590/S0325-75412011000400009
 115. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; doi:10.1093/nar/22.22.4673
 116. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
 117. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; doi:10.1093/molbev/msy096
 118. Frapolli M, Défago G, Moënne-Loccoz Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol*. 2007; 9: 1939–1955. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01310.x
 119. Ramette A, Moënne-Loccoz Y, Défago G. Polymorphism of the polyketide synthase gene *phlD* in biocontrol fluorescent pseudomonads producing 2,4-diacetylphloroglucinol and comparison of PhlD with plant polyketide synthases. *Mol PlantMicrobe Interact*. 2001; 14: 639–652. doi:10.1094/MPMI.2001.14.5.639
 120. Validov S, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, *et al.* Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 242: 249–256. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.013
 121. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, *et al.* Antagonism assays to identify

- bacterial strains producing antimicrobial compounds. *Protoc PLoS One*. 2017; 12: 1–2. doi:10.17504/protocols.io.j4mcqu6
122. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
 123. Sadiq H, Jamil N. Antagonistic behaviour of organic compounds from *Bacillus* species and *Brevundimonas* specie. *Pak J Pharm Sci*. 2018.
 124. Sabo SS, Converti A, Ichiwaki S, Oliveira RPS. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *J Dairy Sci*. 2019; doi:10.3168/jds.2018-14881
 125. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Baez-Rogelio A, Quintero-Hernández V, Rivera-Urbalejo AP, Pérez-y-Terrón R. Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. *Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora en México*. 2016.
 126. Cesa-Luna C, Baez A, Morales-García YE, Pérez-y-Terrón R, Muñoz-Rojas J, Quintero-Hernández V. Isolation, partial purification and antimicrobial activity of a bacteriocin-like compound produced by *Pseudomonas* spp. EMM-1. *Appl Microbiol Open Access*. 2017; doi:10.4172/2471-9315-c1-006
 127. Sambrook J, Russell DW. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006; doi:10.1101/pdb.prot3932
 128. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000; doi:10.1006/jmbi.2000.4042
 129. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Débora Martínez-Contreras R, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. *Rev Colomb Biotecnol*. 2012.
 130. Li Z, Xu X, Meng L, Zhang Q, Cao L, Li W, *et al.* Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. *PLoS One*. 2014; 9. doi:10.1371/journal.pone.0097539
 131. Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Vargas-Jaimes L, Batista CVF, Winkel

- KD, Possani LD. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon*. 2013; 63: 44–54. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.017
132. Almaaytah A, Qaoud MT, Abualhajjaa A, Al-Balas Q, Alzoubi KH. Hybridization and antibiotic synergism as a tool for reducing the cytotoxicity of antimicrobial peptides. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 835–847. doi:10.2147/IDR.S166236
133. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 2000; doi:10.1006/abio.2000.4880
134. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 2000. doi:10.1089/10665270050081478
135. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. doi:10.1128/JCM.01228-07
136. Keel C, Weller DM, Natsch A, Cook RJ. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. Conservation of the 2, 4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis Locus among Fluorescent *Pseudomonas* Strains from Di. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62: 552–563.
137. Petti CA. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 1108–1114. doi:10.1086/512818
138. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 668–673. doi:10.1093/nar/gkh371
139. Rossolini GM. Multidrug-Resistant and Extremely Drug-Resistant Bacteria: Are We Facing the End of the Antibiotic Era? *J Siena Acad Sci*. 2016; 7. doi:10.4081/jsas.2015.6409
140. Trentini MM, das Neves RC, Santos B de PO, DaSilva RA, de Souza ACB, Mortari MR, *et al*. Non-disulfide-bridge peptide 5.5 from the scorpion *Hadrurus gertschi*

- inhibits the growth of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.00273
141. Somay Doğan T, İğci N, Biber A, Gerekçi S, Hüsnügil HH, İzbirak A, *et al.* Peptidomic characterization and bioactivity of *Protoiurus kraepelini* (Scorpiones: Luridae) venom. *Turkish J Biol.* 2018; 42: 1–9. doi:10.3906/biy-1804-35
 142. Almaaytah A, Farajallah A, Abualhaijaa A, Al-Balas Q. A3, a Scorpion Venom Derived Peptide Analogue with Potent Antimicrobial and Potential Antibiofilm Activity against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Gram Positive Bacteria. *Molecules.* 2018; 23: 1603. doi:10.3390/molecules23071603
 143. Marques-Neto LM, Trentini MM, das Neves RC, Resende DP, Procopio VO, da Costa AC, *et al.* Antimicrobial and chemotactic activity of scorpion-derived peptide, ToAP2, against *Mycobacterium massiliensis*. *Toxins.* 2018; doi:10.3390/toxins10060219
 144. Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Vargas-Jaimes L, Batista CVF, Winkel KD, Possani LD. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon.* 2013; 63: 44–54. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.017
 145. Fan Z, Cao L, He Y, Hu J, Di Z, Wu Y, *et al.* Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 5220–5229. doi:10.1128/AAC.00369-11
 146. Hernández-Aponte CA, Silva-Sanchez J, Quintero-Hernández V, Rodríguez-Romero A, Balderas C, Possani LD, *et al.* Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon.* 2011; 57: 84–92. doi:10.1016/j.toxicon.2010.10.008
 147. Ramírez-Carretero S, Jiménez-Vargas JM, Rivas-Santiago B, Corzo G, Possani LD, Becerril B, *et al.* Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. *Peptides.* 2015; 73: 51–59. doi:10.1016/j.peptides.2015.08.014
 148. Kim MK, Kang HK, Ko SJ, Hong MJ, Bang JK, Seo CH, *et al.* Mechanisms driving

- the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2018; 8. doi:10.1038/s41598-018-19434-7
149. Almaaytah A, Ajingi Y, Abualhaijaa A, Tarazi S, Alshar'i N, Al-Balas Q. Peptide consensus sequence determination for the enhancement of the antimicrobial activity and selectivity of antimicrobial peptides. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 1–17. doi:10.2147/IDR.S118877
 150. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017; 41: 276–301. doi:10.1093/femsre/fux010
 151. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia*. Molecular Typing in Bacterial Infections. 2013. doi:10.1007/978-1-62703-185-1_18
 152. Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS, Hirsch AM. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology*. 2016. doi:10.1007/s13213-015-1183-1
 153. Walkenhorst WF, Sundrud JN, Laviolette JM. Additivity and synergy between an antimicrobial peptide and inhibitory ions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014; 2234–2242. doi:10.1016/j.bbamem.2014.05.005
 154. Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, *et al*. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*. 2013; doi:10.1016/j.biochi.2013.06.003
 155. Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, Wu Y, *et al*. Antibacterial activity and mechanism of a Scorpion venom peptide derivative in vitro and *in vivo*. *PLoS One*. 2012; 7. doi:10.1371/journal.pone.0040135
 156. Luna-Ramírez K, Tonk M, Rahnamaeian M, Vilcinskis A. Bioactivity of natural and engineered antimicrobial peptides from venom of the scorpions *Urodacus yaschenkoi* and *U. manicatus*. *Toxins*. 2017; 9. doi:10.3390/toxins9010022
 157. Strömstedt AAA, Ringstad L, Schmidtchen A, Malmsten M. Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2010. doi:10.1016/j.cocis.2010.05.006

158. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. 2011. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.001
159. Mura M, Wang J, Zhou Y, Pinna M, Zvelindovsky A V., Dennison SR, *et al.* The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides. *European Biophysics Journal*. 2016. doi:10.1007/s00249-015-1094-x
160. Sforça ML, Oyama S, Canduri F, Lorenzi CCB, Pertinhez TA, Konno K, *et al.* How C-Terminal Carboxyamidation Alters the Biological Activity of Peptides from the Venom of the Eumenine Solitary Wasp. *Biochemistry*. 2004; doi:10.1021/bi0360915
161. Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS, Gould SJ, Loper JE. Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol*. 1999; 181: 2166–2174.
162. Ramette A, Frapolli M, Saux MF Le, Gruffaz C, Meyer JM, Défago G, *et al.* *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol*. 2011; 34: 180–188. doi:10.1016/j.syapm.2010.10.005
163. Takeuchi K, Noda N, Katayose Y, Mukai Y, Numa H, Yamada K, *et al.* Rhizoxin analogs contribute to the biocontrol activity of a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2015; doi:10.1094/MPMI-09-14-0294-FI
164. Loper JE, Henkels MD, Rangel LI, Olcott MH, Walker FL, Bond KL, *et al.* Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*. *Environ Microbiol*. 2016; doi:10.1111/1462-2920.13369
165. Andreolli M, Zapparoli G, Angelini E, Lucchetta G, Lampis S, Vallini G. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiol Res*. 2019; doi:10.1016/j.micres.2018.11.003
166. Ma Z, Geudens N, Kieu NP, Sinnaeve D, Ongena M, Martins JC, *et al.* Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front Microbiol*. 2016;

- 7: 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.00382
167. Patterson. MJ. *Streptococcus*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. 1996.
 168. Gionco B, Tavares ER, de Oliveira AG, Yamada-Ogatta SF, do Carmo AO, Pereira U de P, *et al.* New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: A gene expression analysis. Front Chem. 2017; doi:10.3389/fchem.2017.00066
 169. Trapet P, Avoscan L, Klinguer A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, *et al.* The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. Plant Physiol. 2016; doi:10.1104/pp.15.01537
 170. Raaijmakers JM, De Bruijn I, De Kock MJD. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Molecular Plant-Microbe Interactions. 2006. doi:10.1094/MPMI-19-0699
 171. Leinweber A, Weigert M, Kümmerli R. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* senses and gradually responds to interspecific competition for iron. Evolution (N Y). 2018; doi:10.1111/evo.13491
 172. Ghoul M, West SA, Johansen HK, Molin S, Harrison OB, Maiden MCJ, *et al.* Bacteriocin-mediated competition in cystic fibrosis lung infections. Proc R Soc B Biol Sci. 2015; doi:10.1098/rspb.2015.0972
 173. Naik HRP, Naik HSB, Naik TRR, Lamani DS, Aravinda T. An efficient, microwave-assisted, one-pot synthesis of dioxolano quinoline/benzo[h]quinolines as potent antibacterial agents. Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem. 2010; doi:10.1080/10426500902797095
 174. Subramanian S, Smith DL. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome– from an agriculture perspective. Front Plant Sci. 2015; 6. doi:10.3389/fpls.2015.00909
 175. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016; doi:10.1080/10408398.2013.763765
 176. Ahmad A, Hamid R, Dada AC, Usup G. *Pseudomonas putida* Strain FStm2 Isolated from Shark Skin: A Potential Source of Bacteriocin. Probiotics Antimicrob Proteins.

- 2013; 5: 165–175. doi:10.1007/s12602-013-9140-4
177. Md Sidek NL, Halim M, Tan JS, Abbasiliasi S, Mustafa S, Ariff AB. Stability of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at different extreme conditions. Biomed Res Int. 2018; doi:10.1155/2018/5973484
178. Kaboré D, Thorsen L, Nielsen DS, Berner TS, Sawadogo-Lingani H, Diawara B, *et al.* Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional maari. Int J Food Microbiol. 2012; doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.003
179. Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P. Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. Frontiers in Microbiology. 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.02484
180. Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. Trends Microbiol. 2017; 25: 280–292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002
181. Papaleo MC, Romoli R, Bartolucci G, Maida I, Perrin E, Fondi M, *et al.* Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. N Biotechnol. 2013; doi:10.1016/j.nbt.2013.03.011
182. Sunesson AL, Nilsson CA, Carlson R, Blomquist G, Andersson B. Production of volatile metabolites from *Streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum board and tryptone glucose extract agar - Influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels. Ann Occup Hyg. 1997; doi:10.1016/S0003-4878(96)00046-4
183. Ghequire MGK, Öztürk B, De Mot R. Lectin-like bacteriocins. Frontiers in Microbiology. 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.02706
184. Parret AHA, Wyns L, De Mot R, Loris R. Overexpression, purification and crystallization of bacteriocin LlpA from *Pseudomonas* sp. BW11M1. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr. 2004; 60: 1922–1924. doi:10.1107/S09074444904020153
185. McCaughey LC, Grinter R, Josts I, Roszak AW, Waløen KI, Cogdell RJ, *et al.* Lectin-Like Bacteriocins from *Pseudomonas* spp. Utilise D-Rhamnose Containing Lipopolysaccharide as a Cellular Receptor. PLoS Pathog. 2014; 10: 1–15. doi:10.1371/journal.ppat.1003898

186. Salvucci E, Saavedra L, Hebert EM, Haro C, Sesma F. Enterocin CRL35 Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Murine Model. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; doi:10.1089/fpd.2011.0972
187. Ingham A, Ford M, Moore RJ, Tizard M. The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* 2003; doi:10.1093/jac/dkg229
188. Lopez FE, Vincent PA, Zenoff AM, Salomón RA, Farías RN. Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007; doi:10.1093/jac/dkm009
189. Castiglione F, Cavaletti L, Losi D, Lazzarini A, Carrano L, Feroggio M, *et al.* Novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synth. *Biochemistry.* 2007.
190. Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: An update. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013. doi:10.1007/s00018-012-1202-3
191. Özel B, Şimşek Ö, Akçelik M, Saris PEJ. Innovative approaches to nisin production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018. doi:10.1007/s00253-018-9098-y
192. Balsalobre LC, Dropa M, Matté MH. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2014. doi:10.1590/S1517-83822014005000033
193. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Frontiers in Public Health.* 2019. doi:10.3389/fpubh.2019.00151
194. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2008. doi:10.2807/ese.13.47.19045-en

ANEXOS

Anexo 1. Figuras complementarias.

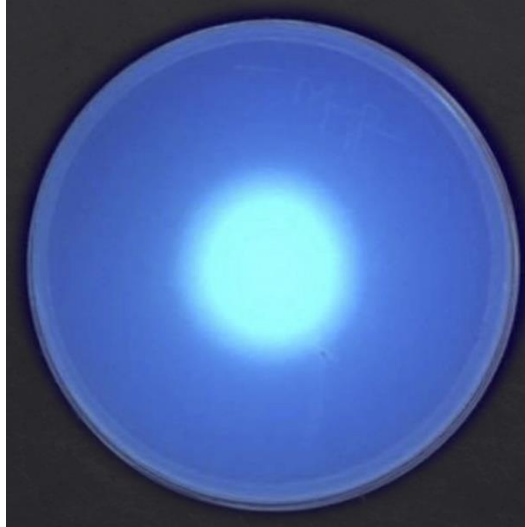


Figura 17. Fluorescencia observada bajo luz UV. *P. protegens* EMM-1 fue crecida en agar P (para aislamiento de *Pseudomonas*), medio que potencia la producción de algunos compuestos fluorescentes como la piocianina. Fuente: Cesa, C. 2016.

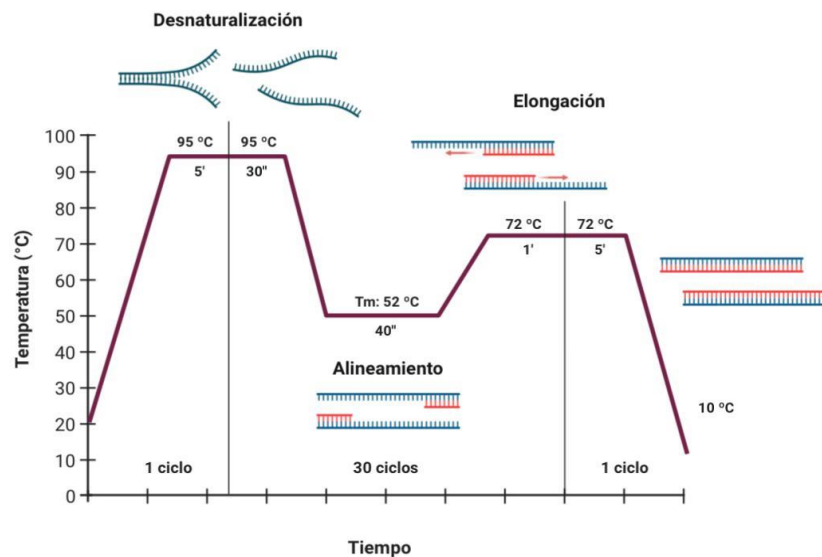


Figura 18. Protocolo de amplificación del gen *rrs* (ADNr 16S) mediante PCR. En todas las amplificaciones se utilizó el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Creado con BioRender.

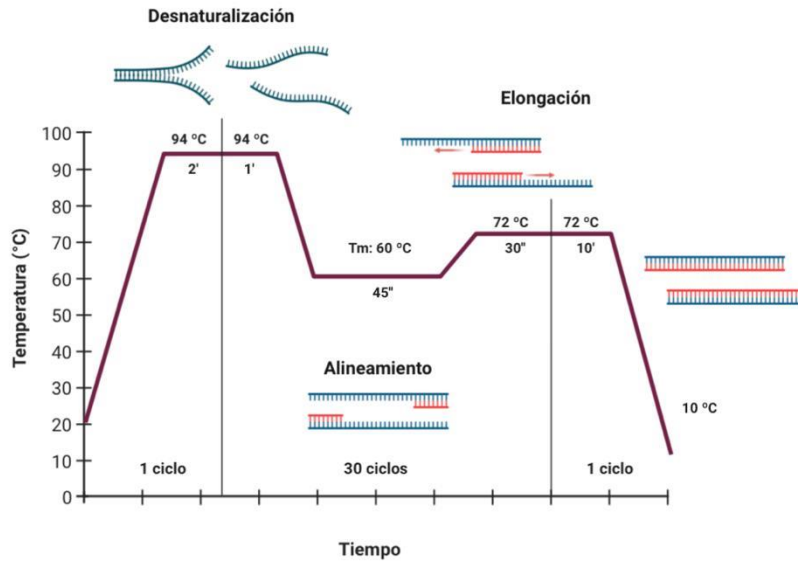


Figura 19. Protocolo de amplificación de los genes *rpoB* y *rpoD*. Creado con BioRender.

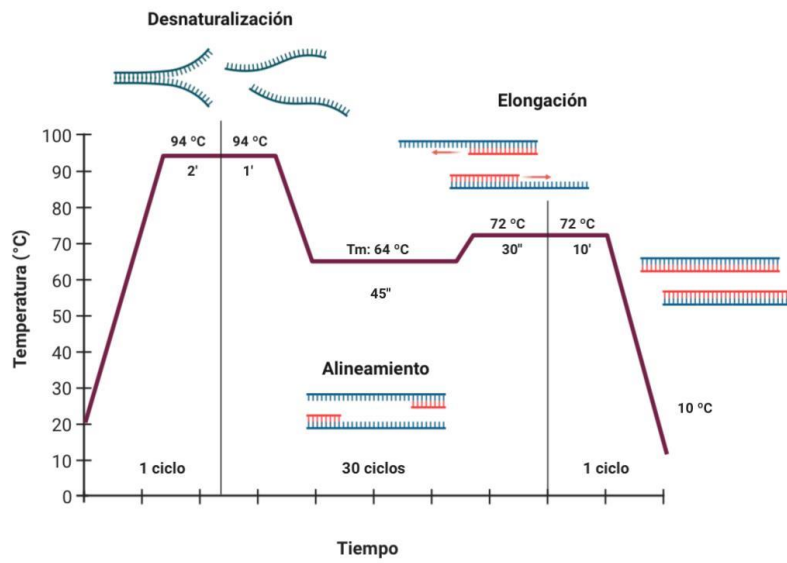


Figura 20. Protocolo de amplificación del gen *gyrB*. Creado con BioRender.

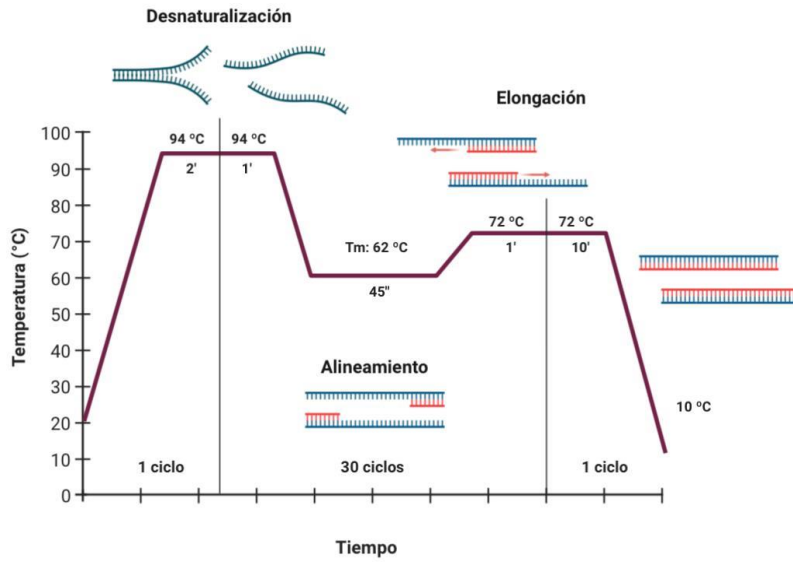


Figura 21. Protocolo de amplificación del gen *phID*. Creado con BioRender.

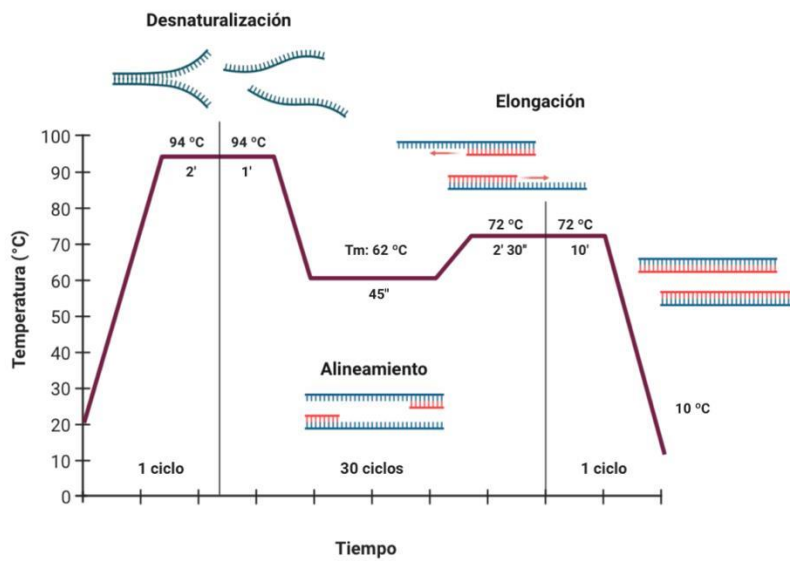


Figura 22. Protocolo de amplificación de genes del cluster de biosíntesis de pioliteorina. Creado con BioRender.

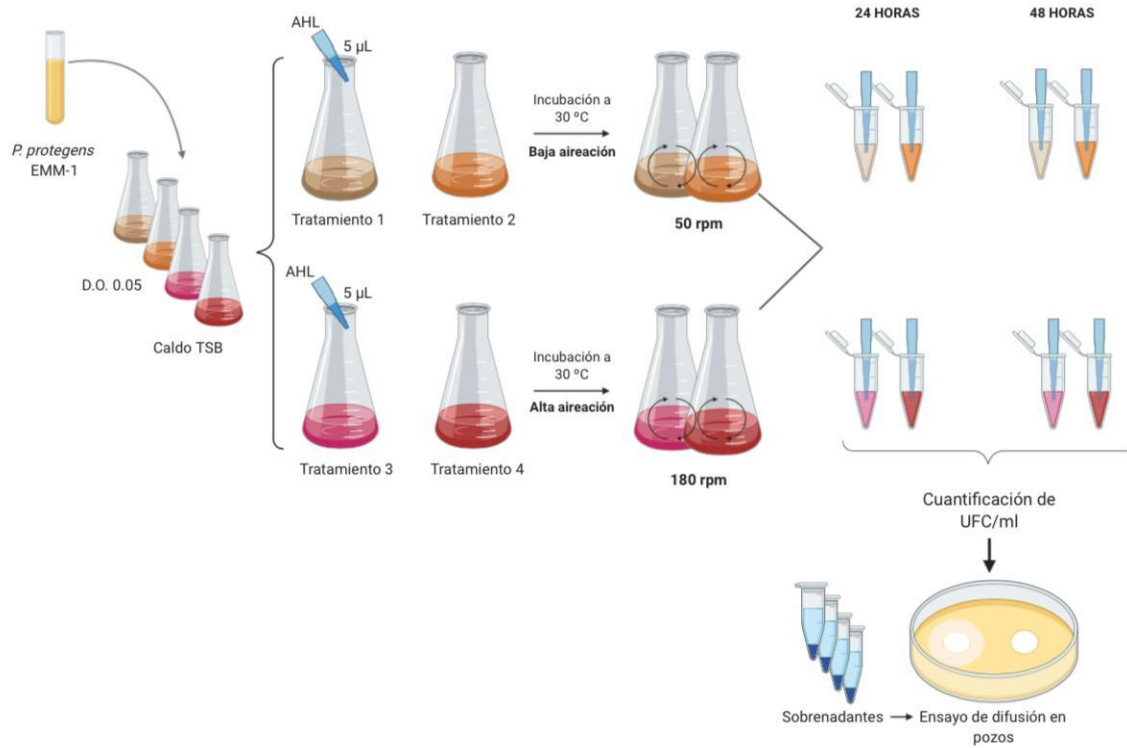


Figura 23. Protocolo de evaluación de la producción de sustancias inhibitorias en medio líquido. Creado con BioRender.

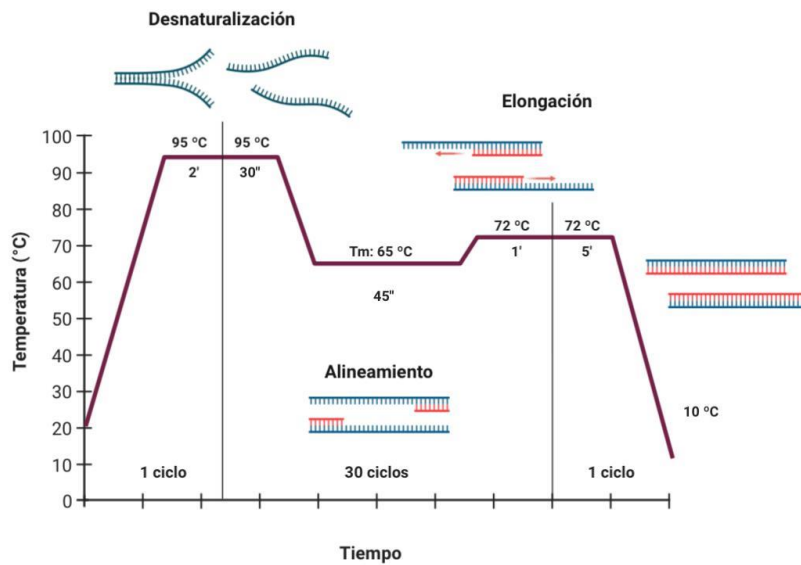


Figura 24. Protocolo de amplificación del gen *Ilpa*. Creado con BioRender.

Anexo 2. Secuencia nucleotídica del gen *rrs* (ADNr 16S) de *Pseudomonas protegens* EMM-1.

>MN959751.1 *Pseudomonas protegens* strain EMM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGCGGCAGCTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCT
AATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGC
CTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC
GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGT
TACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGC
CCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGG
AATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCA
CCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCT
AACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGC
CTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCT
GCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCT
TGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAGCG
CGAATCGTATGCGG

Anexo 3. Actividades derivadas de este proyecto de investigación.

Publicaciones científicas

1. **Cesa-Luna C**, Muñoz-Rojas J, Saab-Rincon G, Baez A, Morales-García YE, Juárez- González VR, *et al.* Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. PLoS One. 2019;14(11): 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>.
Factor de impacto: 2.875 Indexado en **JCR**
2. **Cesa-Luna C**, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, Muñoz-Rojas J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. Acta Biol. Colomb. 2020;25(1): 140–154. <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>.
Factor de impacto: 0.525 Indexado en **JCR**

Publicaciones en colaboración

1. Quintero-Hernández V, **Cesa-Luna C**, Muñoz-Rojas J. Péptidos antimicrobianos de alacrán. Alianzas y Tendencias. 2017; 2: 10–16. ISSN: 2594-0627.

Estancias de investigación

1. Estancia en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. Bajo la dirección del Dr. Lourival D. Possani Postay. Del 05 de noviembre de 2018 al 16 de noviembre de 2018.
2. Estancia internacional bajo el programa: Visiting International Research Student. University of Guelph. Department of Molecular and Cellular Biology. Guelph, Ontario, Canadá. Bajo la dirección del Dr. Steffen Graether. Del 03 de octubre de 2019 al 18 de diciembre de 2019.

Congresos

1. **Catherine Cesa-Luna**, Antonino Baez, Yolanda Elizabeth Morales-García, Rocío Pérez-y-Terrón, Jesús Muñoz-Rojas, Veronica Quintero-Hernandez. Isolation, partial purification, and antimicrobial activity of a bacteriocin-like compound produced by *Pseudomonas* sp. EMM-1. Póster. 12th International Congress on Microbial Interaction and Applications of Beneficial Microbes. 17 y 18 de julio de 2017. Munich, Alemania.
2. **Catherine Cesa-Luna**, Joel De la Cruz-Enriquez, Ana Laura Hernández-Tenorio, Fernando Xicale-Nava, Yolanda Elizabeth Morales-García, Rocío Pérez-y-Terrón, Antonino Baez, Jesús Muñoz-Rojas, Veronica Quintero-Hernandez. Antagonism of *Pseudomonas* sp. EMM-1 and its potential as biocontrol agent. Póster. International Conference on Environmental Microbiology and Microbial Ecology, and International Conference on Ecology and Ecosystems. 18-20 de septiembre de 2017. Toronto, Canadá. Se obtuvo reconocimiento al mejor trabajo de investigación (modalidad póster).
3. **Catherine Cesa-Luna**, Jesús Muñoz-Rojas, Gloria Saab-Rincón, Antonino Baez, Yolanda Elizabeth Morales-García, Víctor Rivelino Juárez-García, Verónica Quintero-Hernández. Caracterización y evaluación de péptidos antimicrobianos del veneno de *Urodacus yaschenko* contra cepas multidrogo-resistentes. 3er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas. 14-16 de agosto de 2019. Unidad de Seminarios BUAP. Puebla, México. Se obtuvo reconocimiento por obtener el 2º lugar en modalidad póster.

Cursos

1. Actualización sobre el Fortalecimiento en el Proceso de Investigación. Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias de la Salud. Xalapa, Ver. 8 y 9 de agosto de 2016. 20 horas.

2. 1er Simposio de producción y regulación de biofármacos. UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Auditorio “Alfonso Escobar Izquierdo”. Ciudad de México, CDMX. 28 y 29 de marzo de 2017.
3. Programa Internacional de Alta Capacitación: Internacionalización, liderazgo y comunicación. Next International Business School. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue. 3-7 de julio de 2017. Se obtuvo beca completa.
4. “¿Cómo escribir en inglés un artículo científico?”. Casa d'Estudis el Pont. Alicante, España. Enero-Marzo de 2020. 20 horas.

Clases impartidas

1. Sobreexpresión, purificación y cristalización de la bacteriocina LlpA de *Pseudomonas* sp. BW11M1. En apoyo al curso de Biología Molecular. Posgrado en Microbiología (Maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 3 de abril de 2018.
2. Antibiosis y el control biológico de fitopatógenos. En apoyo al curso de Biotecnología Microbiana. Posgrado en Microbiología (Maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 21 de marzo de 2019.
3. Expresión, purificación y cristalización de una proteína recombinante. En apoyo al curso de Biología Molecular. Posgrado en Microbiología (Maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2 de abril de 2019.

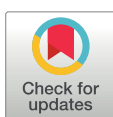
RESEARCH ARTICLE

Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria

Catherine Cesa-Luna¹, Jesús Muñoz-Rojas¹, Gloria Saab-Rincon², Antonino Baez¹, Yolanda Elizabeth Morales-García^{1,3}, Víctor Rivelino Juárez-González^{4*}, Verónica Quintero-Hernández^{1,5*}

1 Ecology and Survival of Microorganisms Group (ESMG), Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Puebla, México, **2** Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **3** Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Puebla, Puebla, México, **4** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México, **5** CONACYT-ESMG, LEMM, CICM, IC, BUAP, Puebla, Puebla, México

* rivelino@ibt.unam.mx (VRJG); vquinterohe@conacyt.mx (VQH)



OPEN ACCESS

Citation: Cesa-Luna C, Muñoz-Rojas J, Saab-Rincon G, Baez A, Morales-García YE, Juárez-González VR, et al. (2019) Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. PLoS ONE 14(11): e0222438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>

Editor: Riccardo Manganelli, University of Padova, Medical School, ITALY

Received: May 18, 2019

Accepted: August 29, 2019

Published: November 11, 2019

Copyright: © 2019 Cesa-Luna et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by JMR: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 538125/294272; JMR: Apoyo Redes del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP): 2015-2018: CA-262; JMR: Dirección de Innovación y Transferencia de

Abstract

Scorpion venom peptides represent a novel source of antimicrobial peptides (AMPs) with broad-spectrum activity. In this study, we determined the minimum bactericidal concentration (MBC) of three scorpion AMPs, Uy234, Uy17, and Uy192, which are found in the venomous glands of the *Urodoacus yaschenkoi* scorpion, against the clinical isolates of multidrug-resistant (MDR) bacteria. In addition, we tested the activity of a consensus AMP designed in our laboratory based on some previously reported IsCT-type (cytotoxic linear peptide) AMPs with the aim of obtaining higher antimicrobial activity. All peptides tested showed high antimicrobial activity against MDR clinical isolates, with the highest activity against β -hemolytic *Streptococcus* strains. The hemolytic activity was determined against human red blood cells and was significantly lower than that of previously reported AMPs. The α -helical structure of the four AMPs was confirmed by circular dichroism (CD). These results suggest that the four peptides can be valuable tools for the design and development of AMPs for use in the inhibition of MDR pathogenic bacteria. A clear index of synergism and additivity was found for the combination of QnCs-BUAP + Uy234, which makes these peptides the most promising candidates against pathogenic bacteria.

Introduction

Scorpions are arthropods belonging to the group of arachnids, which have lived on our planet for more than 400 million years. Currently, approximately 1500 species of scorpions have been described, and the study of their venoms has resulted in the discovery of a large arsenal of bio-active molecules [1]; among these molecules, toxins are distinguished by their ability to

THE IMPORTANCE OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS PRODUCED BY BENEFICIAL BACTERIA ON THE BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGENS

Importancia de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias benéficas en el biocontrol de fitopatógenos

Catherine CESA-LUNA¹, Antonino BAEZ¹, Verónica QUINTERO-HERNÁNDEZ², Joel DE LA CRUZ-ENRÍQUEZ¹, Ma Dolores CASTAÑEDA-ANTONIO¹, Jesús MUÑOZ-ROJAS¹*

¹Grupo de Ecología y Supervivencia de Microorganismos (GESM), Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Edificio IC11, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla 72570, México.

²CONACYT-GESM, LEMM, CICM, IC, BUAP, Edificio IC11, Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla 72570, México.

*For correspondence: joymerre@yahoo.com.mx

Received: 16th December 2018, Returned for revision: 08th April 2019, Accepted: 29th April 2019.

Associate Editor: Carolina Firacative.

Citation/Citar este artículo como: Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, Muñoz-Rojas J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. Acta biol. Colomb. 2020;25(1):140-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>

ABSTRACT

Bacteria produce antimicrobial compounds to compete for nutrients and space in a particular habitat. Antagonistic interactions can be evaluated by several methodologies including the double-layer agar and simultaneous inhibition assays. Among the well-known inhibitory substances produced by bacteria are the broad-spectrum antibiotics, organic acids, siderophores, antifungal, and bacteriocins. The most studied bacterial genera able to produce these inhibitory substances are *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, and *Burkholderia*. Some beneficial bacteria can promote plant growth and degrade toxic compounds in the environment representing an attractive solution to diverse issues in agriculture and soil pollution, particularly in fields with damaged soils where pesticides and fertilizers have been indiscriminately used. Beneficial bacteria may increase plant health by inhibiting pathogenic microorganisms; some examples include *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas protegens*, and *Burkholderia tropica*. However, most studies showing the antagonistic potential of these bacteria have been performed *in vitro*, and just a few of them have been evaluated in association with plants. Several inhibitory substances involved in pathogen antagonism have not been elucidated yet; in fact, we know only 1 % of the bacterial diversity in a natural environment leading us to assume that many other inhibitory substances remain unexplored. In this review, we will describe the characteristics of some antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria, the principal methodologies performed to evaluate their production, modes of action, and their importance for biotechnological purposes.

Keywords: Antagonism, antibiotic, competition, inhibition, PGPR.

RESUMEN

Las bacterias producen compuestos antimicrobianos para competir por nutrientes y espacio en un hábitat particular. Las interacciones antagónicas pueden evaluarse mediante varias metodologías, incluido el agar de doble capa y los ensayos de inhibición simultánea. Las sustancias inhibitorias mejor conocidas producidas por bacterias incluyen antibióticos, ácidos orgánicos, sideróforos, antifúngicos y bacteriocinas. Entre los géneros bacterianos más estudiados que producen sustancias inhibitorias se incluyen *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Burkholderia*. Algunas bacterias beneficiosas tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y degradar compuestos tóxicos en el ambiente, por lo que podrían incrementar el rendimiento de los cultivos y disminuir problemas de contaminación del suelo, especialmente donde los pesticidas y fertilizantes han sido utilizados