



**Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Bioquímica**

**Caracterización de bacteriocinas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y
Pseudomonas extremaustralis CMPUJ U515 en la perspectiva de
control hacia patógenos humanos**

SANDRA MILENA LANDINEZ VELANDIA

**Bogotá – Colombia
abril de 2020**



**Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Bioquímica**

**Caracterización de bacteriocinas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y
Pseudomonas extremaustralis CMPUJ U515 en la perspectiva de
control hacia patógenos humanos**

SANDRA MILENA LANDINEZ VELANDIA

Director de Tesis: Dr. Silvio Alejandro López Pazos

**Bogotá – Colombia
abril de 2020**

RESUMEN EJECUTIVO

Las bacteriocinas abarcan un gran número de péptidos sintetizados ribosómicamente por innumerable cantidad de bacterias. Estos péptidos tienen un enorme potencial como antimicrobianos de próxima generación dirigidos contra patógenos resistentes a múltiples fármacos. Las bacteriocinas son tolerantes al estrés térmico y tienen actividad en un amplio rango de pH, lo que aumenta su utilidad potencial como conservantes de alimentos o como agentes terapéuticos o biocontroladores. La biosíntesis es llevada a cabo por genes estructurales que codifican estos péptidos, aumentando su ventaja en comparación con los antibióticos convencionales, que son metabolitos secundarios. La creciente resistencia bacteriana amenaza la salud humana y animal. Las bacterias resistentes a las cefalosporinas y penicilinas más frecuentes, aisladas en los servicios de Cuidado Crítico y no Crítico son *Escherichia coli* (14.5% y 24% respectivamente) y *Staphylococcus aureus* (31.3% y 38,5% respectivamente). Se ha demostrado que *Bacillus subtilis* produce amplia gama de bacteriocinas que pueden pertenecer a los tipos de clase I, que incluye péptidos modificados postraducción o clase II péptidos pequeños estables al calor. El género *Pseudomonas sp.* sintetiza diferentes péptidos antimicrobianos para dominar sobre los otros organismos en competencia, estos péptidos conservan su actividad biológica tras el tratamiento con iones metálicos, disolventes orgánicos y diversas enzimas proteolíticas y lipolíticas. La especie *P. extremaustralis* es una bacteria Gram negativa no patógena, aislada de un estanque de la Península Antártica, muestra una alta resistencia al estrés térmico y oxidativo. Es importante investigar y caracterizar las bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 en la perspectiva de control de patógenos humanos. Se identificaron *in silico* 21 secuencias de bacteriocinas en el genoma de *B. Subtilis* ATCC 6633 y dos secuencias asociadas en el genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Las propiedades fisicoquímicas permitieron establecer el peso molecular, el punto isoeléctrico, los residuos cargados positiva y negativamente, el coeficiente de extinción, el índice de estabilidad, el índice alifático y el promedio general de hidropaticidad (GRAVY). Los productos obtenidos de PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados para recombinación homologa en levadura, dio como resultado tres productos, con una longitud de 171 y 132 pb que corresponden a las bacteriocinas Subtilina, Sublancina 168 y Subtilocina A. Se evidencio la presencia de posibles bacteriocinas en los extractos proteicos de las

dos cepas de este estudio. Finalmente se deseaba establecer el posible efecto inhibitor de crecimiento de los extractos proteicos de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515, para lo cual se realizó una prueba cualitativa con sensidiscos sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* CMPUJ 080. Desafortunadamente no se encontro actividad. En esta investigación concluimos que *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tiene potencial biocontrolador debido a sus bacteriocinas las cuales pueden clonarse mediante recombinación homologa en levadura, para analizar su funcionalidad biológica.

Palabras claves: peptidos codificados ribosomalmente, lantibioticos, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas extremaustralis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* .

Contenido

RESUMEN EJECUTIVO	3
Lista de figuras	7
Lista de tablas	8
Lista de símbolos y abreviaturas	9
Introducción	10
1 MARCO TEORICO	12
1.1 Resistencia antimicrobiana	12
1.2 Mecanismos de resistencia	13
1.5 <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.5.1 Bacteriocinas de <i>B. subtilis</i>	21
1.6 <i>Pseudomonas spp.</i>	24
1.6.1 Bacteriocinas de <i>Pseudomonas sp.</i>	24
1.7 <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	26
1.8 Recombinación homologa en levaduras	27
1.9 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GENERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 METODOLOGÍA	32

3.1 Materiales y métodos	34
3.1.1 Caracterización bioquímica <i>in silico</i>	34
3.1.2 Determinación de bacteriocinas en <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 y <i>Pseudomonas extremaustralis</i> CMPUJ U515 <i>in vivo</i> para recombinación homologa	36
3.1.3 Evaluación de extractos proteicos en <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 y <i>Pseudomonas extremaustralis</i> CMPUJ U515 sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Staphylococcus aureus</i> CMPUJ 080	37
3.1.4 Evaluación Biológica	38
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSIÓN	57
6 CONCLUSIONES	64
Anexo 1	65
Anexo 2	82
BIBLIOGRAFÍA	84

Lista de figuras

Figura 1 Transmisión y mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	12
Figura 2 Clasificación de las bacteriocinas basado en las propiedades fisicoquímicas.....	18
Figura 3. Bacteriocinas de <i>B. subtilis</i>	22
Figura 4 Vía de recombinación meiótica	29
Figura 5 Extracción de ADN genómico por el método de fenol/cloroformo.....	51
Figura 6 Productos de la amplificación por PCR de genes tipo bacteriocinas.....	52
Figura 7 Curva de calibración usando el método de Bradford para obtener la concentración de proteínas totales para <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515.	53
Figura 8 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE con tinción azul brillante de Coomassie de la extracción de proteínas totales de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515.	54
Figura 9 Prueba de susceptibilidad usando extracto proteico de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 a una concentración de 0,5 µg /µl en el sensidisco.....	55
Figura 10 Prueba de susceptibilidad usando extracto proteico de <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515 a una concentración de 0,6 µg /µl en el sensidisco.....	56

Lista de tablas

Tabla 1 Bacteriocinas determinadas a partir de revisión bibliográfica.....	34
Tabla 2 Bacteriocinas identificadas en <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515.	40
Tabla 3 <i>Parámetros bioquímicos de bacteriocinas de B. subtilis ATCC 6633 y P.</i> <i>extremaustralis CMPUJ U515.</i>	45
Tabla 4 Lista de oligonucleotidos de bacteriocinas de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>P.</i> <i>extremaustralis</i> CMPUJ U515.	49

Lista de símbolos y abreviaturas

GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)

LAB (bacterias del ácido láctico)

AMC (compuestos antimicrobianos)

RAM (resistencia antimicrobiana)

UCI (unidad de cuidados intensivos)

BGN (bacilos Gram negativos)

PE (fosfatidiletanolamina)

PG (fosfatidilglicerol)

LPS (lipopolisacárido)

LTA (ácido lipoteico)

CL (cardiolipina)

CDS (secuencias de codificación de proteínas)

ORF (marco abiertos de lectura)

PHB (polihidroxi butirato)

PCB (perfil citológico bacteriano)

DSB (roturas de doble cadena)

RH (recombinación homologa)

RPA (proteína de recombinación A)

Introducción

Una de las mayores amenazas que enfrenta la humanidad es la alarmante propagación de microorganismos resistentes a la acción farmacológica de los antimicrobianos. Anualmente se reportan 700.000 mil muertes y se estima que para el año 2050 se convertirá en una inquietante cifra de 10 millones de decesos (O'Neill, 2016). Según el reporte del sistema GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), entre 2017-2018 los patógenos aislados con mayor frecuencia y que revelan patrones de resistencia son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella spp.* (WHO, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report, 2017).

Para contener la resistencia a los antimicrobianos, la Organización Mundial de la salud (OMS) desarrolló estrategias como reducción de la carga de morbilidad y propagación de las infecciones; mejora del acceso a los antimicrobianos; mejora del uso de los antimicrobianos; fortalecimiento de los sistemas de salud y de su capacidad de vigilancia; cumplimiento de los reglamentos y de la legislación; fomento del desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas (WHO, 2001). Una alternativa prometedora para combatir la farmacorresistencia es el uso de las bacteriocinas, péptidos producidos por bacterias que son activos contra otras bacterias y contra los cuales el productor tiene mecanismos de inmunidad específicos (Dobson, 2012).

Los miembros del género *Bacillus spp.* son considerados buenos productores de sustancias antimicrobianas, incluidas las bacteriocinas, las cuales se consideran como las segundas más importantes después de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico (LAB) debido a su uso seguro en alimentos e industria (Abriouel, 2011). El potencial de la especie *B. subtilis* es de gran interés debido a que se estima que el 4-5% de su genoma se dedica a la producción de compuestos antimicrobianos (AMC), principalmente péptidos antimicrobianos, además el espectro antimicrobiano de sus bacteriocinas es más amplio que los de LAB. Su capacidad para formar endosporas, su diversidad en las propiedades fisiológicas, favorecen su distribución ubicua en el suelo, ambientes acuáticos, microbiota alimentaria e intestinal de artrópodos y mamíferos (Caulier, 2019). El género metabólicamente versátil *Pseudomonas spp.* puede colonizar nichos competitivos muy diversos, enfrentándose a los competidores con un arsenal de moléculas antagónicas, diversas desde un punto de vista estructural y en mecanismo de acción. Son habitantes comunes del suelo, el agua dulce y el medio ambiente marino. Sus especies agrupan patógenos oportunistas causante de enfermedades humanas hasta bacterias promotoras del

crecimiento de las plantas y degradadores de contaminantes ambientales. Se han identificado varias clases de bacteriocinas en *Pseudomonas spp.* incluyendo las tailocinas y las bacteriocinas de tipo S, que constituyen un grupo muy abundante en los genomas de *Pseudomonas* (Ghequire M. G., 2017).

Las bacteriocinas son un grupo único y variado de moléculas producidas por la gran mayoría de bacterias y archaea, las cuales utilizan estos péptidos como mecanismos de defensa y señalización celular. La producción de bacteriocinas agrupa varios genes implicados en la modificación de los aminoácidos, la exportación y la regulación de la bacteriocina, así como la autoinmunidad. Estos genes pueden estar localizados en el cromosoma o en un plásmido. Por lo general, el espectro de actividad ejercido por las bacteriocinas de las bacterias Gram negativas es más estrecho que el producido por las bacterias Gram positivas (Ben Lagha, 2017). *Lactococcus lactis* sintetiza la bacteriocina nisina que ataca la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas. La lisostafina de *Staphylococcus simulans*, es activa hacia *S. aureus* a través de la lisis de la pared celular. La colicina de *E. coli* ejerce biocontrol sobre las bacterias Gram negativas al formar poros en la membrana, inhibir la biosíntesis de proteínas y ejercer la actividad de la nucleación del ADN (Chikindas, 2018). El esquema universal de clasificación de las bacteriocinas propuesta por Heng y Tagg, 2006; se basa en su estructura y modo de acción (Heng, 2006). Las cuatro clases incluyen bacteriocinas clase I (lantibióticos) péptidos de baja masa molecular (2-5 kDa) producidos por bacterias Gram positivas, termoestables y resistentes a pH extremos y a ciertas proteasas. Las bacteriocinas de clase II (no lantibióticos) son péptidos termostáticos pequeños (<10 kDa) con una estructura helicoidal anfifílica que no contiene residuos de aminoácidos modificados. Las bacteriocinas de clase III incluyen péptidos grandes y termolábiles (>10 kDa). Por último, las bacteriocinas de clase IV son péptidos circulares que poseen un amplio espectro de actividad y exhiben una alta resistencia al calor, pH extremos y enzimas (Ben Lagha, 2017). El aislamiento y caracterización de las bacterias productoras de bacteriocinas tendría un impacto positivo en un futuro cercano para la aplicación medicinal al permitir el desarrollo de antibióticos de próxima generación, allana el camino para otras aplicaciones, como las nuevas moléculas transportadoras (sistemas de administración) y el tratamiento del cáncer. (Arumugam, 2019)

1 MARCO TEORICO

1.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de un microorganismo (bacteria, virus, hongo o parásito) de permanecer refractario a la acción de los antimicrobianos (INS, Resultados del Programa de Informe de Resultados de la Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2017, 2017). La transmisión y los mecanismos de la resistencia a los antibióticos pueden dividirse en resistencia adaptativa, resistencia innata y resistencia adquirida. Los factores ambientales pueden provocar cambios fisiológicos y conducir a: 1) elevadas tasas de mutación; 2) cambios en los genes metabólicos y los procesos reguladores; y 3) una serie de mecanismos clásicos de inactivación y resistencia a los antibióticos que implica la modificación enzimática, la destrucción del antibiótico a través de enzimas modificadoras de antibióticos, cambios en la permeabilidad celular y el flujo de salida con bombas de flujo bacteriano. Esa resistencia puede compartirse potencialmente entre las bacterias provocando la resistencia adquirida. Los mecanismos y transmisión se resumen en la figura 1. (Schroeder M. B., 2017)

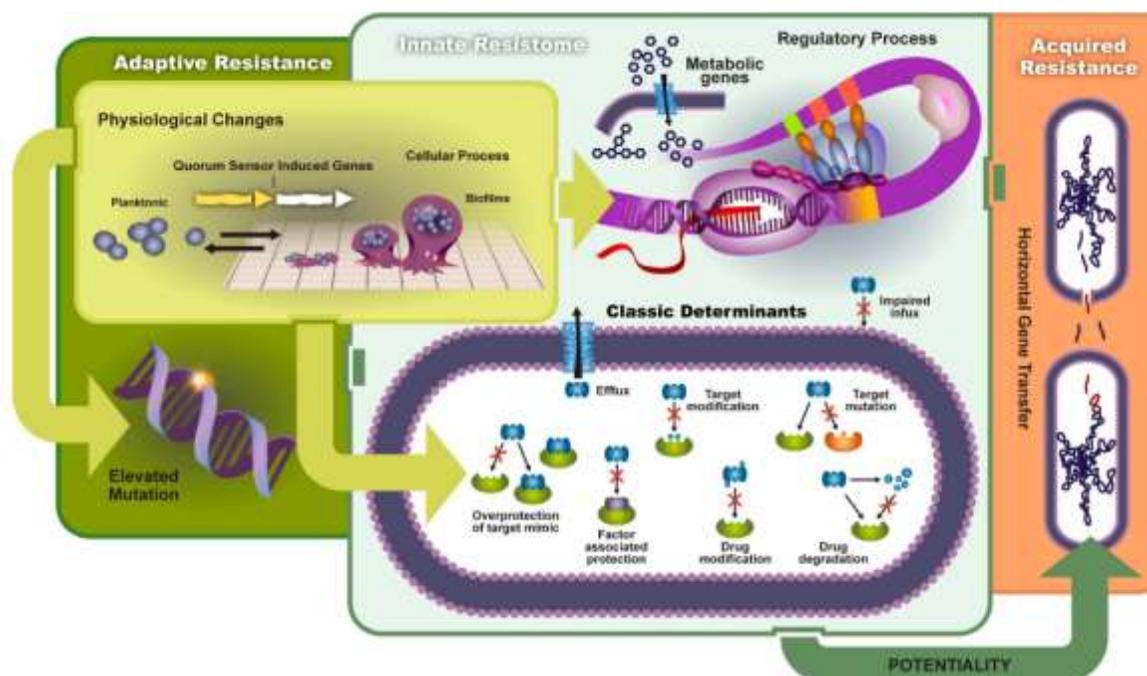


Figura 1 Transmisión y mecanismos de resistencia a los antibióticos. (Tomado de Schroeder, Brooks, & Brooks, 2017).

Los genes para el mecanismo de resistencia están localizados sobre el cromosoma o sobre piezas circulares de ADN independientes del cromosoma llamados plásmidos. Una vez las bacterias adquieren la característica de resistencia, ésta puede pasarse verticalmente de madre a hija, la cual origina clones con dicha característica u horizontalmente a otras bacterias por mecanismos de transformación, transducción, o transposición y conjugación. La presión de determinado antibiótico en un medio favorece que las poblaciones de bacterias con una característica de resistencia se multipliquen y prevalezcan en el ambiente (Restrepo, 2003). Los seres humanos nos exponemos a patógenos resistentes por contacto corporal, contacto indirecto, aerosoles y alimentos que transportan el patógeno (Bengtsson-Palme, 2018). La propagación rápida de los agentes infecciosos farmacorresistentes se debe al aumento masivo del comercio y los movimientos humanos como consecuencia de la globalización. El costo de la atención de la salud en todo el mundo, la eficacia de ciertos tratamientos y el aumento de la mortalidad por enfermedades infecciosas se ve influenciado por causa de la resistencia a los antimicrobianos. La Estrategia Mundial de la OMS define como uso apropiado de los antimicrobianos el uso eficaz en relación con el costo de los antimicrobianos con el cual se obtiene el máximo efecto clínico-terapéutico y simultáneamente se minimiza la toxicidad del medicamento y el desarrollo de resistencia microbiana (WHO, 2001)

1.2 Mecanismos de resistencia

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos dentro de los que se encuentran:

- **Inhibición enzimática:** la bacteria produce enzimas que a través de procesos de hidrolización, acetilación, fosforilación o adenilación alteran o inactivan el antibiótico (las más comunes son las que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos) (Winn, y otros, 2008).
- **Alteración de sitios de unión de la molécula blanco:** impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr23S (macrólidos) de las enzimas PBP (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos) (Daza Pérez, 1998).

- Restricción de la entrada del antibiótico a la célula: producción de porinas (proteínas integrales de membrana de las bacterias) restrictivas al paso de antibióticos que disminuyen la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano (INS, Resistencia Bacteriana A Los Antimicrobianos En El Ambito Hospitalario, 2018).
- Expulsión activa del antibiótico: Mecanismo de bombas de flujo, donde se expulsa el antimicrobiano hacia el exterior gracias a una proteína transportadora dependiente de ATP que cataliza el eflujo disminuyendo su acumulación en la célula (Restrepo, 2003) .

1.3 Epidemiología

En todos los países del mundo, la resistencia bacteriana es un problema de salud pública. Los mayores porcentajes de resistencia bacteriana se observan en Latinoamérica comparado con datos de países más desarrollados como Estados Unidos, Canadá, y países europeos. Este comportamiento se ve favorecido por la exposición excesiva e innecesaria de las bacterias a los antibióticos por el uso y formulación inadecuada, la venta sin control, las condiciones propias de centros hospitalarios y la comunidad que facilita el desarrollo y la propagación de los microorganismos resistentes y las limitaciones de las pruebas de laboratorio “in vitro” para detectar la aparición de cepas resistentes (Restrepo, 2003).

Las Américas, Europa, África y Asia, reportan para *E. coli* una elevada resistencia a cefalosporinas de tercera generación, antibiótico que inhibe la síntesis de pared celular y fluoroquinolonas, antibiótico que interfiere con la síntesis de ADN al unirse a la girasa. Para el caso de las Américas, el tratamiento con los antibióticos habituales no ha sido efectivo, ya que en algunos entornos reportan hasta un 90% de las infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina y para Asia se estima un 25%. El Pacífico Oriental reporta situación de resistencia de *E. coli* a las fluoroquinolonas, así como hasta un 80% de las infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina (Minsalud, 2018).

La situación de la resistencia antimicrobiana (RAM) en Colombia está en consonancia con el interés que esta problemática ha suscitado a nivel mundial, en Colombia se ha identificado la relevancia de la resistencia a los antimicrobianos. Algunos casos comunes dan cuenta de esto, como es el frecuente hallazgo de infecciones dentro de los servicios de hospitalización, cuya resistencia a antimicrobianos de gran importancia terapéutica como son los carbapenémicos, antibióticos de

más amplio espectro disponible actualmente, sigue en aumento. Este hecho resulta preocupante toda vez que implica un aumento en la morbilidad y mortalidad, aumenta costos en la atención en salud y resulta en riesgo de causar brotes (Minsalud, 2018). Los datos presentados corresponden a la vigilancia por laboratorios que realiza el Instituto Nacional de Salud, se analizaron los aislamientos bacterianos de infecciones asociadas a la atención en salud entre el periodo de septiembre de 2012 a diciembre de 2018 se recibieron un total de 4599 aislamientos, distribuidos, 4813 bacilos Gram negativos (BGN) y 262 cocos Gram positivos. La frecuencia de microorganismos en el servicio de unidad de cuidados intensivos (UCI) adulto mostró que *K. pneumoniae* y *E. coli* (17,4% y 17,2%) fueron los microorganismos más frecuentes; en UCI pediátrica fueron *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* (13,4%, 12,3% y 11,7%) y en UCI neonatal fueron *S. epidermidis*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (21,2%, 14,9% y 14,4%). Para el servicio de hospitalización adulto se observó que *E. coli* y *K. pneumoniae* (28,4% y 12,1%) fueron los más frecuentes mientras que en hospitalización pediátrica fueron *E. coli* y *S. aureus* (31,9% y 16,1%). En cuanto al perfil de resistencia en UCI adulto y pediátrica, *E. coli* presenta porcentajes resistencia a cefalosporinas de tercera generación que oscilan entre 14,5% y 31%, mientras que en UCI neonatal se presentaron porcentajes más bajos que estuvieron en el rango de 6,4% a 13,7%. Para *S. aureus* el servicio UCI pediátrica reportó el porcentaje más alto de resistencia a oxacilina (41,1%), seguido del servicio UCI neonatal (41,1%) y UCI adulto (31,3%). En hospitalización adulto, *E. coli* presenta resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación con porcentajes que alcanzaron 24% y en hospitalización pediátrica 14,1%. Para *S. aureus*, el servicio de hospitalización pediátrica reportó un porcentaje de resistencia a oxacilina que alcanzó 45,7%, mientras que en hospitalización adulto el porcentaje reportado fue de 38,5% (INS, 2019).

1.4 Bacteriocinas

En la naturaleza existen importantes compuestos bioorgánicos, en los cuales las sustancias antimicrobianas ocupan un lugar especial. La mayoría de los organismos vivos producen variedad de compuestos antimicrobianos (AMC), entre los que se destaca un grupo menor y poco estudiado: las bacteriocinas, producidas por las bacterias cuya estructura química las destaca por su complejidad entre todos los AMC (Vasilchenko, 2018). En 1925 Gratia identificó y reportó por primera vez una proteína antimicrobiana producida por *E. coli*. En 1953, Jacob y colaboradores plantearon el término bacteriocinas para referirse a las sustancias proteicas con actividad

antimicrobiana de origen bacteriano; luego, en 1976, Tagg y colaboradores las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida (Agudelo Londoño, 2015). Las bacteriocinas de las bacterias Gram negativas tienen un espectro de actividad estrecho, inhibiendo el crecimiento de especies bacterianas similares o estrechamente relacionadas y las bacteriocinas de bacterias Gram positivas muestran actividad antimicrobiana contra una amplia gama de géneros (espectro amplio). (Ben Lagha, 2017)

Las bacteriocinas a lo largo de los años han sufrido diversos cambios en cuanto a su clasificación de acuerdo con sus características bioquímicas, genéticas, peso molecular, estabilidad al calor y a las enzimas proteolíticas, presencia o ausencia de modificación postraducción de aminoácidos y acción antimicrobiana (figura 2). (Ahmad, 2017)

En 2006 Heng y Tagg, realizaron una clasificación universal que incluye las bacteriocinas de bacterias Gram positivas y Gram negativas organizándolas en cuatro grupos: Las bacteriocinas llamados lantibióticos de clase I, pequeños (<5 kDa) producidos por bacterias Gram positivas, termoestables, y resistentes a pH extremos y ciertas proteasas (Heng, 2006). La característica principal de estas clase de bacteriocina es la presencia de aminoácidos atípicos postraduccionalmente modificados enzimáticamente como la lantionina, metil lantionina, deshidroalanina y deshidrobutirina (Ben Lagha, 2017). Las bacteriocinas de la subclase Ia son alargadas de carga positiva, la nisina es un miembro de este grupo. En la subclase Ib las bacteriocinas son característicamente globulares, inflexibles, con carga negativa o sin carga neta. Inhiben varias enzimas catalíticas necesarias para completar los procesos de mantenimiento de la vida de las bacterias susceptibles, estas bacteriocinas, incluyen lacticina 481, citolisina y salivaricina (Ahmad, 2017). Los lantibióticos tienen un doble modo de acción contra las bacterias susceptibles interfiriendo con la síntesis de la pared celular al unirse al lípido II, el principal transportador de subunidades de peptidoglucano, además, también pueden usar el lípido II como molécula de acoplamiento, lo que conduce a la formación de poros y la muerte celular. (Ben Lagha, 2017)

Las bacteriocinas de la clase II no lantibióticos, pequeños (<10 kDa) termoestables, con una estructura helicoidal anfifílica que no contiene estructuras modificadas con puntos isoeléctricos (pI) que varían de 8,3 a 10,0 (Ahmad, 2017). Su mecanismo de acción es similar a la clase I. Esta clase se agrupa en tres subclases: la bacteriocina subclase IIa (similar a las pediocinas) presentan

una serie de características que se relacionan con la presencia de grupos particulares de residuos altamente conservados: un alto contenido de residuos de aminoácidos no polares y aminoácidos pequeños como la glicina, que se cree que confiere a estas bacteriocinas un alto grado de libertad de conformación (Ennahar, 2000). El dominio N-terminal hidrofílico altamente conservado Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu (conocido como el motivo YGNGV o "caja de pediocina") (Heng, Wescombe, Burton, Jack, y Tagg, 2007), contrasta claramente con el dominio C-terminal hidrofóbico y/o anfifílico moderadamente conservado, y esta variación afecta la actividad bacteriocina en las membranas de las células diana (Ennahar, Sashihara, Sonomoto, & Ishizaki, 2000); muestran una fuerte actividad inhibitoria contra el patógeno alimentario *Listeria monocytogenes*. Las bacteriocinas representativas de este grupo son leucocina A, acidocina A, mesentericina, pediocina PA-1 y sakacina (Ahmad, 2017). La subclase IIb contienen péptidos lineales heterogéneos y para ejercer su acción antibacteriana requieren dos o más péptidos (Ben Lagha, 2017), cuando se prueban solos estos péptidos, tienen poca o ninguna actividad como por ejemplo las bacteriocinas lactococcina G y plantaricina (Ahmad, 2017); y la subclase IIc comprenden bacteriocinas que requieren dos péptidos en cantidades aproximadamente iguales para ejercer su actividad antibacteriana. Cada par de péptidos, que difiere en su secuencia de aminoácidos, está codificado por dos genes ubicados en el mismo operón (Ben Lagha, 2017); se dividen a su vez en dos grupos, los tiolbióticos y los cistibióticos. Los tiolbióticos son bacteriocinas con dos residuos de cisteína, mientras que las bacteriocinas con un residuo de cisteína son cistibióticos. La lactococcina A, la divergina A y la acidocina B son bacteriocinas de clase IIc (Ahmad, 2017).

La clase III bacteriocinas lábiles al calor, grandes (>30 kDa) se dividen en dos subclases: péptidos bacteriolíticos (IIIa) y no líticos (IIIb). El modo de acción de los péptidos bacteriolíticos se basa en la hidrólisis del peptidoglucano (estructura básica de la pared celular de las bacterias), lo que produce la lisis y la muerte de las células diana. Los péptidos no líticos, como su nombre lo indica, no causan lisis celular (Ben Lagha, 2017). Por ejemplo, la helveticina J de *Lactobacillus helveticus* 481, la disgalacticina de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* W2580 y la estreptococcina A-M57. Se ha estudiado el modo de acción de la disgalacticina y se ha llegado a la conclusión de que esta bacteriocina interfiere en el metabolismo de la glucosa por vía transitoria al unirse al sistema de transporte de la glucosa dependiente del fosfoenolpiruvato y la fosfotransferasa de la manosa (Ahmad, 2017).

La clase IV comprende proteínas complejas compuestas de una o más variedades químicas (Zou, 2018). Son péptidos circulares modificados postraduccionalmente caracterizados por su enlace covalente en el extremo N a C terminal, formando un esqueleto de péptido circular estructuralmente conservado. Se sintetizan como precursores lineales, que contienen una secuencia líder de tamaño variable la cual se separa durante la maduración. Los péptidos circulares maduros varían de 58 a 70 residuos de aminoácidos, correspondientes a masas de aproximadamente 5.6 a 7.2 kDa. En el momento, las bacteriocinas circulares que se han identificado son producidas por bacterias Gram positivas principalmente bacterias del ácido láctico, pero algunas también de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Gabrielsen, 2014). Poseen un amplio espectro de actividad y exhiben alta resistencia al calor, pH extremos y enzimas proteolíticas. Estas bacteriocinas generalmente ejercen su acción antibacteriana al alterar la integridad de la membrana (Ben Lagha, 2017). La plantaricina S y la leuconocina S contienen una porción de lípidos o carbohidratos sensibles a las enzimas glicolíticas o lipolíticas. (Ahmad, 2017)

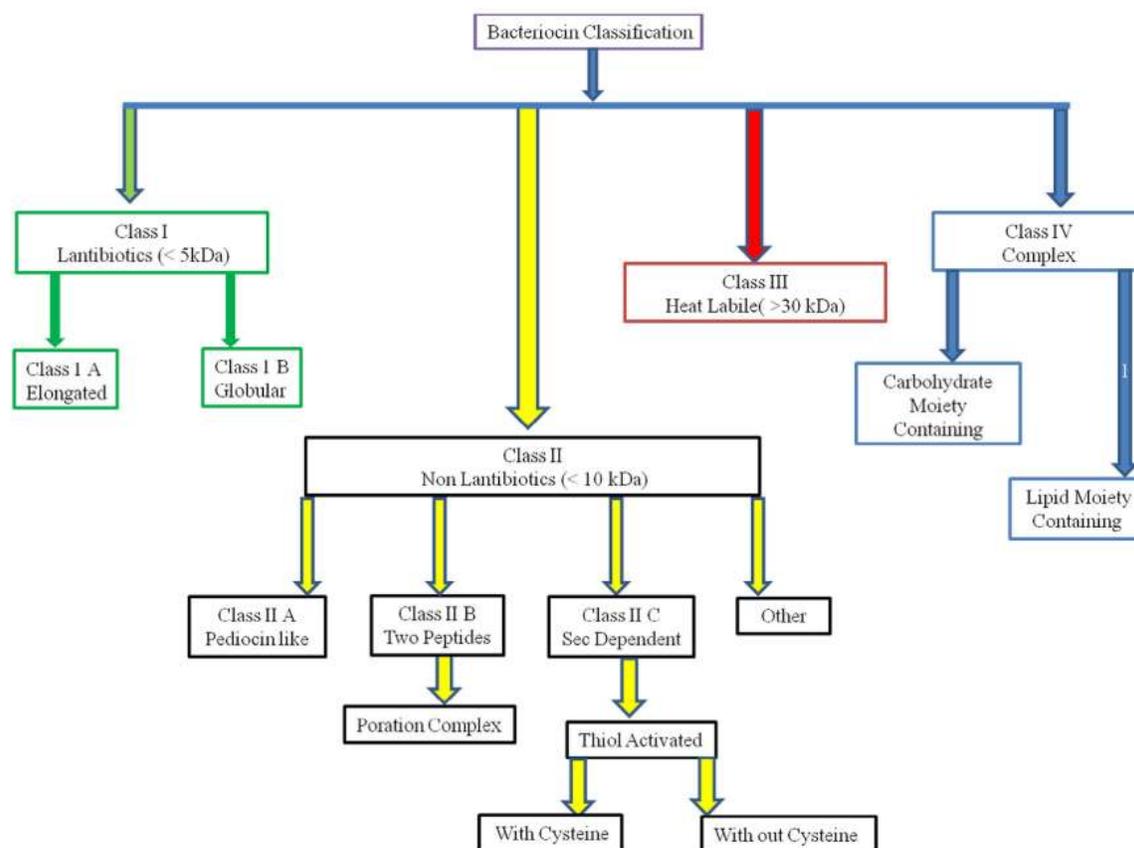


Figura 2 Clasificación de las bacteriocinas basado en las propiedades fisicoquímicas. (Tomado de Ahmad, 2017)

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora; está dirigida por genes agrupados en operones situados en el genoma, plásmido u otro elemento genético móvil. Para que estos operones se expresen es necesario que se presenten péptidos auto inductores (Kumariya, 2019) o estimulantes de la competencia, que impulsan la formación de bacteriocinas que invaden el nicho ecológico del intruso (Chikindas, 2018). El péptido precursor de la bacteriocina contiene un péptido líder N-terminal y un péptido central C-terminal. Sin embargo, hay algunas excepciones a esta regla, como la botromicina (bacteriocina de *Streptomyces sp.*) que contiene una extensión C-terminal para su eliminación y las bacteriocinas sin secuencia líder. La secuencia líder desempeña un papel importante en la orientación del precursor desde el comienzo del proceso hasta la maduración final, mediante la interacción y el reconocimiento por parte de enzimas y receptores de señal de transporte con un diseño de doble glicina en el punto de clivaje C-terminal que ayuda al péptido a transportarse al exterior de la célula a través de un sistema de transporte ABC (Zheng, 2018). Además, la secuencia líder también protege al péptido precursor de la degradación y lo mantiene en forma inactiva durante el proceso, a través de un sistema de autoprotección para que no cause daño a la bacteria misma (Ahmad, 2017). Sin embargo, la bacteriocina 31 y la enterocina P carecen del diseño de doble glicina en su estructura peptídica y son transportadas por una vía secretoria general dependiente de la secreción (Ennahar, 2000). La bacteriocina catiónica, una vez sale, se dirige a su célula bacteriana objetivo y aprovecha que la superficie de la célula es de propiedad aniónica compuesta de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteico (LTA) y cardiolipina (CL) e interactúan electrostáticamente con la superficie de la célula bacteriana, se alinean hacia la membrana y atraviesan la bicapa lipídica perforándola. Después, los péptidos se asocian o polimerizan para formar complejos que inducen la permeabilización de la membrana celular de la bacteria objetivo, ya sea formando poros selectivos de iones que causan la disipación de la fuerza motriz de los protones y el agotamiento del ATP intracelular, desencadenando la fuga de los sustratos intracelulares y la eventual muerte (Kumariya, 2019). En la biosíntesis de las bacteriocinas Gram negativas funciona un sistema promotor SOS que está compuesto por un gen *recA* inducible (Ahmad, 2017). Matsui y colaboradores (1993) describieron una caja P en la región promotora en lugar del sistema SOS. El activador transcripcional PrtN se une a la caja P e induce la expresión de los genes de la piocina (Matsui, 1993). Las bacteriocinas producidas por las

bacterias Gram negativas como la colicina tiene como mecanismo de destrucción, la formación de poros en la membrana. La colicina A muestra la inhibición de la biosíntesis de las proteínas y ejerce la actividad de la nucleación del ADN. Además, la pesticina, una bacteriocina de alto peso molecular (39,9 kDa), mata a las bacterias Gram negativas *Yersinia spp.* y *E. coli* por degradación de la pared celular al romper los enlaces glucosídicos de la pared celular (Ahmad, 2017).

Durante muchos años se ha aplicado las bacteriocinas en la industria de alimentos, inhibiendo el crecimiento de patógenos que contamina los alimentos listos para el consumo humano, este enfoque aplica utilizando la bacteriocina en su forma más purificada para conservar el alimento; otro enfoque es la incorporación de bacteriocinas en la película o superficies de envasado de alimentos (Perez, Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications, 2014). La disminución en el repertorio de antibióticos y la creciente aparición de agentes patógenos resistentes a múltiples fármacos ha desencadenado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos alternativos como las bacteriocinas, una alternativa viable a los antibióticos convencionales (Perez, 2018); donde los métodos de ingeniería genética como la mutagénesis, la fusión de genes e inserciones se han utilizado para diseñar bacteriocinas con mayor estabilidad y mayor espectro de actividad (Ahmad, 2017). Algunas bacteriocinas seleccionadas mostraron cierto potencial como agentes antivirales, agentes antiparasitarios contra protozoarios del género *Leishmania*, promotores del crecimiento de las plantas y como agentes anticancerígenos. La rápida expansión de la investigación dedicada a las bacteriocinas, tanto en calidad como en cantidad, nos permitirá en un futuro cercano crear enfoques novedosos para incrementar su potencialidad (Perez, 2018).

1.5 *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus sp.* comprende 377 especies de bacterias grampositivas en forma de bastón. Su capacidad para formar endosporas, su diversas propiedades fisiológicas, así como su capacidad para producir numerosos compuestos AMC, favorecen su distribución ubicua en el suelo, ambientes acuáticos, alimentos y microbiota intestinal de artrópodos y mamíferos (Caulier, 2019).

La especie *B. subtilis* es una bacteria aeróbica que consisten en pequeñas células vegetativas (<1 μm de ancho), que se encuentran comúnmente en el suelo, las fuentes de agua y en asociación con las plantas. Su bioquímica, fisiología y genética se han estudiado intensamente durante más de

40 años. En condiciones de agotamiento de nutrientes *B. subtilis* deja de crecer y desencadena respuestas para restaurar el crecimiento, aumentando la diversidad metabólica. Si estas respuestas no logran restablecer el crecimiento, las células son inducidas a formar endosporas químicamente resistentes a la irradiación y a la desecación. En un proceso de desarrollo alternativo, *B. subtilis* también puede diferenciarse en un estado fisiológico, el estado competente, que le permite sufrir una transformación genética. El cromosoma de *B. subtilis* tiene 4.214.810 pares de bases (pb). Se han identificado más de 4.000 secuencias de codificación de proteínas (CDS), con un tamaño promedio de 890 pb, que cubre el 87% de la secuencia del genoma (Kunst, 1997). Se estima que al menos 4–5% de su genoma se dedica a la producción de compuestos AMC (Abriouel, 2011) donde la clase predominante son los péptidos AMC. Exhiben estructuras altamente rígidas, hidrófobas y/o cíclicas y generalmente son resistentes a la hidrólisis por peptidasas y proteasas (Stein, 2005).

1.5.1 Bacteriocinas de *B. subtilis*

B. subtilis sintetiza la bacteriocina clase I subtilina, definida como lantibiótico, catiónico pentacíclico de 32 aminoácidos (figura 2) El gen que codifica el péptido de subtilina codifica un péptido precursor de 56 residuos que se procesa para producir un péptido maduro de 32 residuos la subtilina, con una masa molecular de 3319.56 Da. El precursor contiene serina, treonina y residuos de cisteína en posiciones que le permiten someterse a una serie de etapas de deshidratación y de reticulación, para producir el subtilina madura, que contiene los aminoácidos inusuales lantionina, β -metil lantionina, D-alanina, deshidroalanina y deshidrobutirina. La secuencia líder de subtilina comparte 57% de identidad de aminoácidos con la secuencia líder de nisina Z, mientras que las proporciones de nisina Z y subtilina tienen 61% de identidad. Debido a esto la subtilina tiene una gran similitud estructural con la nisina y sus respectivos grupos de genes biosintéticos al codificar proteínas muy similares. El locus del gen de la subtilina incluye el gen estructural *SpaS*, que codifican el precursor de la subtilina, y también los genes que codifican las proteínas involucradas en la modificación postraducciona de la subtilina precursora, es decir, *SpaB* que codifica una deshidratasa y *SpaC* una ciclasa. El grupo también incluye genes para la secreción del precursor modificado (*SpaT*, que codifica el transportador) y la inmunidad a las subtilinas está mediada por la lipoproteína *SpaI* y el translocador ABC *SpaFEG* (Abriouel, 2011). La biosíntesis

de subtilina está regulada por un mecanismo de retroalimentación positiva en el que la subtilina extracelular activa el sistema regulador de dos componentes *SpaK* (sensor histidina quinasa) y *SpaR* (proteína reguladora) que se une a una región de ADN promoviendo la expresión de genes para la biosíntesis de subtilina. Por lo tanto, la producción de subtilina parece ser de doble control, a la densidad de cultivo en un mecanismo de detección de quórum en el que la subtilina desempeña un papel de tipo feromona y en respuesta a la fase de crecimiento (Stein, 2005).

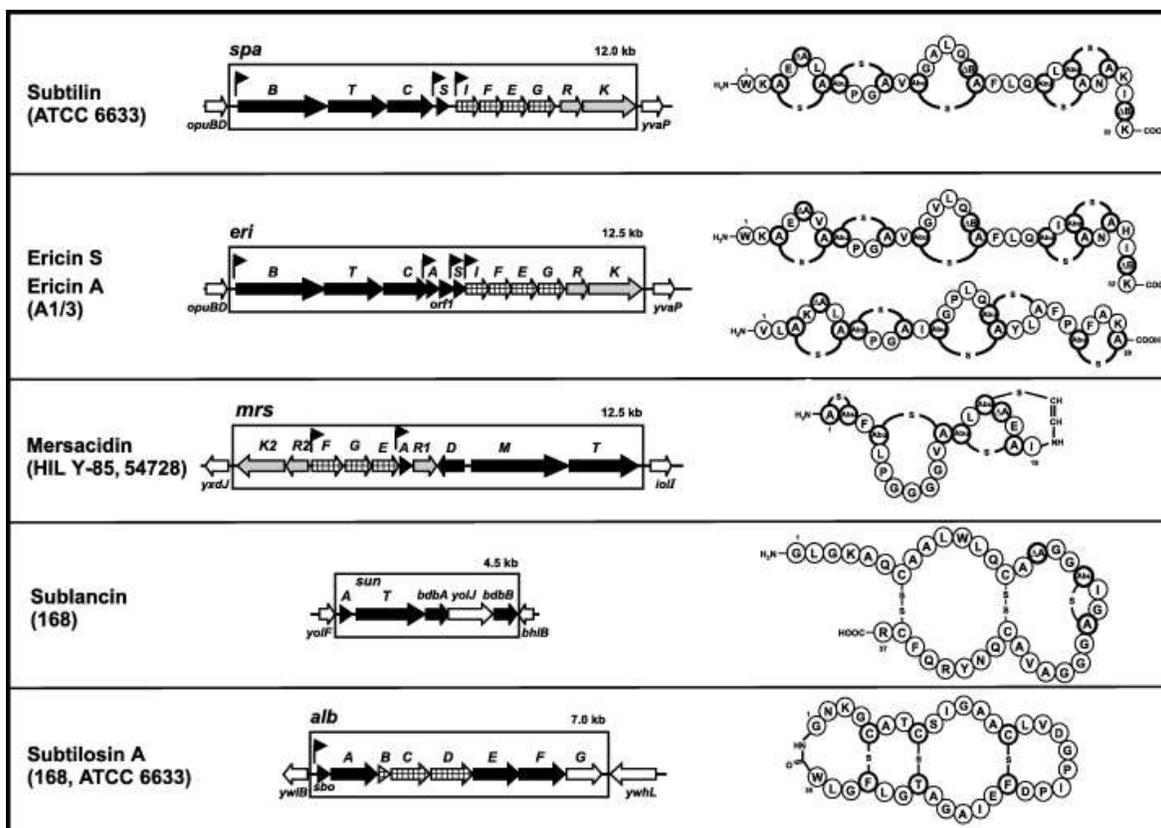


Figura 3. Bacteriocinas de *B. subtilis*: lantibióticos, péptidos similares a los lantibióticos, péptido circular y grupos específicos de genes. En el recuadro se observan la organización del grupo de genes que codifican péptidos lantibióticos y similares a los lantibióticos, al lado derecho se observa la representación esquemática de la estructura de los péptidos maduros. Códigos de color: negro, genes estructurales y genes que especifican proteínas involucradas en la modificación y el transporte postraduccional; genes reguladores grises; cajas llenas son genes de inmunidad. Los números corresponden al tamaño de los grupos de genes (kb). (Tomado de Stein, 2005)

Ericina S (3442 Da) y ericina A (2986 Da) hacen parte de la clase I, son dos lantibióticos producidos por *B. subtilis* A1/3 con fuertes similitudes con la subtilina (Figura 2). Las ericinas purificadas (principalmente la ericina S) son activas contra una variedad de bacterias. Aunque los precursores de las ericinas S y A muestran solo un 75% de identidad, los péptidos lantibióticos maduros revelan propiedades muy similares. Ericina S solo se diferencia de la subtilina por cuatro aminoácidos residuales provocando que la actividad antimicrobiana y las propiedades fisicoquímicas sean similares a la subtilina. Ericina A tiene anillos de organización diferente y 16 sustituciones de aminoácidos en comparación con ericina S. Ericina A se diferencia por dos anillos C-terminales del patrón de lantionina de la subtilina, y quizás por esta razón, tiene una actividad antimicrobiana mucho menor. El grupo de genes de ericina contiene dos genes estructurales (*eriA*, *eriS*), y los marcos abiertos de lectura (ORF) están estrechamente relacionados con los genes correspondientes del grupo de subtilinas. Ambas ericinas se producen en cantidades iguales y comparten la sintetasa única (EriBC), lo que refleja la flexibilidad de las vías lantibióticas (Abriouel, 2011). La mersacidina lantibiótica clase I, es un péptido tetracíclico de 1824 Da.; posee cuatro anillos intramoleculares que le confieren una estructura globular a la molécula (Figura 2): dos separados en la parte N-terminal y dos entrelazados en la parte C-terminal. Inhibe la biosíntesis de la pared celular al unirse al lípido II. El grupo de genes de mersacidina comprende el gen estructural *mrsA*, así como los genes involucrados en la modificación postraduccional (*mrsM* y *mrsD*), transporte (*mrsT*), inmunidad (*mrsFEG*) y regulación (*mrsR1*, *mrsR2*, *mrsK2*). En el comienzo de la fase estacionaria de *B. subtilis* ocurre la producción de mersacidina; sin embargo, aún se desconoce el vínculo entre los sistemas reguladores de mersacidina y la red de regulación celular de *B. subtilis* (Stein, 2005).

Sublancina 168 (3877.78 Da) es un lantibiótico, clase I codificado cromosómicamente por *B. subtilis* 168. Contiene un enlace de lantionina único y dos puentes disulfuro (Figura 2). Exhibe actividad bactericida contra otras bacterias Gram positivas, incluidos patógenos importantes como *B. cereus*, *S. pyogenes* y *S. aureus*. El operón responsable de la producción de sublancina 168 e inmunidad contiene cinco genes: el gen estructural *sunA* y cuatro genes sucesivos (*sunT*, *bdbA*, *yolJ* y *bdbB*) ubicado corriente abajo de *sunA* (Abriouel, 2011).

Subtilosina A pertenece a la clase IV, es un péptido macrocíclico, aniónico, sintetizado por *B. subtilis* ATCC 6633 y otras cepas de *B. subtilis*. El péptido maduro de 35 aminoácidos está ciclado

por un enlace amida inusual entre los extremos N y C de asparagina y glicina, respectivamente (Figura 2). También contiene tres puentes intramoleculares formados entre los azufres de Cys13, Cys7 y Cys4 y los carbonos α de Phe22, Thr28 y Phe31. La unión postraducciona de un tiol al carbono α de un residuo de aminoácido en la subtilosina A no tiene precedentes en péptidos o proteínas sintetizados ribosómicamente, sus enlaces cruzados únicos en la subtilosina A sugiere que esta bacteriocina (junto con su falta de residuos de lantionina y metil lantionina) debe clasificarse por separado de los lantibióticos (Abriouel, 2011). La subtilosina A, con una masa molecular de 3399.7 Da., tiene un punto isoeléctrico ácido y una alta estabilidad, bajo tensiones extremas de temperatura y pH, con plena actividad retenida después de una hora a 100 ° C o en el rango de pH de 2–10; esta bacteriocina muestra una actividad bactericida contra *L. monocytogenes* y aislados clínicos de *Gardnerella vaginalis* y *S. agalactiae*, además contra bacterias Gram negativas. Otro aspecto positivo es que subtilosina A tiene actividad espermicida en humanos. El operón que codifica la subtilosina A (Figura 2) está compuesto por ocho genes, con *sboA* que codifica el gen estructural del prepéptido de la subtilosina y albABCDEFG que codifica los genes de procesamiento e inmunidad (Abriouel, 2011).

1.6 *Pseudomonas spp.*

Descrito en 1984, el género *Pseudomonas spp.* es uno de los géneros más diversos y ubicuos aislados en todo el mundo. Son bacilos Gram negativos, aeróbicos, que no forman esporas, se encuentran en el ambiente de preferencia en agua, suelo, plantas, sedimentos, aire, animales, hongos, algas y fuentes relacionadas con humanos y animales. En los últimos años se han descrito más de 70 nuevas especies algunas de estas aisladas en ambientes extremos, como la Antártida (*P. extremaustralis*) o el desierto de Atacama (*P. arsenicoxydans*) (Peix, 2018). Tienen la capacidad de sobrevivir en medios hospitalarios en relación con respiradores, jabones líquidos, desinfectantes, baños, soluciones oftálmicas y comidas, particularmente en frutas y vegetales. La mayoría de ellos son móviles debido a la presencia de varios flagelos polares, utilizan la glucosa oxidativamente y la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 a 36°C (Restrepo, 2003).

1.6.1 Bacteriocinas de *Pseudomonas sp.*

Desde el punto de vista de descubrimiento de nuevos antimicrobianos, *Pseudomonas spp.* puede ser interesante (Saati-Santamaría Z, 2018), los miembros de este género tiene la capacidad de secretar varias clases de proteínas codificadas ribosómicamente, que van desde pequeñas bacteriocinas tipo S hasta grandes tailocinas (Ghequire M. G., 2014). Estos péptidos modulares comparten características con las colicinas, bacteriocinas producidas por las enterobacterias, que incluye un dominio para la unión a células diana, un dominio que media la translocación posterior y un dominio de toxina C-terminal (Ghequire M. G., 2017). Entre las bacterias Gram negativas, las colicinas, son el grupo mejor estudiado de proteínas antagonistas de estrecho espectro que han aportado conocimiento fundamental para identificar las nuevas bacteriocinas tipo S (Ghequire y De Mot, 2014).

Las piocinas solubles o de tipo S son bacteriocinas clase III, producidos por *P. aeruginosa* codificadas por cromosomas sensibles a la proteasa y al calor. Estos antibacterianos se secretan como complejos de proteínas binarias que radican en una proteína grande que alberga la función bactericida y una proteína de inmunidad más pequeña que permanece estrechamente unida al dominio citotóxico de la primera. La bacteriocina se dirige a la célula diana, uniéndose a un receptor específico ubicado en la membrana externa de la célula bacteriana y luego se transloca para ejercer su función inhibitoria. En la mayoría de las bacteriocinas de tipo S, el dominio N-terminal de la proteína grande tiene la función de unión al receptor y su parte C-terminal genera el efecto letal (Gabrielsen, 2014). La actividad citotóxica puede tomar la forma de una actividad nucleasa dirigida al ADN, ARNr o ARNt, una actividad formadora de poros dirigida a la membrana citoplasmática o una actividad enzimática dirigida a la síntesis de peptidoglucano (McCaughey L. C., 2016). Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado varias piocinas de tipo S: piocinas S1, S2, AP41, S3, S5, S6, PaeM. El tamaño de la piocina varía significativamente, desde 289 aminoácidos para PaeM hasta 777 aminoácidos para AP4. Aunque se han encontrado genes que codifican proteínas relacionadas estructuralmente con las bacteriocinas en otras especies de *Pseudomonas sp.* falta realizar más estudios de caracterización funcional, ya que el estudio de las piocinas tipo S se ha centrado en su aparición y acción en el patógeno oportunista *P. aeruginosa* (Ghequire M. G., 2014).

Las tailocinas son bacteriocinas de alto peso molecular clase III que se asemejan a las colas de bacteriófagos. Son resistentes a la proteasa, termolábiles y sedimentables por ultracentrifugación. Estudiadas ampliamente para el patógeno humano oportunista *P. aeruginosa*, cuyas cepas son

capaces de producir tailocinas de tipo R y de tipo F (Dorosky, 2017). Las tailocinas de tipo R aparecen como partículas rígidas y no flexibles construidas a partir de un cilindro hueco doble, que consta de un núcleo interno rígido y una cubierta externa contraíble. La superficie de la vaina extendida contiene diferentes conjuntos de estrías, que se originan a partir de los seis anillos que contienen subunidades estructuradas helicoidalmente. Una placa base está unida a la vaina y sirve como un punto de acoplamiento para las seis fibras de la cola que funcionan como un ancla de unión a las células diana. Al contacto, la vaina se contrae y el núcleo de piocina se inserta en la envoltura celular, formando un canal a través de la membrana interna que causa la despolarización de la membrana y produce la detención de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Esta muerte es muy eficiente ya que la unión de una sola partícula puede provocar la muerte celular (Ghequire M. G., 2014). Las tailocinas de tipo F son partículas flexibles sin vaina que se asemejan a las colas de fago lambda (Dorosky, 2017). Aparecen como barras flexibles, no contráctiles. Un extremo de la piocina de tipo F es cuadrado, mientras que el otro se estrecha hasta un punto desde el cual se origina un complejo de fibra, lo que permite la unión a una célula diana. Su mecanismo de acción es similar a las tailocinas tipo R (Ghequire M. G., 2014).

1.7 Pseudomonas extremaustralis

P. extremaustralis fue aislada de estanque temporal en el lado oeste de la Península Antártica. Esta especie no patógena, muestra una alta resistencia al estrés térmico y oxidativo asociada con una alta producción de polihidroxibutirato (PHB), esencial para su crecimiento y supervivencia (Benforte F. C., 2018). Los genes de la biosíntesis de PHB están localizados dentro de un grupo genómico adaptativo y probablemente fueron adquiridos por eventos de transferencia horizontal (Tribelli P. S.-L., 2015). En ambientes extremos donde hay variación de temperatura, concentración de sal, nutrientes y oxígeno, la plasticidad metabólica podría ser un factor clave para hacer frente a condiciones desfavorables garantizando la colonización y supervivencia (Tribelli P. y., 2018). Adicionalmente, en condiciones bajo cero la presencia de hielo conduce a una disminución en la disponibilidad de agua con el consiguiente choque osmótico. Por lo tanto, el crecimiento y la supervivencia dependen de la capacidad del organismo para hacer frente a estas condiciones desfavorables con más éxito que las especies competidoras. Entre los mecanismos implicados en la resistencia al estrés se encuentran la presencia de proteínas de choque frío, la

producción de solutos compatibles para contrarrestar la presencia de cristales de hielo, la producción de exopolisacáridos para proteger las células de los ROS y para mejorar la formación y la capacidad de degradar compuestos complejos. La adaptación ecológica es esencial para sobrevivir en ambientes extremos y también constituye la fuerza motriz más importante para los procesos de reorganización del genoma bacteriano, como la pérdida y adquisición de genes y el movimiento de islas genéticas enteras (Ibarra, 2014).

1.8 Recombinación homologa en levaduras

La recombinación homologa (RH) es un proceso universal llevada a cabo en los organismos procariotas y eucariotas para mantener la estabilidad del genoma (Krogh, 2004). La RH se define como la reparación de lesiones de ADN usando secuencias homólogas localizadas en el cromosoma hermano intacto (Symington, 2014). En eucariotas, la transferencia de genes mediada por el ADN amplió enormemente el potencial del análisis molecular de estos organismos. La transformación integradora ha proporcionado una nueva herramienta para generar mutaciones y genes fuera del genoma, para estudiar la estructura del genoma y para construir cepas transgénicas mediante la selección de genes (Plessis, 1993). La RH desempeña un importante rol, al generar diversidad genética y asegurar la segregación cromosómica exacta durante la meiosis. En las células mitóticas, la función principal de la recombinación homologa es reparar las roturas de la doble cadena (DSB) que surgen como consecuencia del metabolismo celular normal, como colapso de las bifurcaciones de replicación o por los radicales libres reactivos derivados del metabolismo del oxígeno (Aylon, 2004). Durante la RH la hay tres etapas indispensables que proporcionan los recursos para buscar en invadir una plantilla de ADN homologa intacta: i) La reparación de DSB inicia con un proceso denominado resección 5' - 3' en la que se generan extremos libres sencillos 3' por degradación nucleolítica de la doble hebras 5'; ii) alineamiento del ADN de cadena simple; (iii) intercambio de hebras sencillas de ADN e invasión de la plantilla que conduce a la formación de un bucle D que se estabiliza aún más mediante la síntesis de ADN (Felix, 2018).

Las levaduras han demostrado ser un sistema valioso para el análisis de la recombinación en los eucariotas (Sung, 2000); porque estos organismos permiten la recuperación y el análisis de todos los productos de eventos de recombinación meiótica (Orr Weaver, 1983). Además la transformación puede ocurrir con el ADN no replicativo o con los plásmidos replicativos

autónomos (Plessis, 1993). Gran parte de la comprensión de la recombinación meiótica y sus eventos moleculares proviene de estudios realizados a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sung, 2000). Cada iniciación de DSB de ADN es formado por un homodímero de la proteína específica de esporulación 11 (Spo11) que media una reacción de transesterificación similar a la de la topoisomerasa. Cada monómero Spo11 permanece unido covalentemente al extremo 5' de la cadena de ADN en cada DSB y se libera después de la ruptura endonucleolítica de cada cadena en los sitios 3' al DSB (Sasaki, 2010). Las proteínas MRE11, RAD50 y XRS2 forman un complejo heterotrimérico estable (MRX) que juega un papel estructural y catalítico en el inicio de la resección (Symington, 2014). Este complejo se une a las hebras sencillas en los extremos 3', busca secuencias homólogas y cataliza la invasión de uno de los dos extremos 3' de la hebra sencilla de ADN (Sasaki, 2010). La proteína RAD51 se une a los extremos 3' invade las secuencias de ADN de doble cadena homólogas identificando la región de la otra cadena que es complementaria (Sung, 2000). El complejo de la proteína de recombinación A (PRA) protege las hebras de cadena sencilla de la degradación y evitan la formación de estructuras secundarias; RAP80 desestabiliza la cadena sencilla de ADN en unión con la proteína Para (Felix, 2018). RAD52 es estimulada por proteínas de la familia RAD54, RAD55 y RAD57 (Sung, 2000). Luego se forma un bucle de desplazamiento (bucle D) debido a la separación de las hebras dobles de ADN invadidas. La resíntesis de las cadenas de ADN destruidas por resección es preparada por cada uno de los extremos 3' de la hebra simple de ADN, utilizando las cadenas del homólogo invadido como plantillas. En algunos casos de recombinación, se forman intermediarios de ADN ramificado que contienen pares de uniones de Holliday que se resuelven posteriormente, dando lugar a moléculas maduras de ADN recombinado que se encuentran principalmente en una configuración cruzada (Sasaki, 2010).

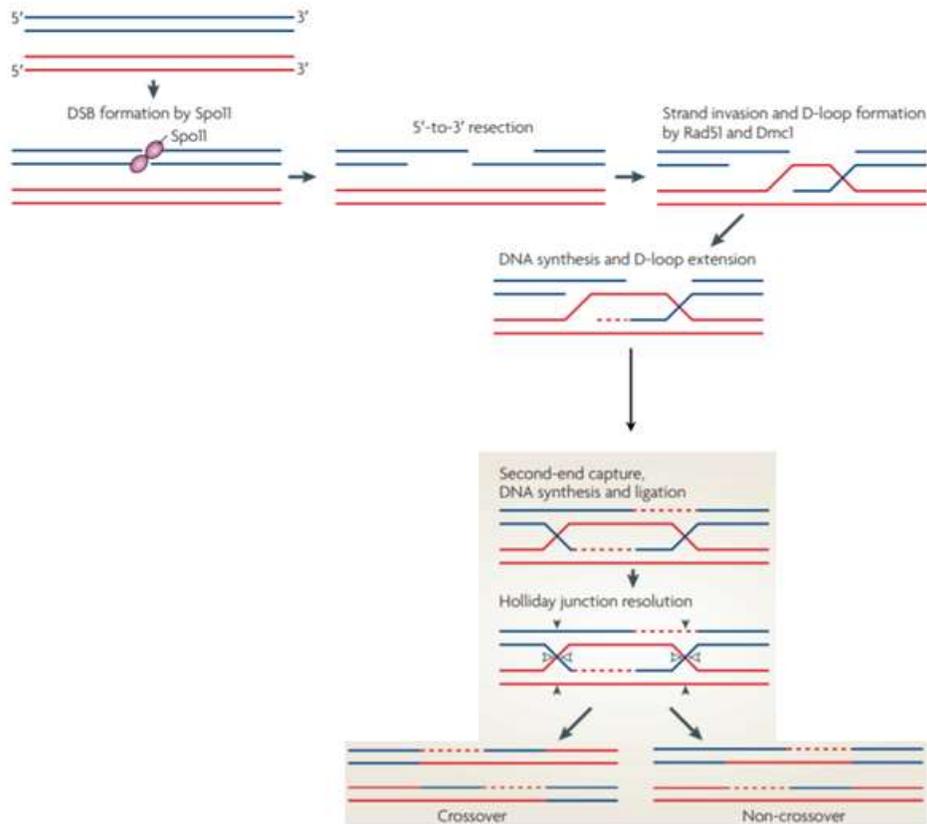


Figura 4 Vía de recombinación meiótica. Una ruptura de doble cadena introducida por la proteína SPO11 expone los extremos 3' de la cadena de ADN de hebra sencilla. Con la mediación de RAD51 y DMC1, uno de los extremos de ADN 3' invaden primero el cromosoma homólogo para formar un bucle de desplazamiento (bucle D) y una región heterodúplex, y luego inicia la síntesis de ADN. La captura del segundo extremo, la síntesis y ligadura del ADN generan los entrecruzamientos de Holliday que flanquean el sitio de ruptura de doble cadena. Los entrecruzamientos de Holliday pueden resolverse cortando el exterior filamentos (puntas de flecha llenas) o filamentos cruzados (puntas de flecha abiertas) de cada unión (dos de las cuatro posibles resoluciones se muestran aquí). (Tomado de Sasaki, 2010).

1.9 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas

Coefficiente de extinción: indica cuánta luz absorbe una proteína a una determinada longitud de onda. La estimación de este coeficiente es útil para seguir una proteína en un espectrofotómetro cuando se purifica.

Se ha demostrado que es posible estimar el coeficiente de extinción molar de una proteína a partir del conocimiento de su composición de aminoácidos. A partir del coeficiente de extinción molar de tirosina, triptófano y cistina (la cistina, es el aminoácido formado cuando un par de moléculas de cisteína se unen mediante un enlace disulfuro. La cisteína no se absorbe apreciablemente a longitudes de onda >260 nm, mientras que la cistina sí) a una longitud de onda, se puede calcular el coeficiente de extinción de una proteína desnaturalizada. ProtParam produce dos valores, el primero muestra los valores calculados basado en el supuesto de que todos los residuos de cisteína aparecen como medias cistinas (es decir, todos los pares de residuos de cisteína forman cistinas), y la segunda asumiendo que ninguna cisteína aparece como media cistina (es decir, suponiendo que todos los residuos de cisteína se reducen) (Gasteiger, 2005).

Vida media *in vivo*: Tiempo que tarda la mitad de la concentración de proteína en degradarse después de su síntesis en la célula. ProtParam se basa en la "regla del extremo N-terminal", que relaciona la vida media de una proteína con la identidad de sus residuos N-terminales. La predicción se da para tres organismos modelo: humano, levadura y *E. coli*. La regla del extremo N-terminal se originó a partir de las observaciones de que la identidad de los residuos del extremo N-terminal de una proteína juegan un papel importante en la determinación de su estabilidad *in vivo* (Gasteiger, 2005).

Índice de inestabilidad: proporciona una estimación de la estabilidad de una proteína en un tubo de ensayo. Una proteína cuyo índice de inestabilidad es menor que 40 se predice como estable, un valor superior a 40 predice que la proteína puede ser inestable (Gasteiger, 2005).

Índice alifático: El índice alifático de una proteína se define como el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina y leucina). Puede considerarse como un factor positivo para el aumento de la termoestabilidad de las proteínas globulares, siendo ésta superior cuanto mayor sea el índice alifático (Gasteiger, 2005).

Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY): brinda información sobre el carácter hidrofóbico o hidrofílico de una proteína en base a la composición de aminoácidos que presenta. El valor GRAVY para un péptido o proteína se calcula como la suma de los valores de hidropaticidad de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia. Los valores GRAVY positivos indican hidrofóbico; valores negativos significan hidrofílico (Kyte, 1982).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 en relación a bacteriocinas para control de patógenos humanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar *in silico* secuencias de aminoácidos asociadas a bacteriocinas en genomas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.

Encontrar secuencias de ADN codificantes de bacteriocinas en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 con perspectiva de recombinación homologa en levadura.

Determinar la actividad biológica de extractos proteicos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* CMPUJ 080.

3 METODOLOGÍA

Universo

Bacteriocinas de bacterias.

Población

Bacteriocinas de *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*

Muestra

Bacteriocinas en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.

Variable independiente

Bacteriocinas presentes en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515

Variable dependiente

Concentración de proteínas de extractos que contienen bacteriocinas de las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.

Parametros bioquímicos de bacteriocinas.

Hipótesis nula

Bacillus subtilis ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 no sintetizan bacteriocinas con potencial en control de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* CMPUJ 080

Hipotesis alterna

Bacillus subtilis ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 sintetizan bacteriocinas con potencial en control de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* CMPUJ 080.

Indicadores:

- a. Secuencias de ADN codificantes de bacteriocinas en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.
- b. Productos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa relacionados con bacteriocinas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, con ajuste para recombinación homóloga en levaduras.
- c. Extractos proteicos con bandas diferenciales en SDS-PAGE relacionadas con bacteriocinas en las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Caracterización bioquímica *in silico*

Se creó una base de datos local de bacteriocinas para permitir la comparación de los péptidos de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con las bacteriocinas conocidas y sus grupos de genes. Se utilizó una búsqueda por revisión bibliográfica para construir una base de datos de bacteriocinas y su correspondiente esquema de clasificación universal, con base en Heng y Tagg, 2006; que aplica a la mayoría de las bacteriocinas independientemente del estado de Gram positiva o Gram negativa de la cepa productora. Las cuatro clases incluyen (I) lantibióticos, (II) no-lantibióticos o péptidos no modificados, (III) péptidos de alta masa molecular, y (IV) péptido circulares modificados postraduccionalmente. Para completar la minería de datos, las secuencias de bacteriocinas fueron recuperadas de varios servidores web: 1) Base de datos MYSQL BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>); 2) base de datos del National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); 3) Base de datos BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl>); y 4) Base de datos UniProt (<http://www.expasy.uniprot.org/>). La anotación de estas bacteriocinas fue desarrollada con información de organismo productor, actividad biológica y número de acceso a la base de datos de UniProt.

Tabla 1 Bacteriocinas determinadas a partir de revisión bibliográfica.

Bacteriocinas	Referencia
R-type pyocins. F-type pyocins. S-type pyocins.	(Michel-Briand, 2002)
Nisin Z and Q, Enterocin W, Nukacin ISK-1, Enterocin NKR-5-3C, Enterocin A, Munditacin, Leucocin A, Lactococcin Q, Enterocin NKR-5-3AZ, Enterocin X, Lactocyclicin Q, Leucocyclicin Q Lacticin Q and Z, Weissellicin Y and M, Leucocin Q and N.	(Perez, 2014)
Nisina (A y Z), Lacticina 481, Lactocina S, Carnocina U149, Lactococcina A, Lactococcina B, Lactacin F, Plantaricina Sakacina P, Pediocina AcH, Divergiría M35, Enterocina P, Helveticina J, Cicularina A.	(Agudelo Londoño, 2015)

Acidocin LCHV, Acidocin LF221A, Acidocin LF221B, Bac217, BacC1, Bacteriocin L-1077, Bifidocin B, Bificin C6165, Brevicin 925A, Divergicin 750, Duramycin TW-49M, Enterocin 7A/7B, Enterocin A, Enterocin AS-48, Enterocin B, Enterocin EJ97, Enterocin L50, Enterocin IT, Enterocin MR10, Enterocin NKR-5-3B, Enterocin RM6, Enterocin P, Enterocin SE-K4, Gassericin A, Gassericin KT7, Garvieacin Q, Lacticin 3147, Lacticin 481, Lacticin LC14, Lacticin Q, Lacticin Z, Lactococcin BZ, Lactococcin R, Reacción H, Leucocyclicin Q, Mesentericin ST99, Macedocin, Macedovicin, Nisin, Nisin Z, Nisin Q, Pediocin A, Pediocin AcH/PA-1, Pediocin AcM, Pediocin L50, Pentocin TV35b, Plantaricin 163 IId, Plantaricin 423, Plantaricin C, Plantaricin KL-1Y, Plantaricin LP84, Plantaricin PZJ5, Plantaricin S, Plantaricin ST31, Plantaricin TF711, Plantaricin UG1, Plantaricin ZJ008, Salivaricin D, Thermophilin 1277, Themophilin 13, Thermophilin T, VJ13B, Weissellicin Y, Weissellicin M.

(Egan, 2016)

Mutacin 2, lacticin 481, bacteriocin J46, ruminococcin A, variacin, lacticin 3147, mersacidin, actagardine, plantaricin W α , nukacin ISK-1, mutacin H29B, streptococcin AFF22, streptococcin AM49, Duramycin C, cinnamycin, ancovenin, Bacteriocin 31, lactococcin MMFII, enterocin SEK4, divergicin M35, bavaricin MN, enterocin A, divercin V41, carnobacteriocin BM1, piscicocin V1b, curvacin A, enterocin P, sakacin A, Lactococcin MMFII, bacteriocin 31, enterocin SEK4, divergicin M35, enterocin A, bavaricin MN, divercin V41, carnobacteriocin BM1, piscicocin V1b, enterocin P, curvacin A, Carnobacteriocin B2, leucocin C, listeriocin 743A, bavaricin A, sakacin P, mundticin, enterocin CR35, mundticin KS, piscicolin 126, piscicocin V1a, coagulin, pediocin PA1, mesentericin Y105, leucocin A, leucocin B-Ta11a, plantaricin C19, prebacteriocin 423, Streptin, epidermin, gallidermin, mutacin 1140, mutacin B-N y 266, subtilin, nisin Z, Streptin, epidermin, gallidermin, mutacin 1140, Pep 5, epicidin 280, Plantaricin W β , cytolysin, lacticin 3147 A2, Acidocin J 1132 β , plantaricin 1.25 β , Carnobacteriocin A, enterocin B, Plantaricin S α , lacticin F, gassericin T, Lacticin F LafX, acidocin LF 221B, lactobin A, Lactocin 705, divergicin 750, Lactococcin G β , sublancin 168.

(Ahmad, 2017)

Nisin A, Suicin 3908, Lacticin 3147, Pediocin PA-1, Aureocin A53, Lactococcin G, Lysostaphin, Helveticin J, Enterocin AS-48.

(Ben Lagha, 2017)

Acidocin A, Bavaricin A, Pediocin PA-1, Lactococcin G, Lactacin F, Plantaricin J/K, Acidocin B, Gassericin A, Uberolysin, Lacticin Z, Carnobacteriocin A, Enterocin Q, Lactacin B, Helveticin J, Enterolysin A, Lactococcin 972, Lacstrepsin, Lactocin 27.

(Kaškonienė, 2017)

Con base en la similitud en secuencia de aminoácidos de cada bacteriocina de la base de datos local se realizó una búsqueda de sus posibles contrapartes en los genomas de *B. subtilis* ATCC 6633 (NCBI taxid: 1423) y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (NCBI taxid: 359110). Desde la base de datos UniProt (<http://www.expasy.uniprot.org/>) se extrajeron las secuencias de los aminoácidos de cada bacteriocina en formato FASTA y se introdujeron en la herramienta de búsqueda de alineación local tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La comparación calcula la importancia estadística de las coincidencias haciendo elección de las secuencias con porcentaje de identidad $\geq 40\%$; porcentaje de cobertura $\geq 70\%$ y un valor E. $\leq 0,1$.

La caracterización *in silico* de las bacteriocinas de los microorganismos en estudio se realizó calculando varias propiedades bioquímicas a través de ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Los parámetros calculados incluyeron el peso molecular, pI teórico (punto isoeléctrico), coeficiente de extinción, índice de inestabilidad, índice alifático e índice GRAVY de hidropaticidad.

3.1.2 Determinación de bacteriocinas en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 *in vivo* para recombinación homologa.

Se eligieron tres bacteriocinas de *B. subtilis* (Subtilina, Sublancina 168 y Subtilocina A) para determinar su presencia experimentalmente en *B. subtilis* ATCC 6633, con base en el estudio de Abriouel, 2011. En el mismo contexto, se eligieron dos bacteriocinas de *Pseudomonas sp.*: piocina S1 y piocina S2 para encontrarlas en *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con base en el estudio de Michel-Briand, 2002.

La extracción de ADN se realizó utilizando colonias de las cepas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 usando el método de fenol-cloroformo. La biomasa fue suspendida con 600 μ L de agua estéril. La suspensión se homogenizó con 1 mL de tampón de lisis (tris-HCl 50 mM pH 8,25; EDTA 250 mM; NaCl 100 mM; SDS 1 %) y 3 μ L de proteinasa K, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Seguidamente se realizó tratamiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se mezcló para

luego hacer centrifugaciones a 14000 rpm por 10 min a 4°C. El ADN precipitado se lavó con 500 uL de etanol 70 % y se secó a temperatura ambiente; fue resuspendido finalmente en 50 uL de tampón tris-EDTA (TE) (tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) y almacenado a -20°C. La visualización del ADN genómico se realizó en electroforesis de agarosa al 1%.

El diseño de los oligonucleótidos para recombinación homologa se realizó con base en las secuencias de la proteína lítica y de inmunidad de las piocinas S1, S2. Para Subtilina utilizamos la secuencia del gen *SpaS* codificantes de la bacteriocina. Para el caso de la subtilosina A utilizamos la secuencia del gen *sbo* codificantes de la bacteriocina. Para subblancina 168 utilizamos la secuencia del gen llamado *sunA*.

En la reacción de PCR se utilizó 100 ng/μL de ADN de cepas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Las condiciones usadas son las siguientes: Buffer de reacción 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPS 200 μM, oligonucleótidos 0.05 μL de cada uno, mezcla de polimerasa 0,2 U/μL. Los ciclos de PCR fueron: desnaturalización inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 min y 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 5 min. El marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas # SM 0311).

3.1.3 Evaluación de extractos proteicos en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* CMPUJ 080.

Colonias aisladas de las cepas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fueron incubadas en agar LB durante toda la noche y utilizadas para inocular el caldo de cultivo LB. Los caldos inoculados se incubaron durante 24 h a 35°C. Se tomaron 200 mL de biomasa de cada cultivo en fase logarítmica (A_{600 nm} = 0,5) que se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue mantenido a -20°C durante 2 h, luego se lisaron en 4 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 25% de sacarosa - 1 mM fenilmetilsulfonilo fluorodo - 60 mg/mL de lisozima durante 45 min a 4°C. Después de la adición de 0.5 volúmenes de 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 0.4% Tritón X-100, se mantuvo por 45 minutos adicionales a -20°C. El lisado se pasó varias veces a través de una aguja de jeringa (calibre 25) y se almacenó a -15°C (Regev, 1996).

Para la cuantificación de proteínas presentes en *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 se usó el método de Bradford (Zor, 1996), a partir de la interacción del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 con estructuras proteicas, esta unión hace que el colorante cambie de color y se mide el incremento de la absorción a 595 nm. La curva patrón de la cuantificación se realizó con diluciones estándar de albúmina con PBS, a concentraciones de 0,0 - 45,45 µg/mL. El perfil electroforético de las proteínas presentes en *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 se visualizó con SDS-PAGE, usando un gel discontinuo conformado por un gel separador y un gel concentrador a una concentración de 10%. El gel discontinuo se cargó con 5 µL de marcador peso molecular Thermo Fischer Scientific 26617 y 5 µL de proteínas totales de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515.

Para la visualización del perfil electroforético el gel se coloreó con Azul de Coomassie R250 durante 45 min y se decoloró con una mezcla de ácido acético glacial 10%, etanol 5% durante 2 h.

3.1.4 Evaluación Biológica

Para la evaluación de la actividad biológica de los extractos proteicos de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* CMPUJ 080 se realizó siembra masiva del inóculo de colonias a escala de concentración MacFarland de 0.6 en medio de cultivo Muller Hinton. La sensibilidad sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* CMPUJ 080 se estudió mediante el método de difusión en agar, con discos impregnados con extractos de proteínas *B. subtilis* ATCC 6633 a concentración de 0,5 µg /µl y con extracto de proteína de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 a concentración de 0,6 µg /µl por disco; el control positivo fueron discos del antibiótico cefoxitina de 30 µg y Ertapenem de 10 µg .

4 RESULTADOS

Para la clasificación de las bacteriocinas se tomo la clasificación universal realizada en 2006 por Heng y Tagg; que incluye las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las cuatro clases incluyen (I) lantibióticos, (II) no-lantibióticos o péptidos no modificados, (III) péptidos de alta masa molecular, y (IV) péptidos circulares.

Se recopilaron un total de 220 bacteriocinas. Con la clasificación de las bacteriocinas se estableció 80 bacteriocinas clase I, 110 bacteriocinas clase II, 22 bacteriocinas clase III y ocho bacteriocinas clase IV. Tres bacteriocinas son producidas por microorganismos del dominio *Archaea* y 217 bacteriocinas son producidas por microorganismos del dominio *Bacteria* con una representación de 23 bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas y 194 bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas. Las clases y sus características se enumeran en el anexo 1.

Las secuencias de bacteriocinas de la base de datos local (anexo 1) fueron utilizadas para encontrar sus contrapartes en *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515. En el caso de *B. subtilis* ATCC 6633 se encontraron 48 secuencias con similitud, y se aplicó un filtro que consistió en un parámetro de cobertura ≥ 70 , porcentaje de identidad ≥ 40 y valor e cercano a 0, con lo cual fueron encontradas 21 secuencias representativas, de las cuales 18 bacteriocinas pertenecen a la clase I y tres bacteriocinas hacen parte de la clase II (tabla 2). Para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 se determinaron 128 secuencias similitud a las correspondientes de la base de datos local (anexo 1), y al aplicar el mismo filtro que en el caso anterior (porcentaje de cobertura ≥ 70 , porcentaje de identidad ≥ 40 y valor e cercano a 0), se identificaron dos secuencias asociadas a bacteriocinas, una de ellas pertenece a la clase I y la segunda a la clase II (tabla 2).

Tabla 2 Bacteriocinas identificadas en *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515.

<i>B. subtilis</i> ATCC 6633							
Nombre	Clase	Organismo productor	UniProt N° acceso	% cobertura	Valor e	% identidad	Acceso GenBank
Lacticin 3147 A2	Clase I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	O87237	100%	1,00E-14	53.73%	CP016767.1
Lichenicidin A2	Clase I	<i>Bacillus licheniformis</i> (strain DSM 13 / ATCC 14580)	P86720	100%	1,00E-09	46.38%	CP021892.1
Subtilosin-A	Clase I	<i>Bacillus subtilis</i>	O07623	100%	4,00E-23	100.00%	DQ452520.1
Thuricin-17	Clase I	<i>Bacillus thuringiensis</i>	B5U2V4	100%	2,00E-17	92.50%	CP026608.1
Mersacidin	Clase I	<i>Bacillus sp</i> (strain HIL- Y85/54728)	P43683	98%	9,00E-45	100.00%	MG800652.1
Staphylococcin C55 alpha	Clase I	<i>Staphylococcus aureus</i>	Q9S4D3	98%	1,00E-24	71.88%	CP016767.1
Ericin_A	Clase I	<i>Bacillus subtilis</i>	Q93GH5	98%	4,00E-20	72.73%	KC139802.1
Lacticin 3147 A1	Clase I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	O87236	94%	2,00E-22	69.64%	CP016767.1
Nisin U	Clase I	<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 27958	Q2QBT0	94%	5,00E-12	51.92%	DQ452514.1

Cytolysin	Clase I	<i>Bacillus halodurans</i>	Q9KFM	89%	2,00E-06	48.39%	CP021892.1
			6				
Nisin Z	Clase I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), lactis	P29559	85%	1,00E-14	61.22%	DQ452514.1
Nisin A	Clase I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), lactis	P13068	85%	6,00E-14	59.18%	DQ452514.1
Nisin Q	Clase I	<i>Lactococcus lactis</i>	Q76HP8	85%	3,00E-12	57.14%	DQ452514.1
Staphylococcin	Clase I	<i>Staphylococcus aureus</i>	Q9S4D2	85%	2,00E-10	50.88%	CP016767.1
C55 beta							
Plantaricin W α	Clase I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	D2KR94	79%	6,00E-05	42.55%	CP021892.1
Sublancin 168	Clase I	<i>Bacillus subtilis</i>	P68577	75%	6,00E-08	61.90%	AF014938.1
Subtilin	Clase I	<i>Bacillus subtilis</i>	P10946	71%	2,00E-21	100.00%	DQ452514.1
Ericin_S	Clase I	<i>Bacillus subtilis</i>	Q93GH3	71%	2,00E-19	90.00%	DQ452514.1
Enterocin	Clase II	<i>Enterococcus faecalis</i>	A0A0M3	100%	3,00E-11	54.69%	CP002183.1
NKR-5-3B		NKR-5-3	KKS4				
LCI	Clase II	<i>Bacillus subtilis</i> A14	P82243	97%	2,00E-22	93.48%	CP009611.1
UviB	Clase II	<i>Clostridium perfringens</i>	P15936	75%	1,00E-06	43.75%	AF021803.1

***P. extremaustralis* CMPUJ U515**

Nombre	Clase	Organismo productor	UniProt N°	%	Valor e	%	Acceso
			acceso	cobertura		Identificación	GenBank

Duramycin-C	Clase I	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	P36503	100%	0.051	47.37%	LT629689.1
Enterocin 7B	Clase II	<i>Enterococcus faecalis</i>	Q1A2D2	72%	0.045	50.00%	LT629689.1

Las bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515, se caracterizaron *in silico*. Las propiedades fisicoquímicas permitieron establecer el peso molecular, el punto isoeléctrico, los residuos cargados positiva y negativamente, el coeficiente de extinción, el índice de estabilidad, el índice alifático y el promedio general de hidropaticidad (GRAVY).

En cuanto al peso molecular *B. subtilis* ATCC 6633, posee 18 bacteriocinas clase I entre 4.1 y 7.5 kDa; y tres bacteriocinas clase II entre 5.2 y 8.3 kDa.

Por otro lado *P. extremaustralis* CMPUJ U515 tiene una bacteriocina clase I con peso molecular de 2.05 kDa y una bacteriocina clase II con peso molecular de 2.4 kDa.

Para el caso del pI (pH al que la proteína tiene carga neta cero) calculado para las bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633, se encontró 14 bacteriocinas clase I entre 4.06 hasta 6.1; cuatro bacteriocinas clase I con pI entre 7.58 hasta 9.07 y tres bacteriocinas clase II de las cuales una tiene un pI de 4.99 y dos tienen pI entre 9.06 y 9.82.

En tanto *P. extremaustralis* CMPUJ U515 tiene una bacteriocina clase I con pI de 5.82 y una bacteriocina clase II con pI de 12.3.

También se determinó para *B. subtilis* ATCC 6633 que las 18 bacteriocinas clase I tienen desde 0 hasta 12 residuos cargados negativamente (Asp + Glu) y tienen desde 1 hasta 7 residuos cargados positivamente (Arg + Lys); tres bacteriocinas clase II desde 2 hasta 11 residuos cargados negativamente (Asp + Glu) y desde 6 hasta 9 residuos cargados positivamente (Arg + Lys).

Para *P. extremaustralis* CMPUJ U515, se identificó que su bacteriocina clase I tiene un residuo cargado positivamente (Arg + Lys) y un residuo cargado negativamente (Asp + Glu); la bacteriocina clase II tiene 4 residuos cargados positivamente (Arg + Lys) y no tiene residuos cargados negativamente (Asp + Glu).

Las 18 bacteriocinas clase I de *B. subtilis* ATCC 6633 tienen un pico máximo de absorción de luz que va desde 250 a 23740 a una longitud de onda de 280 nm; y las tres bacteriocinas clase II tienen un pico máximo de absorción de luz que va desde 9970 a 16960 a una longitud de onda de 280 nm.

P. extremaustralis CMPUJ U515 tiene una bacteriocina clase I con un pico máximo de absorción de luz de 5625 y una bacteriocina clase II con un pico máximo de absorción de luz de 5500 a una longitud de onda de 280 nm.

Para los parámetros de índice de inestabilidad, índice alifático y GRAVY, de las 18 bacteriocinas clase I de *B. subtilis* ATCC 6633, tres de estas son estables y 15 son inestables; todas son estables al calor y 15 bacteriocinas son hidrofílicas y tres son hidrofóbicas. En cuanto a las tres bacteriocinas clase II todas son estables, estables al calor y dos de las bacteriocinas son hidrofílicas y una es hidrofóbica.

Para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 la bacteriocina clase I es inestable, termoestable e hidrofóbica, y la bacteriocina clase II es estable, termoestable e hidrofílica. Todas las características de estas bacteriocinas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3 Parámetros bioquímicos de bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515.

BACTERIO CINA BASE LOCAL	SECUENCIA BACTERIOCINA <i>B. subtilis</i> ATCC6633	P. M. (Da)	pI	RESIDUOS	RESIDUOS	COEFICIENTE DE		INDICE	INDICE	PROME
				CARGADOS	CARGADOS	EXTINCIÓN				
				(-) (Asp + Glu)	(+) (Arg + Lys):	Cys forman cistinas	Cys se reducen	ESTABILI DAD	ALIFA TICO	DIO (GRAVY)
Lacticin 3147 A2	MNDKKSIAANSLKNELELGKYLESDMI ALTEDDVVGGWTPALSVITGYISSNTCP TTACT	6755.63	4.51	8	5	8605	8480	39.41	83.65	-0.157
Lichenicidin A2	MSNREKAELYRNASKRTELGFVNPVGE VSEDELRLAGAADVTPHTTPSSLPCG VFVTA AFCPSTKCTSSC	7550.46	5.68	8	7	1740	1490	51.19	61.83	-0.282
Subtilosin-A	MKKAVIVENKGCATCSIGAACLVDGPI PDFEIA GATGLFGG	4325.10	4.78	4	3	5625	5500	20.00	97.67	97.67
Thuricin-17	METPVVQPRDWACWSCLVCTACSVEL LNLVTAANGASTS	4198.83	4.14	3	1	11250	11000	54.74	90.25	0.550
Mersacidin	MSQEAIRSWKDPFSRENSTQNPAGNPF SELKEAQMDKLVGAGDMEAACTFTLP GGGGVCTLTSECI	7124.99	4.44	9	5	5625	5500	69.47	58.36	-0.330
Staphylococcin C55 alpha	MKTEFSKLQKEVKQEQTWFEEVVDQ EFDDDDVFGACTTNTFSLSDYWGKGG WCTVSKEC MAWC	7472.32	4.31	12	6	23740	23490	58.25	42.50	-0.564
Ericin_A	MTNMSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQ VLSKSLCTPGCITGPLQTCYLCFPTFAY	6255.31	7.62	5	6	3230	2980	42.95	71.25	-0.023

Continuación...

BACTERIO CINA BASE LOCAL	SECUENCIA BACTERIOCINA <i>B. subtilis</i> ATCC6633	P. M. (Da)	pI	RESIDUOS	RESIDUOS	COEFICIENTE DE		INDICE	INDICE	PROME
				CARGADOS	CARGADOS	EXTINCIÓN				
				(-) (Asp + Glu)	(+) (Arg + Lys):	Cys forman cistinas	Cys se reducen	DAD	ALIFA TICO	DIO (GRAVY)
Lacticin 3147 A1	QKEVKQEQVTWFEEVVDQEFDDDDVFG ACTTNTFSLSDYWNGGWCTVSKECM AWC	6507.14	4.06	11	4	23740	23490	57.40	41.61	-0.568
Nisin U	DDFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESLC TPG CVTGALQTCF LQTLTCNCKI S	5596.42	4.86	6	5	5750	5500	40.85	78.24	-0.125
Cytolysin	RNASKRTELGFVNPVGEVELRNLAGAA DVTPTTSSLPCGVFVTA AFCPSTKCT SSC	6328.08	5.62	6	5	250	0	53.51	63.93	-0.107
Nisin Z	DFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESLCT PGCVTGALQTCFLQTLTCNCKI	5394.25	6.16	5	5	5750	5500	42.11	81.43	-0.043
Nisin A	DFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESLCT PGCVTGALQTCFLQTLTCNCKI	5394.25	6.16	5	5	5750	5500	42.11	81.43	-0.043
Nisin Q	DFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESLCT PGC VTGALQTCFL QTLTCNCKI	5394.25	6.16	5	5	5750	5500	42.11	81.43	-0.043
Staphylococcin C55 beta	KNELELGKYLESDMIALTEDDVVGGW TPALSVITGYISSNTCPTTACTRAC	5439.14	4.20	7	3	8605	8480	49.65	86.08	0.029

Continuación...

BACTERIO CINA BASE LOCAL	SECUENCIA BACTERIOCINA <i>B. subtilis</i> ATCC6633	P. M. (Da)	pI	RESIDUOS	RESIDUOS	COEFICIENTE DE		INDICE ESTABI DAD	INDICE ALIFA TICO	PROME DIO (GRAVY)
				CARGADOS	CARGADOS	EXTINCIÓN				
				(-) (Asp + Glu)	(+) (Arg + Lys):	Cys forman cistinas	Cys se reducen			
Plantaricin W α	MSIHETWKNPALRMNSQVVNPAGDLM EELSDDMEMLAGGCAWYDISCKLGN KGAWCTLTVECQSSCN	7490.53	4.14	10	4	18240	17990	67.55	71.76	-0.175
Sublancin 168	NQKGSLGKAQCAALWLQCASGGTIG CGGGAVACQNYRQFCR	4234.83	9.07	0	4	7240	6990	28.87	58.33	-0.076
Subtilin	MSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQWKS ESLCTPGCVTGALQTCFLQTLTCNCKIS K	6218.21	7.58	6	7	5750	5500	48.15	71.25	-0.184
Ericin_S	MSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQWKS ESLCTPGCVTGALQTCFLQTLTCNCKIS K	6218.21	7.58	6	7	5750	5500	48.15	71.25	-0.184
Enterocin NKR-5- 3B (Ent53B)	LASTLGISTAAAKKAIDIIDAASTVASIIS LIGIVTGAGASYAIVATAKSMIKKYGK KYAAAW	6371.57	9.82	2	7	9970	0	2.65	123.91	0.844
LCI	AIKLVQSPNGNFAASFVLDGKWFKS KYYDSSKGYWVGI YESVDK	5208.90	9.06	4	6	16960	0	13.86	74.13	-0.259
UviB	MEMDITQYLSTQGPFVLCWLLFYV MKTSKERESKLYNQIDSQNEVLGKFSE KYDVVIEKLDKIEQNFK	8379.66	4.99	11	9	11460	11460	37.44	83.43	-0.389

Continuación...

BACTERIO CINA BASE LOCAL	SECUENCIA BACTERIOCINA <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	P. M. (Da)	pI	RESIDUOS	RESIDUOS	COEFICIENTE DE		INDICE	INDICE	PROME
				CARGADOS	CARGADOS	EXTINCIÓN				
				(-) (Asp + Glu)	(+) (Arg + Lys):	Cys forman cistinas	Cys se reducen	DAD	TICO	(GRAVY)
Duramycin-C	CASSCTVGPLIWQMPDSTR	2052.37	5.82	1	1	5625	5500	78.75	61.58	0.074
Enterocin 7B	LQFVAQGLTRVRIRTWLKHH	2459.93	12.3 0	0	4	5500	0	16.44	112.00	-0.230

JV-0055	1Rv-hca-6his	atgatgatgatgatgATATTCATACGTTATAAT AGTACCAGTAGTATCAGTAGTACC	> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immunity protein of pyocin S2
JV-0056	1Rv-immS1-6his	gcaggtcgacTCTAGAttaaTTAatgatgatgatgatg ACCGGCCTTAAAGCCAGGA	> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immunity protein of pyocin S1
JV-0057	1Rv-kills1-6his	cTCTAGAttaaTTAatgatgatgatgatgcttccctccc ttgtgatttctatga	> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> killer protein of pyocin S1
JV-0059	1Rv-spaS-6his	ttaaTTAatgatgatgatgatgTTTAGAGATTTTG CAGTTACAAGTTAGTGTGGAA	<i>Bacillus subtilis</i> hypothetical protein (spaS). Subtilina
JV-0060	1Rv-spbc2-6his	acTCTAGAttaaTTAatgatgatgatgatgTCTGC AGAATTGACGATAGTTTTGACA	> <i>Bacillus subtilis</i> sublancin 168 precursor peptide (SPBc2 prophage- derived bacteriocin sublancin-168)
JV-0061	1Rv-subtA-6his	tcgacTCTAGAttaaTTAatgatgatgatgatgTCC CCATAGACCGAATAGACCTGT	> <i>Bacillus subtilis</i> subtilisin A

Para la extracción de ADN genómico se usó el método de fenol/cloroformo, se observan las bandas de ADN genómico obtenidas por este procedimiento, de alto tamaño molecular, lo cual se debe a que el genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 contiene aproximadamente 4 kb, y para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 es de aproximadamente 6 kb, observándose mejor resultado en el tratamiento con proteinasa K (Figura 5).

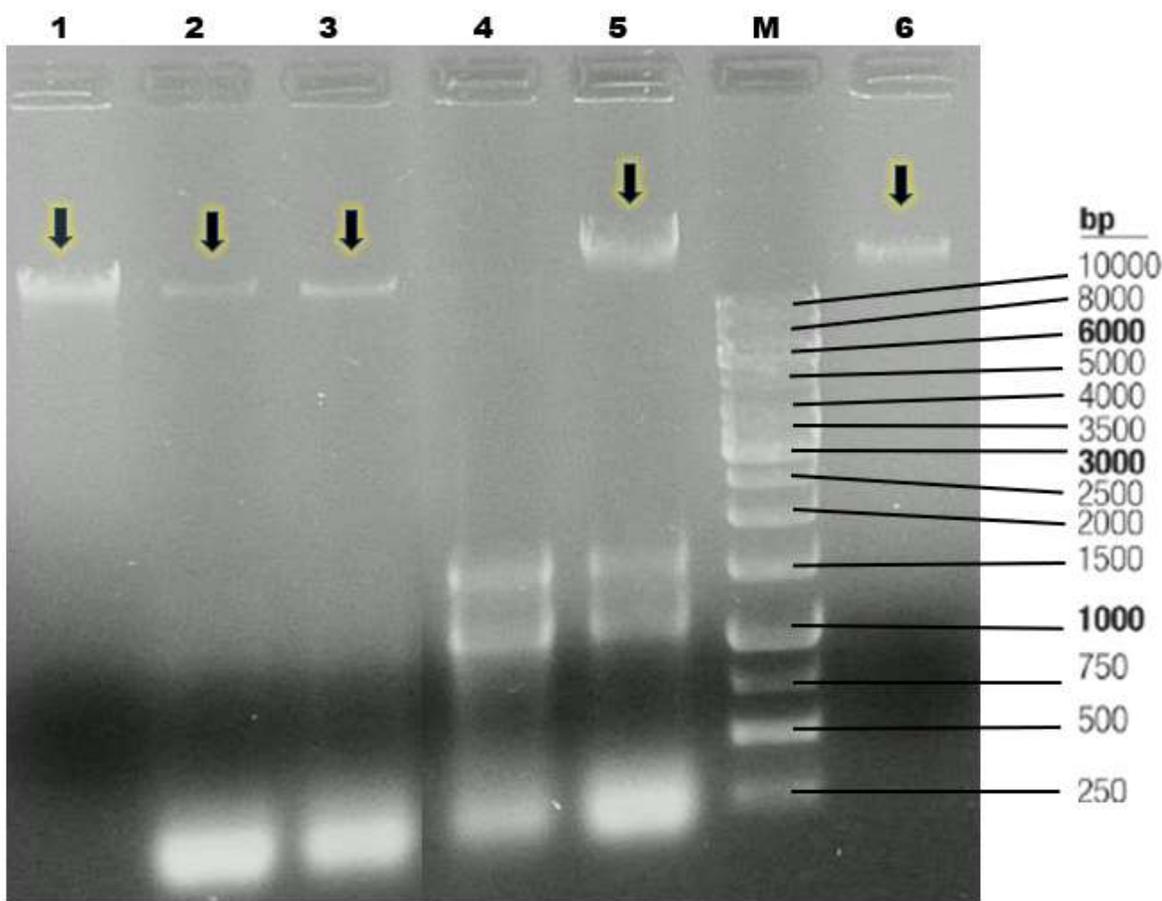


Figura 5 Extracción de ADN genómico por el método de fenol/cloroformo. Líneas 1, 2 y 3 son extracciones de ADN de la cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 con proteinasa K y la línea 4 es extracción de ADN de *B. subtilis* ATCC 6633 con lisozima. Línea 5 y 6 son extracciones de la cepa de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con proteinasa K. Línea M es marcador de tamaño molecular de 1 kb.

Se deseaba obtener productos de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para recombinación homologa en levadura, con el fin de identificar secuencias tipo bacteriocina que fueran susceptibles de clonarse en levadura en perspectiva de producirse de forma recombinante. Los productos de la amplificación por PCR de las bacteriocinas de las cepas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (figura 6) dio como resultado siete productos, tres de éstos con una longitud de 171 y 132 pb que corresponden a las bacteriocinas Subtilina, Sublancina 168 y Subtilocina A. En cuanto a la amplificación de genes tipo bacteriocina desde *P. extremaustralis* CMPUJ U515, se esperaban productos de 264 pb y 1000 pb pero en su lugar se amplificó segmentos de 200 pb lo que no concuerda con lo esperado, la secuencia de los genes de las bacteriocinas utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos se alinearon en los genomas de *B. subtilis* ATCC 6633 (taxid: 1423) y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (taxid: 359110). Los Subtilina, Sublancina 168 y subtilocina A coinciden (Tabla 6) pero para *P. extremaustralis* los resultados de la alineación mostraron que las secuencias que codifican para las bacteriocinas oligonucleótidos reconocen secuencias erróneas.

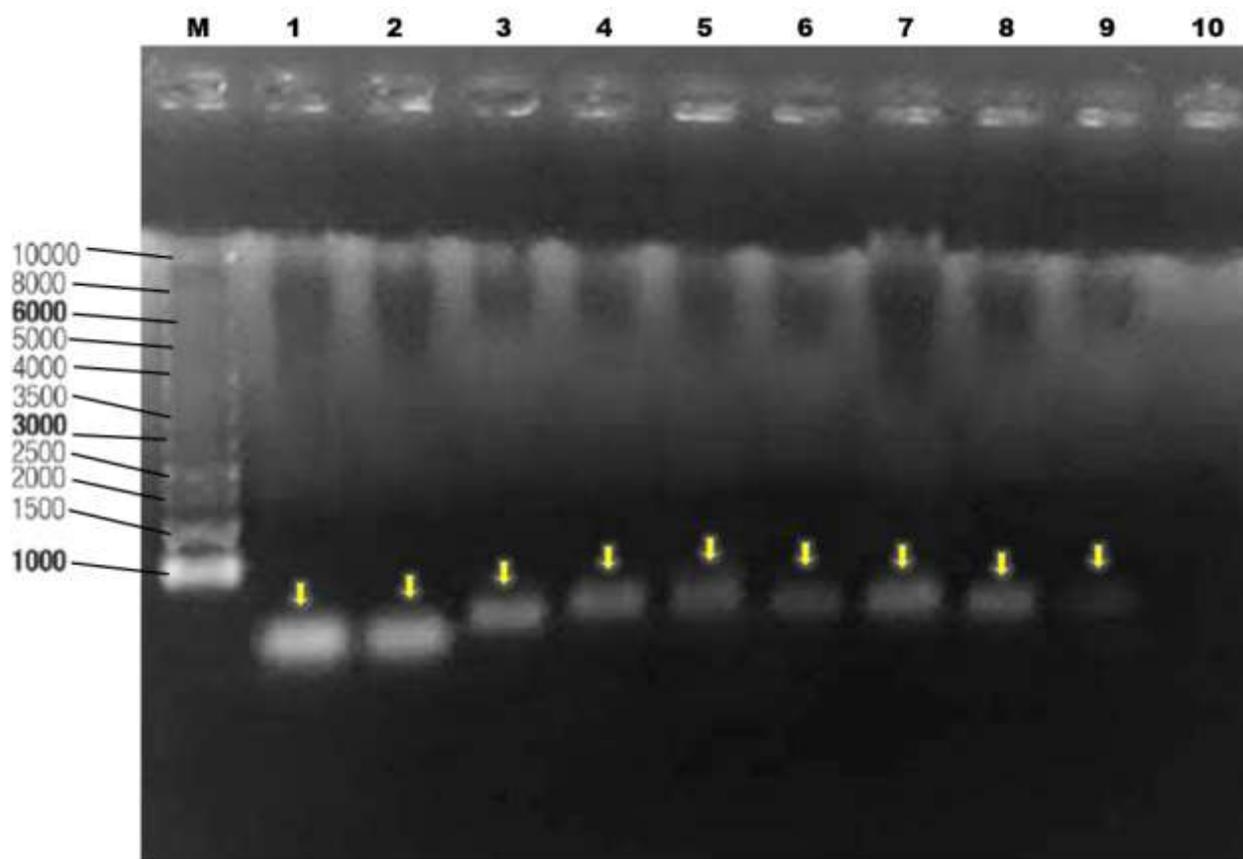


Figura 6 Productos de la amplificación por PCR de genes tipo bacteriocinas. Línea M: marcador de peso molecular 1 kb. Línea 1: Control con oligonucleótidos para gen housekeeping eucariota para *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 2: Control con oligonucleótidos para gen housekeeping eucariota para *B. subtilis* ATCC 6633. Línea 3: amplificado del gen codificante de la proteína lítica de la piocina S1 en *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 4: amplificado del gen que codifica para proteína lítica de la piocina S2 en *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 5: amplificado del gen codificante de la proteína de inmunidad de la piocina S2 en *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 6: amplificado del gen de la proteína de inmunidad de la piocina S1 de *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 7: amplificado del gen que corresponde a la subtilina en *B. subtilis* ATCC 6633. Línea 8: amplificado del gen que corresponde a la subblancina 168 en *B. subtilis* ATCC 6633. Línea 9: amplificado del gen que determina la subtilosina A en *B. subtilis* ATCC 6633. Línea 10: Control negativo de la reacción de PCR (H20).

Con la finalidad de realizar pruebas de susceptibilidad de extractos proteicos de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515, se procedió a realizar extracción de proteínas totales de las bacterias. La determinación de la concentración de las proteínas totales de los extractos de cepas de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 frente a la proteína estandar albumina, dio como resultado para *B. subtilis* ATCC 6633 una concentración de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 una concentración de 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 7).

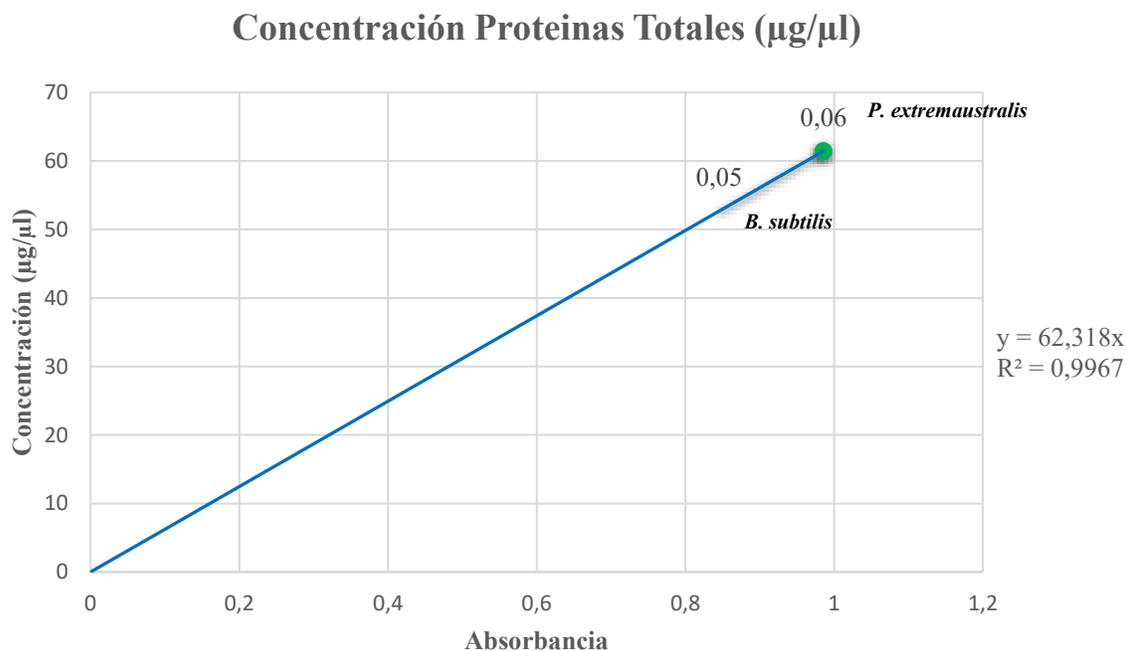


Figura 7 Curva de calibración usando el método de Bradford para obtener la concentración de proteínas totales para *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515.

Se deseaba evidenciar la presencia de posibles bacteriocinas en los extractos proteicos de las dos cepas de este estudio. Según el análisis bioinformático, se esperan bacteriocinas de menos de 10 kDa, para lo cual se evidencia una banda correspondiente a este tipo de bacteriocinas y otros AMPs. (Figura 8).

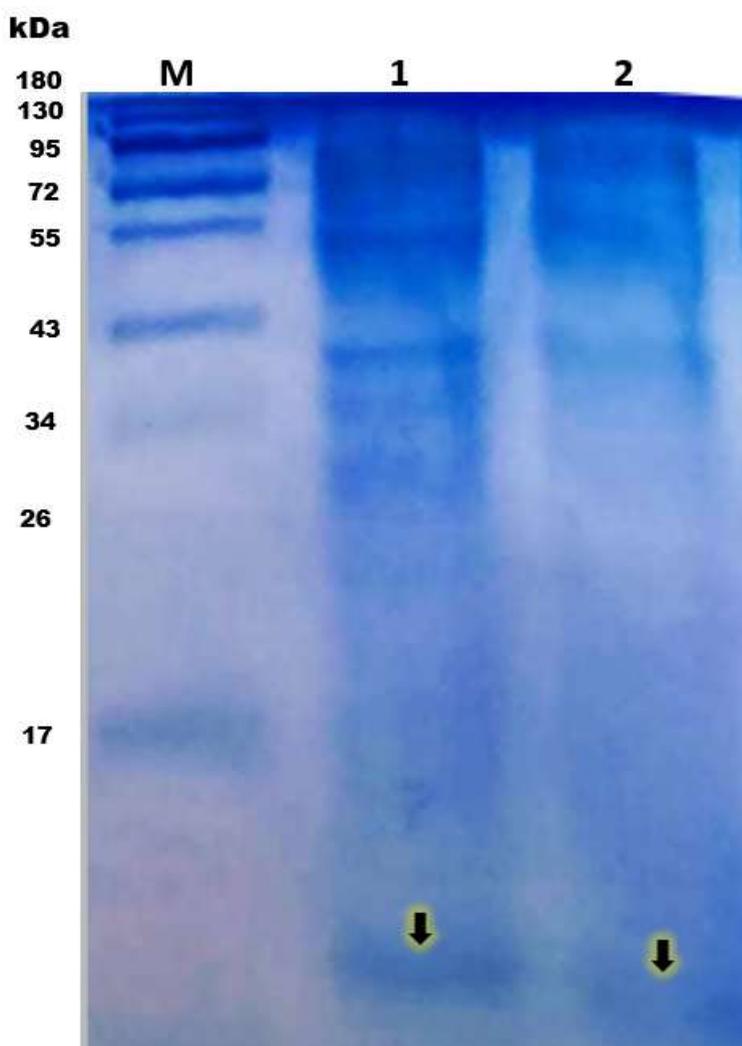


Figura 8 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE con tinción azul brillante de Coomassie de la extracción de proteínas totales de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea M: marcador de peso molecular de 180 kDa. Línea 1 *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Línea 2: *B. subtilis* ATCC 6633. Las flechas indican bandas de <10 kDa.

Finalmente se deseaba establecer el posible efecto inhibitorio de crecimiento del extracto proteico de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515, para lo cual se realizó una prueba cualitativa con sensidiscos (Winn, y otros, 2008). Desafortunadamente no se encontró actividad (figura 9 y 10).

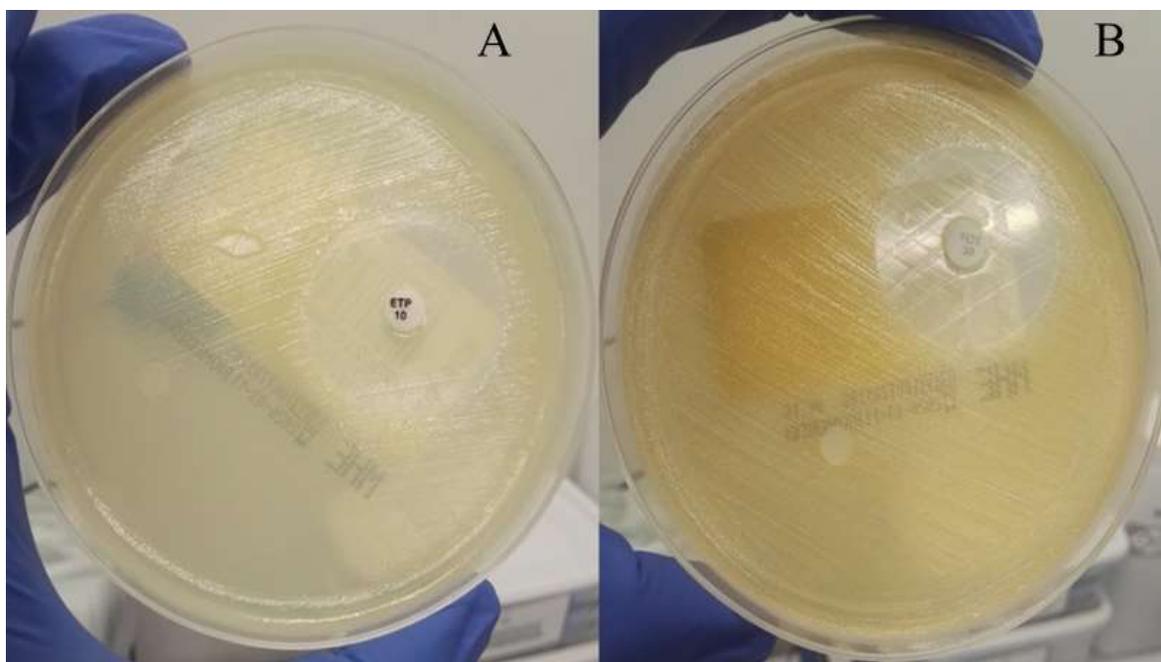


Figura 9 Prueba de susceptibilidad usando extracto proteico de *B. subtilis* ATCC 6633 a una concentración de $0,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ en el sensidisco. **A.** Prueba con la cepa de *E. coli* ATCC 25922. **B.** Prueba con la cepa de *S. aureus* CMPUJ 080.

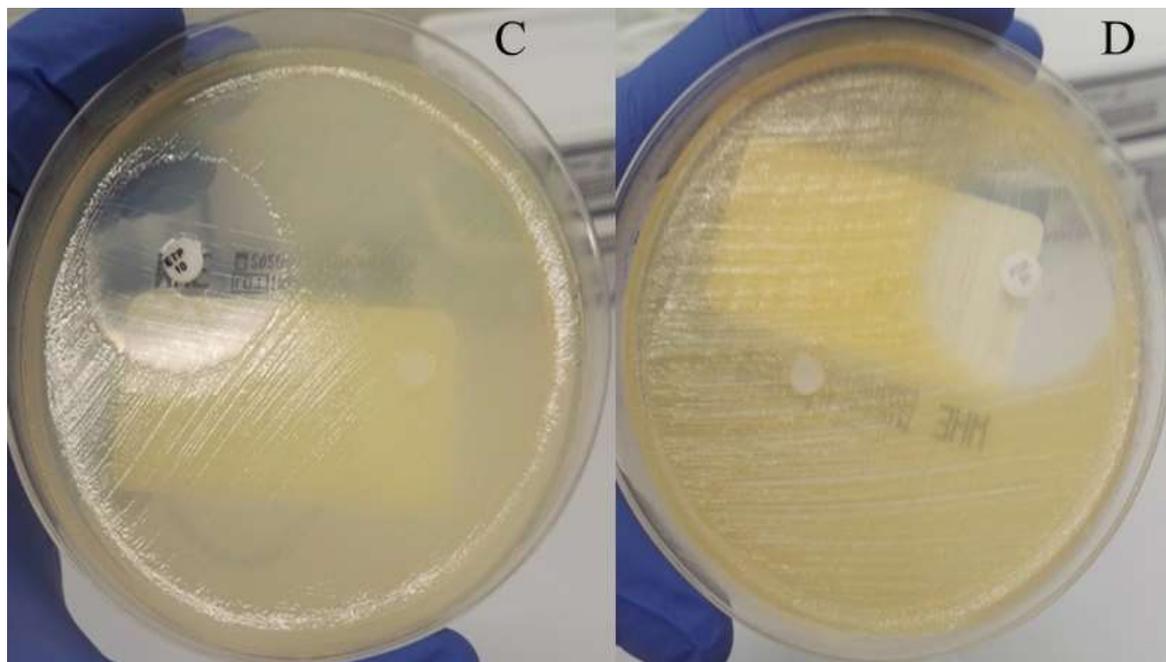


Figura 10 Prueba de susceptibilidad usando extracto proteico de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 a una concentración de $0,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el sensidisco. **A.** Prueba de susceptibilidad sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922. **B.** Prueba de susceptibilidad sobre la cepa de *S. aureus* CMPUJ 080 con extracto proteico de *P. extremaustralis* CMPUJ U515.

5 DISCUSIÓN

- 1) Las características fisicoquímicas predichas por el programa Protparam revelaron varios aspectos importantes acerca de las 18 bacteriocinas clase I asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 y una asociada al genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Son pequeños péptidos que contienen desde 19 hasta 71 aminoácidos, con un peso molecular que varía desde 2.0 hasta 7.5 kDa (Ahmad, 2017). Se debe tener en cuenta que debido a que en el cálculo que realiza el programa para predecir el peso molecular de la proteína no se incluyen las modificaciones post-transcripcionales (Gasteiger, 2005); para el caso de los antibióticos, estos presentan aminoácidos atípicos postraduccionales modificados enzimáticamente como la lantionina, la metilantionina, la dehidroalanina y la dehidrobutirina (Ben Lagha, 2017), esto puede dar como resultado valores de peso molecular no preciso, sin embargo es una buena aproximación al peso real, que solo puede ser determinado por medio de una espectroscopia de masas (Zou, 2018). Los puntos isoelectrónicos de estas bacteriocinas se establecieron en rangos desde 4.1 hasta 9.07. 14 bacteriocinas de la clase I asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 son aniónicas e hidrofílicas debido a que tienen residuos de ácido aspártico (Asp) y de ácido glutámico (Glu) en sus cadenas laterales y están localizados habitualmente en la superficie de la proteína (Cooper y Hausman, 2011). Cuatro bacteriocinas Clase I asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 son catiónicas e hidrofóbicas debido a que tienen aminoácidos laterales no polares (Gly, Ala, Val, Ile) que tienden a localizarse al interior de las proteínas donde no hay contacto con el agua (Cooper y Hausman, 2011). Una bacteriocina clase I asociada al genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 es aniónica e hidrofóbica. El coeficiente de extinción para las 17 bacteriocinas Clase I de *B. subtilis* ATCC 6633 y una de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 teniendo en cuenta los aminoácidos aromáticos Tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) y el aminoácido que contiene átomos de azufre la cisteína (Cys) varía desde 1740 hasta 23740 teniendo en cuenta todos los pares de residuos de cisteínas y asumiendo que todos los residuos de cisteína están reducidos aplica desde 1490 hasta 23490. Para este grupo solo hay una bacteriocina asociada al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 que el coeficiente de extinción 250 se basó en la presencia de los

aminoácidos Tirosina (Tyr) y triptofano ya que no posee cisteínas (Cys). Un compuesto con un alto valor de coeficiente de extinción molar es muy eficiente en la absorción de luz de la longitud de onda adecuada y, por lo tanto, puede detectarse por medidas de absorción cuando se encuentra en disolución a concentraciones muy bajas (Gasteiger, 2005). En cuanto a la estabilidad solo hay tres bacteriocinas clase I, estables cuando son almacenadas en solución acuosa. El índice alifático, por su parte, que se determina a partir de las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos (valina, leucina, isoleucina y alanina), señala la estabilidad de proteínas a altas temperaturas, nos muestras que todas las bacteriocinas son termoestables (Gasteiger, 2005).

De las cuatro bacteriocinas clase II, tres bacteriocinas asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 y una bacteriocina asociada al genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 consistieron en pequeños peptidos (<10kDa) (Ahmad, 2017); que contienen desde 20 hasta 70 residuos de aminoácidos (Bédard, 2018); con puntos isoelectricos (pIs) variantes desde 4.99 a 12.3 que les confieren carga neta cero y solubilidad casi nula (Cooper y Hausman, 2011). Una bacteriocina de la clase II asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 es de carácter ácido e hidrofílica debido a que tienen residuos de Asp y Glu en sus cadenas laterales y están localizados habitualmente en la superficie de la proteína (Cooper y Hausman, 2011). Dos bacteriocinas Clase II asociadas al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 y una bacteriocina asociada al genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 son de carácter básico e hidrófilo debido a que tienen cadenas laterales con grupos básicos cargados: arginina (Arg) y lisina (Lys) y están localizados en la superficie de las proteínas. El coeficiente de extinción para dos bacteriocinas Clase II de *B. subtilis* ATCC 6633 y una de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 teniendo en cuenta los aminoácidos aromáticos Tyr y Trp ya que no poseen Cys, varío desde 5500 hasta 16960. Una secuencia de aminoácidos de la bacteriocina UviB Clase II asociada al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 tiene un coeficiente de extinción molar teniendo en cuenta todos los pares de residuos de cisteínas de 11460 y asumiendo que todos los residuos de cisteína están reducidos es de 11460; siendo muy eficientes en la absorción de luz de la longitud de onda adecuada y, por lo tanto, puede detectarse por medidas de absorción cuando se encuentra en disolución a concentraciones muy bajas (Gasteiger, 2005). El índice

alifático que es el volumen relativo ocupado por cadenas alifáticas (Alanina, Valina, Isoleucina y Leucina), de la tres bacteriocinas clase II asociada al genoma de *B. subtilis* ATCC 6633 y una bacteriocina asociada a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 arrojo valores que varían desde 74.13 hasta 123.91, indicando que la proteína tiene un alto contenido de cadenas alifáticas que le proveen termorresistencia y por lo tanto estabilidad en diferentes condiciones (Gasteiger, 2005).

- 2) La técnica molecular de recombinación homóloga en levaduras como método sencillo y eficaz se basa en el ensamble de múltiples fragmentos con regiones homólogas de 30 pb entre los fragmentos, convirtiéndose en una construcción sofisticada para clonar plásmidos para otros organismos como bacterias (van Leeuwen, 2015). Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación del ADN han permitido descubrir secuencias de genes que se prevé codifican para nuevos metabolitos, y en donde la recombinación juega un importante rol para inducir la producción de moléculas a partir de grupos de genes biosintéticos mediante el intercambio multiplexado de promotores nativos por promotores sintéticos constitutivos aguas arriba de los operones biosintéticos de un grupo de genes (Montiel, 2015).

En este estudio abordamos los genes involucrados en la síntesis de las bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633 para poder diseñar los oligonucleótidos para recombinación homóloga. La subtilina es un antibiótico pentacíclico de 32 aminoácidos. El grupo de genes codificantes de subtilina son *SpaS*, *SpaBC* para la formación de lantionina postraduccional y el translocador *SpaT* para la exportación (Stein, 2005). Para el diseño de los oligonucleótidos tomamos la secuencia de del gen *SpaS*. Para el caso de la subtilosina A producida por varias cepas de *B. subtilis*. El grupo *sbo-alb* agrupa las proteínas AlbA, AlbF y AlbB – D actuando en el procesamiento de subtilosina A (Stein, 2005). La cepa de *B. subtilis* 168 es conocida por sintetizar un antibiótico estable, llamado sublancina 168, exhibiendo actividad bactericida contra otras bacterias Gram positivas. Incluyendo importante patógenos como *B. cereus*, *S. pyogenes* y *S. aureus*. El gen que codifica sublancina 168, llamado *sunA* se identificó secuenciando la región profago SP β del cromosoma *B. subtilis* 168 (Dubois, 2009). Se encontró amplificaciones positivas para bacteriocinas de *B. subtilis* ATCC 6633, lo que significa

que las alteraciones en los oligonucleótidos no afectó su especificidad. No sucedió igual con *P. extremaustralis* CMPUJ U515, ya que se obtuvieron productos de PCR inespecíficos, o quizás la cepa no tiene las secuencias.

- 3) Los extractos proteicos de las cepas *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 presentaron adecuada concentración de proteínas, y se visualizó bandas asociadas a péptidos antimicrobianos que incluirían bacteriocinas. Lamentablemente en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana no se encontró actividad. Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas, luego de analizar las características moleculares, son las que presentan un amplio límite de acción, es decir inhiben el crecimiento tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, hongos patógenos de humanos y virus, incluso diversas células eucarióticas. Una de las características esenciales es su carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas; siendo la membrana y la pared celular los blancos de acción. En relación con lo anterior cabe mencionar el estudio de Lu y colaboradores, 2018, que encontraron en un medio de agar nutriente, crecimiento de *S. aureus* contaminado con otra bacteria desconocida que inhibió significativamente su crecimiento. Al realizar tinción de Gram al frotis bacteriano fue identificada como bacilo Gram positivo. Esta bacteria fue aislada, cultivada y posteriormente caracterizada mediante observación morfológica, pruebas bioquímicas, amplificación por PCR ARNr 16S análisis de secuencias y homologías que finalmente mostro similaridad de hasta el 99,4% con *B. subtilis*; luego ese cultivo activado fue procesado y transferido a medio líquido LB (Luria-Bertani) para obtener el caldo de fermentación por propagación del cultivo. Se usaron centrifugación, precipitación ácida y otros métodos para obtener el extracto crudo de sobrenadante fermentado y bacteriocinas. Finalmente se realizaron pruebas antibacterianas enfrentando estos extractos frente a un grupo diverso de bacterias, y se logró demostrar que los extractos ricos en bacteriocinas tienen un efecto inhibitor superior al mostrado por el extracto del caldo de fermentación puro de *B. subtilis*, lo que indica que el contenido de los factores bacterianos influye en el tamaño de la zona de inhibición. En

este caso podemos inferir que para obtener una mejor actividad biocontroladora es mejor utilizar extractos ricos en bacteriocinas (Lu, 2018).

Sharma y colaboradores, 2018, purificaron y caracterizaron bacteriocinas de *B. subtilis* GAS101 que mostraron actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* y *E. coli*. Además, investigaron la estabilidad de la bacteriocina a diferentes temperaturas y pH, y determinaron su sensibilidad hacia ocho enzimas y seis sustancias químicas. La bacteriocina de *B. subtilis* GAS101 mostró un peso molecular aproximado de 6,5 kDa; mostró en ensayo de gel in situ una zona de inhibición correspondiente al tamaño estimado de la banda de proteínas. Su actividad antibacteriana fue estable comprobada a una temperatura que va desde 30 a 121°C, así como un amplio rango de pH (2-12). La bacteriocina fue degradada por cuatro enzimas proteolíticas, demostrando así su naturaleza proteica. Su probable modo de acción se pudo comprobar a través de la microscopía electrónica de barrido, ya que la bacteriocina fue capaz de interrumpir la integridad de membrana celular bacteriana (Sharma, 2018).

Nonejuie y colaboradores en el 2015, idearon una forma de preparar un extracto de *B. subtilis* 3610 que causo lisis celular en una cepa de *E. coli* con mutación en la proteína final implicada en el transporte de lipopolisacáridos a la membrana externa denominado lptD4213, utilizando la microscopía de fluorescencia descubrieron un método rápido y muy preciso para determinar el objetivo de las moléculas antibacterianas. El método llamado perfil citológico bacteriano (PCB) permitió crear un perfil de parámetros citológicos (longitud, ancho, forma, contenido de ADN, etc.). Mediante la permeabilización de la membrana, la bacteriocina alteró la mutante lptD de *E. coli*. Este perfil citológico nos amplía la visión para utilizar varios compuestos purificados. Proporcionando un método rápido para identificar cepas que producen moléculas con actividades interesantes (Nonejuie, 2016).

El genero de *Pseudomonas spp.* se ha descrito como productor de moléculas antimicrobianas. En el estudio de Oluyombo, Penfold y Diggleb, (2019) quienes apoyados en bacteriocinas codificadas por cepas epidémicas de *P. aeruginosa*, pudieron dilucidar la competencia entre ellas para dominar en las infecciones pulmonares por fibrosis quística al desplazar las otras poblaciones. A hoy se ha identificado bacteriocinas llamadas piocinas de *P. aeruginosa*, clasificándolas en tres clases:

piocinas solubles (tipos S) y tailocinas (tipos R y F). Se ha detectado la distribución de las piocinas de tipo S y R en 24 cepas clínicas aisladas de pacientes con fibrosis quística. Como resultado se observó que cada cepa producía solo un tipo de tailocina tipo R y esta era importante para el dominio, además se observó que el número de piocinas tipo S variaba entre cepas. Se ha demostrado el potencial de las tailocinas tipo R para obtener beneficios terapéuticos en una época en la que la resistencia a los antibióticos es una preocupación mundial (Oluyombo, 2019).

Dorosky y colaboradores, (2017) analizaron un grupo de genes de cepas de *P. chlororaphis* que codifican para dos tailocinas R distintas con diferentes espectros de inhibición, los cuales contribuyen a la competencia bacteriana entre las bacterias asociadas a rizosfera. Las tailocinas son bacteriocinas caracterizadas por un alto peso molecular, resistentes a las proteasas, termolábiles y sedimentables por ultracentrifugación. El análisis detallado llevo a la hipótesis de que *P. chlororaphis* puede codificar dos tailocinas R con funciones similares pero que difieren en el orden de los genes dentro de las dos regiones de ensamble. Los autores de este estudio se propusieron caracterizar el grupo de genes codificantes de tailocina; compararlos con otras especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas, determinar si las dos tailocinas son funcionales como se predice a partir del análisis del genoma y comparar sus espectros de acción. Este estudio demuestra por primera vez que las cepas de *Pseudomonas spp.* pueden producir dos tailocinas R distintas con diferentes espectros de acción, los cuales contribuyen a la competencia bacteriana entre las bacterias asociadas a la rizosfera. Estos resultados proporcionan una nueva perspectiva sobre el papel anteriormente no caracterizado de la producción de tailocina R por especie de *Pseudomonas spp.* asociadas a plantas, en la dinámica de poblaciones bacterianas dentro de las biopelículas adheridas a la superficie y en las raíces (Dorosky, 2017).

Las opciones terapéuticas se han vuelto limitadas para patógenos Gram negativos, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*; McCaughey L.C. y colaboradores (2016) mostraron que las piocinas de *P. aeruginosa* muestran una gran eficacia en una infección pulmonar. La concentración de piocina S5 es 100 veces inferior a la terapia antibiótica utilizada usualmente para combatir la infección letal, disminuyendo la carga bacteriana y ofreciendo protección en un modelo letal de neumonía aguda por *P.*

aeruginosa. La experimentación se llevó a cabo en ratones, a los cuales se le administró por vía intranasal un extracto de piocinas (75 µg), luego se les administro carga bacteriana en una dosis letal, y luego a las 4.5 horas después se sacrificaron los ratones y los recuentos bacterianos de los homogeneizados de pulmón se compararon con los controles. La bacteriocina piocina S5 mostró la mayor eficacia para reducir el número de bacterias. Con esto se prueba que las piocinas son estables en el pulmón y poco inmunogénicas a altas concentraciones. Los genes que codifican para bacteriocinas se encuentran con frecuencia en genomas microbianos y, por lo tanto, podrían ofrecer un suministro rápido de antibióticos altamente dirigidos y potentes contra patógenos Gram negativos problemáticos ofreciendo oportunidades para tratar con éxito las infecciones bacterianas mientras deja intacta la flora bacteriana normal (McCaughey L. C., 2016).

Arumugam y colaboradores (2019), caracterizaron y utilizaron las bacteriocinas producidas por una bacteria aislada del suelo de campo agrícola e identificada por pruebas bioquímicas y análisis del gen 16s del ARNr como *P. aeruginosa* cepa TA6. Estas bacteriocinas fueron utilizadas para determinar la inhibición del crecimiento de cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina. Los resultados del estudio mostraron que 100 µl de sobrenadante del cultivo, colocado en cada pozo por método de difusión en agar, exhibieron actividad antagonista al inhibir el crecimiento de *S. aureus*. La pureza y el peso molecular de las proteínas totales extraídas se confirmó en SDS-PAGE revelando un peso molecular de ~10 kDa. Determinaron la estabilidad máxima de la bacteriocina en diferentes rangos de pH (3.0-10.0), y observaron que esta actividad es máxima a un pH de 7,0. Evaluaron el efecto de las temperaturas en rangos que iban desde - 20 a 100 °C y la máxima actividad de la bacteriocina (100 AU ml⁻¹) fue a - 20, 4, 30 y 40 °C en 10 min. También determinaron si varios compuestos químicos (cloroformo, iso propanol, Tween 80, TCA, Tritón X100, Tween 20 y SDS) afectaban la actividad antibacteriana de la bacteriocina encontrando que no tenían efecto, pero si hay disminución de la actividad con acetona, EDTA y *n*-butanol; además también fueron resistentes al tratamiento con enzimas como proteinasa K, pronasa E y tripsina. El modo de acción de los péptidos sobre las cepas de *S. aureus* determinó acción bactericida. La técnica de citometría de flujo reveló el daño sobre la integridad de la membrana de las células de *S. aureus* causado por las bacteriocinas. En este estudio la cepa aislada de

una muestra de suelo identificada como *P. aeruginosa* TA6, muestra que es un candidato ideal para un mayor rendimiento y mejora de la producción de bacteriocina y su posterior uso. (Arumugam, 2019)

6 CONCLUSIONES

- 1) Se lograron identificar 21 secuencias de bacteriocinas en el genoma de *B. subtilis* ATCC 6333, probablemente porque esta bacteria produce un amplio marco de péptidos antimicrobianos para competir en su entorno natural, Se estima que al menos 4–5% de su genoma se dedica a la producción de compuestos AMC (Abriouel (McCaughey L. C., 2016)., 2011) donde la clase predominante son los péptidos AMC.
- 2) Las secuencias de bacteriocinas codificantes para *B. subtilis* ATCC 6333 fueron amplificadas con éxito. Esto significa que las modificaciones introducidas en los oligonucleótidos para estas secuencias no afectaron su especificidad. Desafortunadamente no sucedió lo mismo con los oligonucleótidos diseñados para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 ya que se volvieron inespecíficos y amplificaron secuencias erróneas.
- 3) Se logró obtener extracto proteico de las cepas en estudio en concentración adecuada, para evaluarlas en *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* CMPUJ 080, pero no se encontró actividad, posiblemente debido a interferencia con otras proteínas. Para realizar las pruebas de susceptibilidad biológica es necesario llevarlas a cabo con la bacteriocina purificada.

Anexo 1

Name	Class	Producer organism	Active vs.	Uniprot N° accession
Cinnamycin (Lanthiopeptin)	Class I	<i>Streptoverticillium griseoverticillatum</i>	Bacillus	P29827
Duramycin-C	Class I	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	Bacillus	P36503
Actagardine (Gardimycin)	Class I	<i>Actinoplanes liguriae</i>	Gram-positive bacteria - Has good antistreptococcal activity: <i>Streptococcus pyogenes</i>	P56650
Ancovenin	Class I	<i>Streptomyces sp</i> (strain A647P-2)	Unavailable data	P38655
Mersacidin	Class I	<i>Bacillus sp</i> (strain HIL-Y85/54728)	Gram-positive bacteria	P43683
Salivaricin-A sa	Class I	<i>Streptococcus salivarius</i>	active on Gram-positive bacteria	P36500
Epidermin	Class I	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	active on Gram-positive bacteria	P08136
Gallidermin	Class I	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	active on Gram-positive bacteria	P21838
Mutacin B-Ny266	Class I	<i>Streptococcus mutans</i>	active on Gram-positive bacteria	P80666
Mutacin 1140 (Mutacin III)	Class I	<i>Streptococcus mutans</i>	active on Gram-positive bacteria	O68586
Streptin	Class I	<i>Streptococcus pyogenes</i>	active on certain Gram-positive bacteria	P0C0H8
Ruminococcin-A	Class I	<i>Ruminococcus gnavus</i>	active on Gram-positive bacteria: pathogenic <i>clostridia</i> - <i>Bifidobacterium longum</i>	P83674
Mutacin-2	Class I	<i>Streptococcus mutans</i>	Gram-positive bacteria: <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus</i> - <i>Peptostreptococcus micros</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Clostridium sporogenes</i> - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> - <i>Actinomyces viscosus</i> - <i>Gardnerella vaginalis</i> - <i>Propionibacterium acnes</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Mycobacterium smegmatis</i> - Gram-negative bacteria: <i>Campylobacter jejuni</i> - <i>Helicobacter pylori</i> - <i>Nesseria gonorrhoeae</i>	O54329
Butyriovibriocin OR79	Class I	<i>Butyriovibrio fibrisolvens</i>	<i>Butyriovibrio fibrisolvens</i> - <i>Butyriovibrio crossotus</i> - <i>Clostridium clostridiforme</i> - <i>Lachnospira multiparus</i> - <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	O85355
Plantaricin J	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	P71461
Variacin	Class I	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus lactis</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> (LSK) - <i>Lactobacillus curvatus</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Lactococcus lactis</i> (SL2) - <i>Micrococcus varians</i> (MCV8) - <i>Micrococcus varians</i> (MCV12) - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria welshii</i> - <i>Clostridium botulinum</i> - <i>Clostridium sp</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus carnosus</i> - <i>Staphylococcus saprophyticus</i> - <i>Staphylococcus sp</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Bacillus pumilis</i> - Note: Inactive against Gram-negative bacteria	Q50848

Streptococcin A-FF22	Class I	<i>Streptococcus pyogenes</i>	active on certain <i>Gram-positive bacteria</i>	P36501
Streptococcin A-M49	Class I	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M49	active on certain <i>Gram-positive bacteria</i>	Q54957
Plantaricin S β	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc</i>	O32830
Bacteriocin J46	Class I	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>lactobacilli - lactococci - bacilli - clostridia - Streptococcus thermophilus - Clostridium tyrobutyricum</i>	P71449
Lacticin 481 (Lactococcin DR)	Class I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	active on Gram-positive bacteria: activity against a wide range of lactic acid bacteria - <i>Staphylococcus carnosus</i> - <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	P36499
Thiostrepton_A	Class I	<i>Streptomyces azureus</i>	Unavailable data	P0C8P8
Plantaricin S α	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc</i>	O32831
Nukacin ISK-1	Class I	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (JCM 1465) - <i>Lactobacillus sakei</i> (JCM 1157) - <i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790 - <i>Staphylococcus simulans</i> 22- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 - <i>Streptococcus bovis</i> JCM 5802 (- <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5890	Q9KWM4
Lacticin 3147 A2	Class I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	active on Gram-positive bacteria: <i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc</i>	O87237
Lacticin 3147 A1	Class I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	active on Gram-positive bacteria: <i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc</i>	O87236
Epicidin 280	Class I	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Unavailable data	O54220
Lactocin-705	Class II	<i>Lactobacillus paracasei</i>	lactic acid bacteria - <i>Listeria - Streptococci</i>	P80959
Epilancin K7	Class I	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Unavailable data	Q57312
Subtilin	Class I	<i>Bacillus subtilis</i>	active on Gram-positive bacteria	P10946
Nisin A	Class I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	active on Gram-positive bacteria: <i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc - Listeria - clostridium</i>	P13068
Pep5	Class I	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	active on Gram-positive bacteria	P19578
Nisin Z	Class I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	active on Gram-positive bacteria: <i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc - Listeria - clostridium</i>	P29559
Plantaricin F	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus - Lactobacillus plantarum - Lactobacillus casei - Lactobacillus sakei - Lactobacillus viridescens - Pediococcus pentosaceus - Carnobacterium piscicola - Lactobacillus plantarum - Lactobacillus sakei - Pediococcus acidilactici - Lactobacillus curvatus</i>	P71469
Enterocin Q	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	<i>Lactobacillus sakei - Enterococcus faecium</i>	Q7WYZ9

Lactococcin-G β	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	Unavailable data	P36962
Subtilisin-A	Class I	<i>Bacillus subtilis</i>	some Gram-positive bacteria such as <i>Listeria</i> - some species of <i>Bacillus</i> - <i>Enterococcus faecium</i>	O07623
Lactocin-S	Class I	<i>Lactobacillus sakei</i> L45	<i>Leuconostoc</i> - <i>Carnobacteria</i> - <i>Lactobacilli</i> - <i>Pediococci</i> - <i>Lactococci</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Staphylococcus</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Clostridium spp</i>	P23826
Leucocin-A (Leucocin A-UAL 187)	Class II	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Lactic bacteria - <i>Listeria monocytogenes</i>	P34034
Leucocin-B (Leucocin B-Ta11a)	Class II	<i>Leuconostoc carnosum</i>	Lactic bacteria - <i>Listeria monocytogenes</i>	Q53446
Lactococcin MMFII	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus lactis), lactis	<i>Enterococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Lactococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria ivanovii</i>	P83002
Mesentericin Y105	Class II	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i>	P38577
Sublancin 168	Class I	<i>Bacillus subtilis</i>	active on some Gram-positive bacteria	P68577
Bavaricin-A	Class II	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacillus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Lactococcus</i>	P80953
Curvacin-A	Class II	<i>Lactobacillus curvatus</i>	closely related <i>Lactobacilli</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Carnobacterium sp</i> - <i>Brochothrix thermosphacta</i>	P0A311
Sakacin-A	Class II	<i>Lactobacillus sakei</i>	inhibits closely related <i>Lactobacilli</i> - <i>Enterococci</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Carnobacterium sp</i> - <i>Brochothrix thermosphacta</i>	P0A310
Bavaricin-MN	Class II	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	P80493
Carnobacteriocin BM1 (Carnobacteriocin B1)	Class II	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Listeria</i> - <i>Enterococcus</i>	P38579
Divergicin M35	Class II	<i>Carnobacterium divergens</i> (<i>Lactobacillus divergens</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria seeligeri</i> - <i>Listeria welshimeri</i> - <i>Listeria grayi</i> - <i>Listeria murrayi</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Carnobacterium divergens</i> - <i>Carnobacterium piscicola</i> - No antibacterial activity against <i>Lactobacillus lactis</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Lactobacillus salivarius</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus rhamnosus</i> - <i>Streptomyces thermophilus</i> - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> - <i>Bifidobacterium breve</i> - <i>Escherichia coli</i>	P84962
Leucocin C	Class II	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	lactic acid bacteria (LAB).	P81053
Mundticin	Class II	<i>Enterococcus mundtii</i>	Gram-positive bacteria especially pathogenic <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Clostridium botulinum</i> - <i>Carnobacterium</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Listeria innocua</i> .	P80925
Divercin V41	Class II	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Listeria innocua</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i>	Q9Z4J1
Sakacin-P (Sakacin 674)	Class II	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacilli</i> - <i>Carnobacteria</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Brochothrix thermosphacta</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i>	P35618

Enterocin P	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	<i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Enterococcus faecium</i>	O30434
Enterocin 7A (Enterocin L50A)	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	clostridia - <i>propionibacteria</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Q1A2D3
Piscicolin 126	Class II	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Gram-positive bacteria; especially the food-borne pathogen <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Carnobacterium</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Leuconostoc</i> .	P80569
Pediocin PA-1 (Pediocin ACH)	Class II	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediococci - <i>Lactobacilli</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Brochothrix thermosphacta</i> - <i>propionibacteria</i> - <i>Bacilli</i> - <i>Enterococci</i> - <i>Staphylococci</i> - <i>Listeria clostridia</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria innocua</i>	P29430
Divergicin A	Class II	<i>Carnobacterium divergens</i>	Unavailable data	Q3SAX6
Enterocin A	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Enterococcus faecalis</i> OU510 - <i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804 - <i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 - <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157 - <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ATCC 19257 - <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Enterococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i>	Q47784
Carnobacteriocin B2 (Carnocin CP52)	Class II	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Listeria</i> - <i>Enterococcus</i>	P38580
Lactacin-F (lafX)	Class II	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacilli</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>	Q48509
Salivaricin A3	Class I	<i>Streptococcus salivarius</i>	Unavailable data	Q38L35
Lactobin-A (Amylovorin-L471)	Class II	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	closely related <i>Lactobacillus</i> sp - <i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009 .	P80696
Salivaricin A	Class I	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M28	Unavailable data	Q48RC9
Carnobacteriocin-A (Piscicolin-61)	Class II	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Carnobacterium</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Clostridium perfringens</i>	P38578
Enterocin B	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	Gram positive: <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Enterococcus faecalis</i> OU510 - <i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 - <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157 - <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465.	O34017
Plantaricin 423	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	Q93FV7
Lactacin-F (lafA)	Class II	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> - other <i>Lactobacilli</i>	P24022
Acidocin A	Class II	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> - <i>Streptococcus</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Enterococcus</i>	Q48496

Cytolysin	Class I	<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Lactobacillus leichmanni</i> - <i>Lactobacillus fermenticum</i> - <i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Leuconostoc oenos</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Q9KFM6
Plantaricin W β	Class I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> spp - <i>Lactobacillus lactis</i> - <i>Oenococcus oeni</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	Q9AF68
Listeriocin 743A	Class II	<i>Listeria innocua</i>	Unavailable data	Q9AGM4
Enterocin SE-K4	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	Unavailable data	Q8GR39
Penocin A	Class II	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	<i>Carnobacterium piscicola</i> - <i>Clostridia butyricum</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Lactobacillus curvatus</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Lactococcus raffinolactis</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Q03HX9
Pyocin S1	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	Q06583
Pyocin S2	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	Q06584
Lactococcin-G α	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (<i>Streptococcus lactis</i>)	Unavailable data	P36961
Enterolysin A	Class III	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	<i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Lactobacillus brevis</i> - <i>Lactobacillus curvatus</i> - <i>Lactococcus cremoris</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Staphylococcus carnosus</i> - <i>Propionibacterium jensenii</i> .	Q9F8B0
Helveticin-J	Class III	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Estrecho espectro de inhibición.	P22294
Aureocin A53	Class II	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Staphylococcus simulans</i> - <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19257 - <i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754 - <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 - <i>Lactobacillus sakei</i> UAL1218 - <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL26 - <i>Enterococcus faecium</i> BFE900- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	Q8GPI4
Hiracin JM79	Class II	<i>Enterococcus hirae</i> DCH5	<i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus curvatus</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Propionibacterium</i> sp - <i>Propionibacterium acidipropionici</i> - <i>Clostridium tyrobutyricum</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Listeria seeligeri</i> - <i>Listeria welshimeri</i> - <i>Listeria grayi</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	Q0Z8B6

Enterocin AS-48	Class IV	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	Gram-positive species: - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Bacillus circulans</i> - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Corynebacterium glutamicum</i> - <i>Corynebacterium bovis</i> - <i>Mycobacterium phlei</i> - <i>Nocardia corrallina</i> - <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Micrococcus lysodeikticus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus faecalis</i> - <i>Streptococcus faecium</i> - Gram-negative species: - <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Proteus inconstans</i> - <i>Salmonella typhimurium</i> - <i>Shigella sonnei</i> - <i>Pseudomonas fluorescens</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Pseudomonas reptilivora</i> - note: not active against <i>Alcaligenes faecalis</i> - <i>Proteus sp</i> - <i>Pasteurella sp</i>	Q47765
Nisin Q	Class I	<i>Lactococcus lactis</i>	wide range of Gram-positive bacteria including LAB - <i>Bacillus sp</i> - <i>Listeria sp</i> - <i>Micrococcus sp</i> .	Q76HP8
Plantaricin W α	Class I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	D2KR94
Nisin U	Class I	<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 27958	Active against <i>Streptococcus pyogenes</i> - <i>Streptococcus uberis</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i> - <i>Staphylococcus simulans</i> - <i>Staphylococcus cohnii</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Streptococcus mitis</i> .	Q2QBT0
Enterocin 96	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positive: <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Enterococcus faecium</i> WHE - <i>Enterococcus hirae</i> - <i>Enterococcus pseudoavium</i> - <i>Enterococcus sulfureus</i> - <i>Enterococcus saccharolyticus</i> - <i>Enterococcus columbae</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> - <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Staphylococcus xylosum</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - Gram negative: <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium - <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Serratia liquefaciens</i> - <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Escherichia coli</i> .	Q82Y19
Ubericin A	Class IV	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria grayi</i> - <i>Listeria seeligeri</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Streptococcus bovis</i> - <i>Enterococcus hirae</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - note: not active against <i>Streptococcus pyogenes</i> - <i>Streptococcus salivarius</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i> - <i>Streptococcus gordonii</i> - <i>Streptococcus mitis</i> - <i>Streptococcus mutans</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	A9Q0M7
Duramycin (duramycin-B) (Leucopeptin)	Class I	<i>Streptomyces griseovercillatus</i> / <i>Streptomyces cinnamomeus</i> NRRL B-1699	Unavailable data	P36504
Cyclothiazomycin	Class I	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> strain 10-22	Unavailable data	D5MEG5
Thermophilin 1277	Class I	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptomyces thermophilus</i> SBT10137 - <i>Streptomyces thermophilus</i> SBT10814 - <i>Streptomyces thermophilus</i> ATCC19258 - <i>Streptomyces thermophilus</i> SBT10813 - <i>Streptomyces thermophilus</i> SBT10838 - <i>Streptomyces thermophilus</i> SBT10914 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132 - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SBT0164 - <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT10511 - <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 - <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT1270 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454 - <i>Microbacterium lacticum</i> SBT3513 - <i>Microbacterium lacticum</i> BT3514 - <i>Enterococcus faecalis</i> BT3515 - <i>Clostridium butylicum</i> SBT3516 - <i>Clostridium sprogenes</i> IFH 493 - <i>Clostridium tyrobutylicum</i> SBT3517 - <i>Bacillus cereus</i> IFO13494.	A7M695

Bovicin HJ50	Class I	<i>Streptococcus bovis</i> HJ50	<i>Bacillus megaterium</i> AS1.941 - <i>Bacillus subtilis</i> AS1.1087 - <i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174 - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> AS1.2 - <i>Leuconostoc dextranicum</i> 181 - <i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166 .	Q83ZN8
Columbicin A	Class I	<i>Enterococcus columbae</i>	Unavailable data	A0FL76
Michiganin-A	Class I	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Unavailable data	Q09T02
Bacteriocin T8	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> T8	<i>Enterococcus faecalis</i> MDK1 - <i>Enterococcus faecalis</i> MDK2 - <i>Enterococcus faecalis</i> MDK3 - <i>Enterococcus faecalis</i> MDK4 - <i>Enterococcus faecalis</i> MDK5 - <i>Lactobacillus sakei</i> LMG 13558 - <i>Enterococcus faecalis</i> LMG 13566 - <i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071 - <i>Propionibacterium</i> sp. LMG 13574 .	Q27HG2
Colicin-Ib	Class II	<i>Escherichia coli</i>	Unavailable data	P04479
Enterocin E-760	Class II	<i>Enterococcus</i> sp	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> 9-72 - Gram-negative bacteria: <i>Campylobacter</i> sp - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> 1 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> 4 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> 204 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> 237 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> 434/4 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> 370 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 383/60 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 320 - <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Gallinarum</i> biovar <i>Pullorum</i> - <i>Escherichia coli</i> HB101 - <i>Escherichia coli</i> C600 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Y-63 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 G-3 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 OD-3 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 T-39 - <i>Yersinia enterocolitica</i> 03 - <i>Yersinia enterocolitica</i> 09 - <i>Yersinia enterocolitica</i> 04 - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ser 4 - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 14 - <i>Citrobacter freundii</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Shigella dysenteriae</i> - <i>Campylobacter jejuni</i> L4	P85147
Enterocin HF	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	Unavailable data	P86183
Thuricin-17	Class I	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Escherichia coli</i> MM294 4(pBS42) - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>thuringiensis</i> HD2 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. sotto 4-1 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>galleriae</i> HD29 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>canadensis</i> HD224 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>entomocidus</i> HD10 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>morrisoni</i> HD12 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>darmstadiensis</i> HD146 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>pakistani</i> HD395 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>indiana</i> HD521 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tochigiensis</i> HD868 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>cameroun</i> 273B - <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>xiaguangensis</i> 3397 - <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>asturiensis</i> EA 34594 - <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>rongseni</i> Scg04-02 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>thuringiensis</i> Bt1627 - <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>alesti</i> HD4 - <i>Bacillus cereus</i> T-HT - <i>Bacillus cereus</i> T-HW3 - <i>Bacillus cereus</i> 6A3 StrepR - <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 - <i>Bacillus licheniformis</i> 9945A - <i>Bacillus licheniformis</i> 749 - <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 19213 - <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 - <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 - <i>Bacillus</i> KTCC B1 - <i>Bacillus</i> KTCC B2 - <i>Brevibacillus brevis</i> ATCC 8246 - <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10 - <i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842 - <i>Paenibacillus dendritiformis</i> C168 .	B5U2V4
Leucocin Q	Class II	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> QU 15	<i>Bacillus circulans</i> JCM 2504T - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090- <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC BAA-679 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 580.	D7UPI8
Leucocin N	Class II	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> QU 15	<i>Bacillus circulans</i> JCM 2504T - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC BAA-679 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 - <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157- <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124.	D7UPI9

Avicin A	Class II	<i>Enterococcus avium</i>	Active against <i>Carnobacterium divergens</i> NCDO 2763 - <i>Carnobacterium divergens</i> NCDO 2306 - <i>Carnobacterium piscicola</i> NCDO 2762 - <i>Carnobacterium piscicola</i> NCDO 2764 - <i>Enterococcus avium</i> GM62 - <i>Enterococcus avium</i> UA62 - <i>Enterococcus avium</i> UM83 - <i>Enterococcus faecalis</i> EF BRIDGE (B) - <i>Enterococcus maldoratus</i> XM83 - <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 205= <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714 (MIC=1.25 nM) - <i>Leuconostoc lactis</i> NCDO 533 (MIC=5.02 nM) - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NCDO 529 (MIC=2.51 nM) - <i>Listeria innocua</i> BL86/26 B - <i>Pediococcus acidilactici</i> NCDO 1851- <i>Pediococcus pentosaceus</i> NCDO 814.	D2DXK5
Salivaricin 9	Class I	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240- <i>Micrococcus luteus</i> GAB13- <i>Streptococcus equisimilis</i> ATCC12388 - <i>Corynebacterium</i> GH17 - <i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454 - <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC12344 - <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC12384.	Q09I51
Mundticin L	Class II	<i>Enterococcus mundtii</i>	Unavailable data	C4P7I8
Enterocin Xalpha	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	Gram-positive: <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Enterococcus faecalis</i> OU510 - <i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917- <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157 - <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ATCC 19257 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090.	D7UP03
Enterocin Xbeta	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	Gram-positive: - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Enterococcus faecalis</i> OU510 - <i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917- <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157- <i>Bacillus circulans</i> JCM 2504- <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257- <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090.	D7UP04
Staphylococin C55 alpha	Class I	<i>Staphylococcus aureus</i>	Unavailable data	Q9S4D3
Staphylococin C55 beta	Class I	<i>Staphylococcus aureus</i>	Unavailable data	Q9S4D2
Lichenicidin A1	Class I	<i>Bacillus licheniformis</i> (strain DSM 13 / ATCC 14580)	Unavailable data	Q65DC4
Lichenicidin A2	Class I	<i>Bacillus licheniformis</i> (strain DSM 13 / ATCC 14580)	Unavailable data	P86720
Thiocillin_GE37468_A	Class I	<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 55365/O/5	Inhibits growth of <i>B.subtilis</i> and methicillin-resistant <i>S.aureus</i> (MRSA).	P0C8P9
Sakacin G	Class II	<i>Lactobacillus sakei</i>	Unavailable data	Q8KWU5
Bacillocin 602	Class II	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (Bacillus polymyxa)	<i>Campylobacter jejuni</i>	P86393
Bacillocin 1580	Class II	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	P86394
Epidermicin NI01	Class II	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 224	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 37 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 42 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 44 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 60- <i>Staphylococcus epidermidis</i> 93- <i>Staphylococcus epidermidis</i> 156- <i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A - <i>Staphylococcus saprophyticus</i> - <i>Staphylococcus hominis</i> - <i>Staphylococcus warneri</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> 1195.	H9BG66

Laterosporulin	Class II	<i>Brevibacillus sp.</i> GI-9	<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 121- <i>Staphylococcus aureus</i> MTCC 1430- <i>Listeria monocytogenes</i> MTCC 839- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 1934- <i>Escherichia coli</i> MTCC 1610 - <i>Vibrio cholerae</i> .	H1ZZ98
Enterocin W alfa	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus circulans</i> JCM 2504 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885- <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> JCM 7638 - <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 19435 - <i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> JCM 1157 .	H3JSS9
Enterocin W beta	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus circulans</i> JCM 2504 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> JCM 7638 - <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 19435 - <i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> JCM 1157.	H3JST0
Paenicidin A	Class I	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30509 (Bacillus polymyxa)	Unavailable data	K7TS19
Thuricin CD alpha	Class I	<i>Bacillus thuringiensis</i> DPC 6431	<i>Bacillus cereus</i> NCIMB 700577- <i>Bacillus cereus</i> NCIMB 700578- <i>Bacillus firmus</i> LMG 7125T - <i>Bacillus mycoides</i> DPC 6335 - <i>Bacillus thuringiensis</i> LMG 7138- <i>Clostridium difficile</i> ATCC 600- <i>Clostridium difficile</i> ATCC 43594- <i>Clostridium difficile</i> R027 NCTC 13366 - <i>Clostridium difficile</i> 6220 - <i>Clostridium difficile</i> 6221 - <i>Clostridium difficile</i> 6219 - <i>Clostridium difficile</i> 6350 - <i>Clostridium difficile</i> 6351 - <i>Clostridium difficile</i> IBS 16 - <i>Clostridium difficile</i> Cr 15- <i>Clostridium difficile</i> UC 38- <i>Clostridium difficile</i> UC 38- <i>Clostridium difficile</i> CR 79- <i>Clostridium difficile</i> UC 47- <i>Clostridium difficile</i> CR11 - <i>Clostridium difficile</i> UC 29 - <i>Clostridium difficile</i> CR 02- <i>Clostridium difficile</i> UC 59- <i>Clostridium difficile</i> UC 27 - <i>Clostridium difficile</i> H 76 - <i>Clostridium difficile</i> BS 47 - <i>Clostridium histolyticum</i> NCIMB 503 - <i>Clostridium indolis</i> NCIMB 9731 - <i>Clostridium lituseburense</i> NCIMB 10637 - <i>Clostridium tyrobutyricum</i> NCIMB 8243 - <i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 9479T - <i>Lactobacillus fermentum</i> LMG 6902 - <i>Lactobacillus johnsonii</i> DSM 10533T- <i>Lactococcus lactis</i> DPC 3157- <i>Listeria innocua</i> DPC 3572 - <i>Listeria monocytogenes</i> DPC 1768 - <i>Listeria monocytogenes</i> DPC 3437 - <i>Listeria monocytogenes</i> .	F5AT07
Garvicin A	Class II	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> H14 - <i>Lactococcus garvieae</i> Imau 50094 - <i>Lactococcus garvieae</i> Pw 1537 - <i>Lactococcus garvieae</i> 1205 - <i>Lactococcus garvieae</i> CECT 4531 - <i>Lactococcus garvieae</i> G-34 - <i>Lactococcus garvieae</i> MAM 75 - <i>Lactococcus garvieae</i> MAM 77 - <i>Lactococcus garvieae</i> CP-1 - <i>Lactococcus garvieae</i> BA063090 - <i>Lactococcus garvieae</i> 4876/006 - <i>Lactococcus garvieae</i> 1686 - <i>Lactococcus garvieae</i> 5457 - <i>Lactococcus garvieae</i> 5657 - <i>Lactococcus garvieae</i> 8831 - <i>Lactococcus garvieae</i> LG-2 - <i>Lactococcus garvieae</i> 1204 - <i>Lactococcus garvieae</i> 3AA7 - <i>Lactococcus garvieae</i> 4AB5 - <i>Lactococcus garvieae</i> CAS-2 - <i>Lactococcus garvieae</i> DK 2-25 - <i>Lactococcus garvieae</i> N201 - <i>Lactococcus garvieae</i> T1-1 - <i>Lactococcus garvieae</i> T2-17 - <i>Lactococcus garvieae</i> NRTC0611 - <i>Lactococcus garvieae</i> Lg80 - <i>Lactococcus garvieae</i> 240-88 - <i>Lactococcus garvieae</i> 306/79 - <i>Lactococcus garvieae</i> 364-88 - <i>Lactococcus garvieae</i> BM06/00349 - <i>Lactococcus garvieae</i> 1481/03 - <i>Lactococcus garvieae</i> 2497/03 - <i>Lactococcus garvieae</i> BA06/021331 - <i>Lactococcus garvieae</i> DPI.	H2B2W4
NAI-107 Microbisporicin	Class I	<i>Microbispora sp.</i> (strain 107891)	Unavailable data	P85065
LsbB	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis (Streptococcus lactis)	Unavailable data	Q7X2B5
Pentocin KCA1	Class II	<i>Lactobacillus pentosus</i> KCA1	Unavailable data	I9APR2
BacCH91	Class I	<i>Staphylococcus aureus</i> CH-91 DSM 26258	<i>Micrococcus luteus</i> - <i>staphylococcus staphylococcus</i> - <i>Lactococcus lactis</i> .	I6XG59

Elgicins	Class I	<i>Paenibacillus elgii</i> B69	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CMCC 26069 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 - <i>Proteus vulgaris</i> CMCC 49027.	I1YCV0
pyocin_AP41_subunit	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	Q51502
Ericin_A	Class I	<i>Bacillus subtilis</i>	active on Gram-positive bacteria	Q93GH5
Ericin_S	Class I	<i>Bacillus subtilis</i>	active on Gram-positive bacteria	Q93GH3
Siomycin	Class I	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	Unavailable data	C0JRW2
Thiostrepton_B	Class i	<i>Streptomyces laurentii</i>	Unavailable data	C0JRY7
Bacteriocin_BCN5	Class III	<i>Clostridium perfringens</i>	Unavailable data	P08696
SRCAM 1580	Class II	<i>Bacillus circulans</i>	<i>C. jejuni</i>	P86394
Subpeptin JM4-B	Class II	<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positive and Gram-negative bacteria: <i>Salmonella</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus viridescens</i> - <i>Micrococcus flavus</i> - <i>Corynebacterium glutamicum</i> - <i>Cosmarium crenatum</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Shigella flexneri</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Bacillus thuringiensis</i>	P83879
Lichenin	Class II	<i>Bacillus licheniformis</i>	Has antibacterial activity only against strictly anaerobic rumen bacteria.	P82907
Halocin-C8	Class II	<i>Halobacterium</i> sp (strain AS7092)	wide variety of haloarchaeons	P83716
Microcin J25	Class I	<i>Escherichia coli</i>	Exhibits potent bacteriocidal activity against a range of Enterobacteriaceae - including several pathogenic <i>Escherichia coli</i> - <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i> .	Q9X2V7
Plantaricin-A	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Closely related species <i>Lactobacillus</i> .	P80214
Acidocin 8912	Class II	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Unavailable data	Q48501
Leucocin-B	Class II	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	wide spectrum of lactic acid bacteria.	P81052
Plantaricin K	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Lactobacillus viridescens</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Carnobacterium piscicola</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Lactobacillus curvatus</i>	P71460
Plantaricin E	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	P71470
Divergicin 750	Class II	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Carnobacterium</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Clostridium perfringens</i>	Q46597
Halocin-S8	Class III	<i>Haloarchaeon S8a</i>	haloarchaeons <i>Halobacterium salinarium</i> NRC817 - <i>Halobacterium</i> GRB - <i>Haloferax gibbonsii</i>	Q9HHA8
Thermophilin A	Class II	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Lactococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Bifidobacterium</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Bacillus</i> - <i>Clostridium</i> - <i>Staphylococcus</i>	O54454

Microcin B17 (MccB17)	Class I	<i>Escherichia coli</i>	Unavailable data	P05834
Thermophilin 13	Class II	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc</i>	O54455
Bacteriocin 31	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	<i>Enterococcus hirae - Enterococcus faecium - Listeria monocytogenes</i>	Q47778
Coagulin A	Class II	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans - Enterococcus faecium - Leuconostoc mesenteroides - Listeria innocua - Listeria monocytogenes - Listeria seeligeri - Oenococcus oeni - Pediococcus pentosaceus - Pediococcus damnosus</i>	Q9EZB2
Fulvocin-C	Class II	<i>Myxococcus fulvus</i>	Several myxobacterial strains.	P01547
Lactococcin-B	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus cremoris), cremoris	<i>Lactococci</i>	P35518
Plantaricin NC8 α	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	Q84HW0
UviB	Class II	<i>Clostridium perfringens</i>	Unavailable data	P15936
Brochocin-c	Class II	<i>Brochothrix campestris</i>	<i>Bacillus - Brochothrix - Carnobacterium - Clostridium - Enterococcus - Lactobacillus - Lactococcus - Leuconostoc - Listeria - Pediococcus - Staphylococcus - Streptococcus</i>	O85756
Mundticin KS	Class II	<i>Enterococcus mundtii</i>	Unavailable data	Q8RR65
Boticin B	Class II	<i>Clostridium botulinum</i>	active against various strains of <i>Clostridium botulinum</i> - related clostridia	Q9KGGZ4
SRCAM 37	Class II	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (<i>Bacillus polymyxa</i>)	<i>C. jejuni</i>	P86395
Lactococcin-A	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (Streptococcus cremoris), cremoris	<i>Lactococci</i>	P0A313
Plantaricin NC8 β	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	Q84HW1
Enterocin 1071A	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	Unavailable data	Q9L9U6
Enterocin CRL35 (Mundticin KS)	Class II	<i>Enterococcus mundtii</i>	Unavailable data	Q6TGQ7
Microcin H47	Class I	<i>Escherichia coli</i>	Active on bacteria phylogenetically related to the producing strain.	P62530
Acidocin B (AcdB)	Class II	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Listeria monocytogenes - Clostridium sporogenes - Brochothrix thermosphacta - Lactobacillus fermentum - Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus.</i>	Q48498
Acidocin LF221B (Gassericin K7 B)	Class II	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Unavailable data	Q7WRX6
Plantaricin 1.25 β	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum - plantarum sp - plantarum coryniformis</i>	Q9ZEU9

Gassericin T (gassericin K7 B)	Class II	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Unavailable data	Q9XDR7
Microcin E492	Class I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Q9Z4N4
Colicin-V (Microcin-V)	Class I	<i>Escherichia coli</i>	active against <i>Escherichia coli</i> (also closely related bacteria) - <i>Enterobacteriaceae</i>	P22522
Gassericin A	Class IV	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Unavailable data	O24790
Paenibacillin	Class I	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (Bacillus polymyxa)	<i>Bacillus spp</i> - <i>Clostridium sporogenes</i> - <i>Lactobacillus spp</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - <i>Listeria spp</i> - <i>Pediococcus cerevisiae</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i>	P86013
Propionicin T1	Class II	<i>Propionibacterium thoenii</i>	Unavailable data	Q9F6C4
Halocin H4	Class III	<i>Halobacterium mediterranei</i> (Haloferax mediterranei)	Unavailable data	Q48236
Cerein 7B	Class II	<i>Bacillus cereus</i> Bc7 (CECT 5148)	active against <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468 - <i>Listeria innocua</i> G244.	Q2MDB2
Colicin-E1	Class III	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	P02978
Colicin-10	Class III	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Q47125
Colicin-N	Class III	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	P08083
Colicin-M	Class III	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> - <i>Escherichia coli</i>	P05820
Propionicin SM1	Class II	<i>Propionibacterium jensenii</i>	<i>Propionibacterium jensenii</i> DSM20274	Q9L454
Linocin M18	Class III	<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Listeria spp</i>	Q45296
Epilancin 15x	Class I	<i>Staphylococcus Epidermidis</i>	Unavailable data	P86047
Carnocyclin-A	Class IV	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (Carnobacterium piscicola)	Gram-positive: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL26 - <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> LV17A - <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 - <i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754 - <i>Brochothrix thermosphacta</i> ATCC 11509 - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 - <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 - <i>Enterococcus faecium</i> BFE900 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 11602 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC3147 - <i>Lactobacillus sakei</i> 706 - <i>Lactobacillus sakei</i> UAL1218 - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105 - <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0 - <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 - <i>Listeria monocytogenes</i> H7762 - <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256 - <i>Listeria monocytogenes</i> HPB 642 - <i>Listeria monocytogenes</i> UAFM 1 - <i>Listeria monocytogenes</i> UAFM 15 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	B2MVM5

Bacteriocin E50-52	Class II	<i>Enterococcus faecium</i> (Streptococcus faecium)	<i>Campylobacter jejuni</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i> - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria grayi</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Listeria denitrificans</i> - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 - <i>Morganella morganii</i> - <i>Salmonella spp.</i> - <i>Shigella dysenteriae</i>	P85148
Trifolitoxin	Class II	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	Unavailable data	P42723
Botromycin D	Class I	<i>Streptomyces sp.</i>	that displays antibiotic activity against methicillin-resistant S.aureus (MRSA)	K4JY29
Durancin TW-49M	Class II	<i>Enterococcus durans</i> QU 49	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Lactobacillus alimentarius</i> JCM 1095 - <i>Lactobacillus kimchii</i> JCM 10707 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 - <i>Lactobacillus sakei ssp. sakei</i> JCM 1157 - <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> ATCC 19435 - <i>Geobacillus stearothermophilus</i> JCM 2501 - <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 - <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus circulans</i> JCM 2504.	B3IUC6
Durancin Q	Class II	<i>Enterococcus durans</i>	Unavailable data	B5BP43
Uberolysin	Class I	<i>Streptococcus uberis</i> strain 42	<i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Enterococcus hirae</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Listeria ivanovii</i> - <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i> - <i>Streptococcus anginosus</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i> - <i>Streptococcus equisimilis</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i> - <i>Streptococcus salivarius</i>	A5H1G9
Circularin A	Class IV	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Unavailable data	Q5L226
Butyriovibriocin AR10	Class I	<i>Butyriovibrio fibrisolvens</i> AR10	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC25537 - <i>Eubacterium ruminantium</i> ATCC17233 - <i>Lachnospira multiperus</i> ATCC19207 - <i>Lachnospira vitulinus</i> ATCC27783 - <i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC27780 - <i>Ruminococcus albus</i> SY3 - <i>Streptococcus bovis</i> ATCC33317 - <i>Clostridium perfringens</i> - <i>Listeria ivanovii</i> 80 - <i>Listeria gray</i> 83.	Q9ZGP5
Propionicin-F	Class II	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. freudenreichii LMG 2946	<i>Propionibacterium freudenreichii ssp. freudenreichii</i> ATCC 6207 - <i>Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii</i> ATCC 9614 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ATCC 9616 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> IFO12426 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> LMG 2842 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> LMG 3001 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU-P24 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU-P59 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU-P83 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU-P98 - <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU-P104.	Q6E3K9
Lacticin Q	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> QU 5	<i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754 - <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 - <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL26 - <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL26 - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 - <i>Enterococcus faecium</i> BFE900 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> M46 - <i>Lactobacillus sakei</i> UAL1218 - <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19257 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	A4UVR2
Lacticin Z	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> QU 14	<i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus circulans</i> - <i>Bacillus coagulans</i> - <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i> - <i>Lactobacillus coryniformis</i> - <i>Lactobacillus kimchii</i> - <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Lactobacillus brevis</i> - <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Enterococcus mundtii</i> - <i>Enterococcus hirae</i> - <i>Enterococcus durans</i> - <i>Pediococcus pentosaceus</i> - <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Pediococcus dextrinicus</i> - <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> - <i>Lactococcus raffinolactis</i> - <i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i> - <i>Lactococcus lactis</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i> - <i>Listeria innocua</i> - <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Streptococcus mutans</i> - <i>Streptococcus bovis</i> - <i>Streptococcus salivarius</i> .	A7M6Q0

Thiocillin (Micrococcin P1) (Micrococcin P2) (Thiocillin I) (Thiocillin II) (Thiocillin III) (Thiocillin IV) (Antibiotic YM-266183) (Antibiotic YM-266184)	Class I	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31)	<i>Bacillus subtilis</i> PCI219 - <i>Bacillus anthracis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> 80257 - <i>Streptococcus pyogenes</i> C-203 - <i>Streptococcus pneumoniae</i> type D.	Q812G9
Colicin-Ia	Class III	<i>Escherichia coli</i>	Unavailable data	P06716
Microcin-24	Class II	<i>Escherichia coli</i>	Unavailable data	Q46971
Plantaricin ASM1	Class II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	C7G1H4
Dysgalactacin	Class III	<i>Streptococcus equisimilis</i>	Gram positive: <i>Streptococcus pyogenes</i> FF22	Q14DY1
Clostinin 574	Class III	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Unavailable data	Q8GCU9
Lactococcin 972	Class II	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Streptococcus <i>lactis</i>)	Unavailable data	O86283
Lactocyclin Q	Class IV	<i>Lactococcus sp.</i> QU 12	Gram-positive: <i>Lactococcus sp.</i> strain QU 12 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7638 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 - <i>Lactococcus lactis</i> QU 1 - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19275 - <i>Lactococcus raffinolactis</i> JCM 5706 - <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 - <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM 1134 - <i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132 - <i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 - <i>Lactobacillus kimchii</i> JCM 10707 - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 - <i>Weissella cibaria</i> JCM 12495 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5890 - <i>Pediococcus acidilactici</i> JCM 8797 - <i>Pediococcus dextrinicus</i> JCM 5887 - <i>Enterococcus faecium</i> JCM5804 - <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 - <i>Enterococcus durans</i> NBRC 100479 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Streptococcus salivarius</i> JCM 5707 - <i>Streptococcus bovis</i> JCM 5802 - <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus circulans</i> JCM 2504 - <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 - <i>Bacillus cereus</i> JCM 2152 - <i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC BAA-679 - <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 12600 - Gram-negative: <i>Escherichia coli</i> JM109 - <i>Escherichia coli</i> NBRC 3301.	B9ZZY0
Garvicin ML	Class IV	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gram-positive : <i>Lactobacillus reuteri</i> 20016 - <i>Lactobacillus helveticus</i> 15009 - <i>Lactobacillus curvatus</i> 2739 - <i>Lactobacillus casei</i> 334 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> 4356 - <i>Lactobacillus sakei</i> 2714 - <i>Lactococcus lactis</i> BB24 - <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 - <i>Lactococcus lactis</i> DPC5598 - <i>Lactococcus garvieae</i> 5274 - <i>Lactococcus garvieae</i> 5806 - <i>Lactococcus garvieae</i> 5807 - <i>Lactococcus raffinolactis</i> 988 - <i>Pediococcus acidilactici</i> 347 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61 - <i>Enterococcus faecium</i> P13 - <i>Enterococcus faecium</i> L50 - <i>Enterococcus faecialis</i> DBH18 - <i>Enterococcus faecalis</i> P4 - <i>Propionibacterium sp.</i> P6 - <i>Propionibacterium acidipropionici</i> 563 - <i>Clostridium tyrobutyricum</i> 3.5CT - <i>Clostridium tyrobutyricum</i> 1754 - <i>Clostridium perfringens</i> 376 - <i>Clostridium botulinum</i> 551 - <i>Listeria monocytogenes</i> 4032 - <i>Listeria ivanovii</i> 913 - <i>Listeria seeligeri</i> 917 - <i>Listeria grayi</i> 931 - <i>Listeria welshimeri</i> 919 - <i>Brochothrix thermosphacta</i> 847 - <i>Streptococcus pneumoniae</i> FQ26 - <i>Streptococcus pneumoniae</i> 67620 - <i>Streptococcus pneumoniae</i> 15M-1047 .	D2KC49
Carocin D	Class III	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Unavailable data	D8WUT9

Zoocin A	Class III	<i>Streptococcus equi</i> subsp. zooepidemicus	Gram-positive: <i>Streptococcus pyogenes</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>Equisimilis</i> .	O54308
Glycocin F	Class I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Unavailable data	E9K9Z1
Enterocin EJ97	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	<i>Bacillus circulans</i> - <i>Bacillus coagulans</i> CECT 12 - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Bacillus stearothermophilus</i> CECT 49 - <i>Bacillus stearothermophilus</i> CECT 148 - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Paenibacillus macerans</i> CECT 19 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i> S-13 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i> S-14 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i> S-32 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i> S-86 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-39 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-40 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-47 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-48 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-54 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-55 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i> S-71 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>zymogenes</i> S-50 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>zymogenes</i> S-79 - <i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>zymogenes</i> S-81 - <i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 - <i>Enterococcus faecalis</i> OG1X - <i>Enterococcus faecium</i> S-29 - <i>Enterococcus faecium</i> S-60 - <i>Listeria grayi</i> CECT 931 - <i>Listeria innocua</i> CECT 4030 - <i>Listeria ivanovii</i> CECT 913 - <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032 - <i>Listeria murrayi</i> CECT 942 - <i>Listeria welshimeri</i> CECT 919 - <i>Staphylococcus aureus</i> .	Q8KMU4
Sonorensin	Class I	<i>Bacillus sonorensis</i>	Unavailable data	X2CRH8
Microcin C7	Class I	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> - <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i> - <i>Yersinia</i> - <i>Proteus</i> - <i>Escherichia coli</i>	Q47505
Leucocyclicin Q	Class IV	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TK41401	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> JCM 7638 - <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435 - <i>Lactococcus</i> sp. QU 12 - <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157 - <i>Weissella cibaria</i> JCM 12495 - <i>Weissella paramesenteroides</i> JCM 9890 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 - <i>Pediococcus dextrinicus</i> JCM 5887 - <i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Streptococcus salivarius</i> JCM 5707 - <i>Streptococcus bovis</i> JCM 5802 - <i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705 - <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> JCM 1465 - <i>Bacillus cereus</i> JCM 2152 - <i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp.-JCM 6124 - <i>Escherichia coli</i> JM109 - <i>Escherichia coli</i> NBRC 3301.	G5ELQ0
LCI	Class II	<i>Bacillus subtilis</i> A14	<i>Xanthionias campestris</i> pv. <i>oryzae</i> G - <i>Xanthionias campestris</i> pv. <i>oryzae</i> X4 - <i>Xanthionias campestris</i> pv. <i>oryzae</i> X17 - <i>Xanthionias campestris</i> pv. <i>oryzae</i> X61 - <i>Pseudomonas solanacearum</i> .	P82243
Thuricin CD beta	Class I	<i>Bacillus thuringiensis</i> DPC 6431	<i>Bacillus cereus</i> NCIMB 700577 - <i>Bacillus cereus</i> NCIMB 700578 - <i>Bacillus firmus</i> LMG 7125T - <i>Bacillus mycoides</i> DPC 6335 - <i>Bacillus thuringiensis</i> LMG 7138 - <i>Clostridium difficile</i> ATCC 600 - <i>Clostridium difficile</i> ATCC 43594 - <i>Clostridium difficile</i> R027 NCTC 13366 - <i>Clostridium difficile</i> 6220 - <i>Clostridium difficile</i> 6221 - <i>Clostridium difficile</i> 6219 - <i>Clostridium difficile</i> 6350 - <i>Clostridium difficile</i> 6351 - <i>Clostridium difficile</i> IBS 16 - <i>Clostridium difficile</i> Cr 15 - <i>Clostridium difficile</i> UC 38 - <i>Clostridium difficile</i> UC 38 - <i>Clostridium difficile</i> CR 79 - <i>Clostridium difficile</i> UC 47 - <i>Clostridium difficile</i> CR11 - <i>Clostridium difficile</i> UC 29 - <i>Clostridium difficile</i> CR 02 - <i>Clostridium difficile</i> UC 59 - <i>Clostridium difficile</i> UC 27 - <i>Clostridium difficile</i> H 76 - <i>Clostridium difficile</i> BS 47 - <i>Clostridium histolyticum</i> NCIMB 503 - <i>Clostridium indolis</i> NCIMB 9731 - <i>Clostridium lituseburense</i> NCIMB 10637 - <i>Clostridium tyrobutyricum</i> NCIMB 8243 - <i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 9479T - <i>Lactobacillus fermentum</i> LMG 6902 - <i>Lactobacillus johnsonii</i> DSM 10533T - <i>Lactococcus lactis</i> DPC 3157 - <i>Listeria innocua</i> DPC 3572 - <i>Listeria monocytogenes</i> DPC 1768 - <i>Listeria monocytogenes</i> DPC 3437 - <i>Listeria monocytogenes</i> .	C2TQ79
Cypemycin	Class I	<i>Streptomyces</i> sp	Unavailable data	E5KIB6
Enterocin 7B	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-positivos, incluidos los patógenos transmitidos por los alimentos como <i>Listeria</i> y <i>Clostridium</i> spp.	Q1A2D2

Bactofencin A	Class II	<i>Lactobacillus salivarius</i> DPC6502	<i>lactobacilli</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Listeria innocua</i>	V6DMD2
Thurandacins A & B	Class I	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar andalousiensis BGSC 4AW1	Unavailable data	C3GCL2
Enterocin NKR-5-3B (Ent53B)	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i> NKR-5-3	<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 - <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 - <i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708 - <i>Listeria innocua</i> ATCC 33099 - <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 - <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 - <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> ATCC 19435 - <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 - <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>Sakei</i> JCM 1157.	A0A0M3KKS4
Suicin 3908	Class I	<i>Streptococcus suis</i>	Unavailable data	A0A1D8H041
Lysostaphin	Class III	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	P10547
Planosporicin	Class I	<i>Planomonospora</i> sp. DSM14920	Unavailable data	R4ZCJ5
Pyocin L1	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	T2LG16
Pyocin S3	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	Q51549
Pyocin S6	Class III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unavailable data	A0A1V0B9H9

Anexo 2

NOMBRE BACTERIOCINA	SECUENCIA NUCLEOTIDOS	PRIMER #	NOMBRE PRIMER	SECUENCIA LIGADA AL VECTOR
Bacillus subtilis hypothetical protein (spaS). Subtilina	<p>ATGTCAAAGTTCGATGATTTCGATTTGGATGTTGTGAAAGTCTCTAAACAAGACTCAAAAATCACT CCGCAATGGAAAAGTGAATCACTTTGTACACCAGGATGTGTAACCTGGTGCATTGCAAACTTGCTT CCTTCAAACACTAACTGTAACTGCAAAATCTGTAAATAA</p>	JV-0052	1Fw-ssdsba-lk-spaS	<p>gcatcggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTTngTCAAAGTTCGATGATTTCGATTTGGAT</p>
		JV-0059	1Rv-spaS-6his	<p>ttaaTTAatgatgatgatgatgat:TTAGAGATTTGCAAGTACAAAGTACGTTTGGAA</p>
>Bacillus subtilis subtlancin 168 precursor peptide (SPBc2 prophage-derived bacteriocin subtlancin-168)	<p>ATGGAAAAGCTATTTAAGAACTTAACTAGAGGAACCTCGAAAACCAAAAAGGTAGTGGATTAGGAAAABCTCAGTGTG CTGGGTTGTGGCTACAATGTGCTAGTGGCGGTACAATTGGTTGTGGTGGCGGAGCTGTGCTGTGCAAAACTATCGTCAAT TCTGGAGATAA</p>	JV-0053	1Fw-ssdsba-lk-spbc2	<p>ggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTTATGGAAAAGCTATTTAAAGAAGTTAAACTAGAGGA</p>
		JV-0060	1Rv-spbc2-6his	<p>acTCTAGAtttaaTTAatgatgatgatgatgat:CTGCAGAAATTGACCATAGITTTGACA</p>
>Bacillus subtilis subtilosin A	<p>GTGTGCAACATGCTCGATCGGAGCCCTTGCTA GTGGACGGTCCTATCCCTGATTTTGAATTTGCCGGTGTACAGGTCTATTCCGCTCATGGGGATA A</p>	JV-0054	1Fw-ssdsba-lk-subtA	<p>catcggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTT</p>
		JV-0061	1Rv-subtA-6his	<p>tcgacTCTAGAtttaaTTAatgatgatgatgatgat:TCGCCATAGACCGAATAGACCTGT</p>

<p>>Pseudomonas aeruginosa immunity protein of pyocin S2</p>	<p>ATGAAGTCAGGSAATTTCCSAATATCCGAAAAAGAGTTTCTTGAGTTTGTAAAGACATACACA AACAAATAGAAAAAGTTCCCTACCGAGGAGTCTCATATTCAAGCCGTGCTTGAATTTAAAAACTA ACGGAAACACCCAAAGGGCTCAGAGCTTCTTTACTACCCCAACGAAAAATAGAGAGATAGCCGAG CTGGAGTTGTAAAGGAAGTTAAAGAAATGGGCTGCTCCAAAGGGGCT</p> <p>TAG</p>	JV-0047	1Fw-ssdsba-lk-hca	<p>gcgcateggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTTATGAAGTCCAAGATTCCGAATATACGG</p> <p>Espaciador aleatorio</p> <p>gen immS2</p>
		JV-0055	1Rv-hca-6his	<p>gcaggtcgacTCTAGAtttaaTTAatgatgatgatgatg</p> <p>vector</p> <p>End</p> <p>6 HIS</p> <p>gen immS2</p>
<p>>Pseudomonas aeruginosa killer protein of pyocin S2</p>	<p>ATGGCTGTCAATGATTACGAACTGGTTGATGGTTATTACACATGTGCAGGGTGGTGGGOSTGA DATAATOCAGTATATTCCTGCTCGATCAAGCTACGGTACTCCACATTGTCOCACAGGACCAA GTCCGATGTGCGTACTGGAAATGCAGGAGTACAGGAAGCTAAGAAGTACGCTTGATAAGTCCCAT TCAGAACTCAGAAAAACCTGAAAAATGAAACCCCTGAAGSAGGTTGATGAAGTCAAGAGTGAAG GGGTTGCCAGTAAAGCGGTCAAGTCCAAATGACATCCGGATGAAAAGAGTATCGTTGATGCA CTCATGGATGCCAAAGCAAAATGGTAAAGGGCCATTGAGGATCGCCCGCAATCTTTATAAGGGC TTGAGATTTTCTCAGAAATCAGAGTCCGATGATACAGAGTCAAGTTCGTCGGCCAGCGCAAAATCT ATGGAGGTTCTGGATGCCATATGAGTGAAGTGGCCAAAGCTACAGCGGCGATATCTATAA GGCCAAATCGCTATCTTGAACAAAGCTCTCAAGAGCTGGAGAAATAAGCCCGGTCATTGGAA CGAAGAGCCAGCGAGCCGCTGCTGAGGTGGAGGGGACTACANGGCCADGAAAGCAAAATGTC GAGAAAAAGTGCAGTCCGAGCTTGACCAAGCTGGGAATGCTTTGCCCTCAACTGACCAATCCAA CGCCAGAGCAAGTGGCTTGAACGGCTACTCAACTGGTTAGCGAGCGGATCGCAATAAAGAA ATTGCAAGCTGCMAACAATGCTTGAATGGCAAGGCCCAATGCACTGGAGAAACAAAAGGCA CCTACAAAGCCGATCTCCTAGTGGATGAAATCGCCAGCTCGCAAGCACGGCTGGACAAGCTGAA CGCCGAAAGCGCAAGCGCAAGSAAATCGCTCGTCAAGCGGCGATCAGGGCTGCCAATCTTAT GGATGCGAGCAATGGCAGGTTGTGGCAACCG</p>	JV-0050	1Fw-ssdsba-lk-killS2	<p>tagcgcateggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTTATGGCTGTCAATGATTACGAACTGG</p> <p>Espaciador aleatorio</p> <p>gen KillS2</p>
		JV-0057	1Rv-killS1-6his	<p>cTCTAGAtttaaTTAatgatgatgatgatgCTTCCCTCCCTTGTGGATTCTATATGA</p> <p>End</p> <p>6 HIS</p> <p>No identificado</p>
<p>>Pseudomonas aeruginosa killer protein of pyocin S1</p>	<p>CTTATCCACTTCAACTTACAACCTGTCAAGCGCAGCGAGGATTTATTACGGCCCTGGGG GGAGGTACCGGATTGGCCCATTCGCGACCTATAGAGCAGCGCTTGATGTTGCCACTGAAATGGCTGGCAAGGTT TGAAGTTATGCTGATGTGGCGTTTGACCCAGCCTATGTTCTCTCAGGTTAAGAAAAACGAGGGAGATCGAGC TTAGTTCGAGATGCCGAGAAAAACTTGAAGGGCTGGTACAAGCCGAGCTGATAAGGCTGATGCTCCCTTGGTCCG GCAAGAAATCTGACCATTTGGAAGTATCAACCGCAGCTGACCATGTTGMAAGCCCTCCAGCAAAAGAAATCAAAA ACTACTGCTGAATCAGAAAGAAATACAGCCTGGGTGCAAGAAATTTCTTACCGTACGGCGAAGAGATCGGTGAAC ANGCGGTGCAGAGAGGCAATATTAAAGGGCCTGAAGCTATATCGCTTCTCTGCAAGGAAATGGAAGGTCTCACGGC AGCTTATAAGCTAAACTCTTCAAGGAGGATCAGTAGTCTCAAGATCCGATGAAATAGCTTGAAGCCGCAAGCAAG TATTGAGCGCCGCAAGCAAGGCGCTGAACAAGCAGCGGTGAGGCCAAAGCAAAAGCCGAAAGGAGGAGCCCG CCAGCAAGCGCGATAGAGCTGCCAATACCTATGECATGCGGGCAATGGCAGCGTTGTGCCACCCGCGCAGGCGG GGCTGATCGAGTGCACAAGGGCCGCAATCCCTGCTCAAGGATCTCGATGCGATTGCCGCTGGCGCGGCTCT GGCTTCAAGCCCTCGGTGATGGCGTGGGCTTGGCAGTCTGACCTACTCTCCGCGACTGCCGAGCAATGGCAGGACC AAAGCGCCGATAGGTTGTTAGCGCTTGGCATGGATGCCG</p>	JV-0049	1Fw-ssdsba-lk-killS1	<p>agcgttttagcgcateggcgtctagaGGCCGGCTCGGCCTT</p> <p>Espaciador aleatorio</p> <p>gen KillS1</p>
		JV-0057	1Rv-killS1-6his	<p>cTCTAGAtttaaTTAatgatgatgatgatgCTTCCCTCCCTTGTGGATTCTATATGA</p> <p>End</p> <p>6 HIS</p> <p>No identificado</p>

BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H. F. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Agudelo Londoño, N.-T. M.-L. (2015). Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186-205. Obtenido de <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>
- Ahmad, V. K. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
- Arumugam, T. D. (2019). Inhibition of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* by Bacteriocin Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(1), 339-348. doi:<https://doi.org/10.1007/s10989-018-9676-y>
- Aylon, Y. y. (2004). New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Elsevier*, 566(3), 231-248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.10.001>
- Bédard, F. y. (2018). Recent progress in the chemical synthesis of class II and S-glycosylated bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14. doi:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01048>
- Ben Lagha, A. H. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 48(1), 1-12. doi:<https://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>

- Benforte, F. C. (2018). Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS ONE*, *13*(2), 1-18.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192559>
- Benforte, F. C. (2018). Novel role of the LPS core glycosyltransferase WapH for cold adaptation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS ONE*, *13*(2), 1–18.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192559>
- Bengtsson-Palme, J. K. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(1), 68–80.
doi:<https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Caulier, S. N. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–19. doi:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chikindas, M. L. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 23-28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Cooper y Hausman, .. (2011). *La CELULA*. Marban.
- Daza Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud*, *22*(3), 57-67. Obtenido de
<http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Dobson, A. C. (2012). Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(1), 1–6. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>

- Dorosky, R. J. (2017). *Pseudomonas chlororaphis* Produces Two Distinct R-Tailocins That Contribute to Bacterial Competition in Biofilms and on Roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(15), 1–16. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.00706-17>
- Dubois, J. Y. (2009). Immunity to the bacteriocin sublancin 168 is determined by the SunI (YolF) protein of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 651-661. doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.01189-08>
- Egan, K. F. (2016). Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-21. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00461>
- Ennahar, S. S. (2000). Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 85-106. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00031-5)
- Felix, P. (2018). Homologous Recombination : To Fork and Beyond. *Genes*, 9, 603. doi:<https://doi.org/10.3390/genes9120603>
- Gabrielsen, C. B. (2014). Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6854-6862. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.02284-14>
- Gasteiger, E. H. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571-608. doi:<https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Ghequire, M. G. (2014). Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 523–568. doi:<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12079>

- Ghequire, M. G. (2017). Novel immunity proteins associated with colicin M-like bacteriocins exhibit promiscuous protection in pseudomonas. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–9. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00093>
- Heng, N. T. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Microbiol*, 4, 160. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro1273-c1>
- Ibarra, J. G. (2014). Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Springer*, 19(1), 2017-220. doi:<https://doi.org/10.1007/s00792-014-0700-7>
- INS. (2017). *Resultados del Programa de Informe de Resultados de la Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2017*. Bogota: Instituto Nacional de Salud .
- INS. (2018). *Resistencia Bacteriana A Los Antimicrobianos En El Ambito Hospitalario*. Bogota: Instituto Nacional de Salud.
- INS. (2019). *Informe De Resultados De La Vigilancia Por Laboratorio De Resistencia Antimicrobiana En Infecciones Asociadas A La Atención En Salud (Iaas) 2018*. Bogota: Instituto Nacional de Salud.
- Kaškonienė, V. S.-S. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Springer*, 101(4), 1323-1335. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8088-9>
- Krogh, B. O. (2004). Recombination Proteins in Yeast. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 233-271. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091500>

- Kumariya, R. G. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Kunst, F. O. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256. doi:<https://doi.org/10.1038/36786>
- Kyte, J. y. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lu, Z. G. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 427-433. doi: doi:10.1292/jvms.16-0572
- Matsui, H. S. (1993). Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1257-1263. doi:<https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1257-1263.1993>
- McCaughey, L. C. (2016). Discovery, characterization and in vivo activity of pyocin SD2, a protein antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 473(15), 2345–2358. doi:doi:10.1042/bcj20160470
- Michel-Briand, Y. y. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84, 499–510. doi:[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01422-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01422-0)
- Minsalud, M. d. (2018). *Plan Nacional de Respuesta a la Resistencia a los Antimicrobianos - plan estratégico*. Bogota: Ministerio de Salud y Protección Social.

- Montiel, D. K.-P. (2015). Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), 8953-8958.
doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1507606112>
- Nonejuie, P. T. (2016). Application of bacterial cytological profiling to crude natural product extracts reveals the antibacterial arsenal of *Bacillus subtilis*. *The Journal of antibiotics*, 69(5), 353–361. doi:[doi:10.1038/ja.2015.116](https://doi.org/10.1038/ja.2015.116)
- O’Neill, J. (2016). *Book review: Tackling drug-resistant infections globally*. WHO. Archives of Pharmacy Practice. doi:<https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Oluyombo, O. P. (2019). Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. *mBio*, 10, e01828-18.
doi: [doi:10.1128/mbio.01828-18](https://doi.org/10.1128/mbio.01828-18)
- Orr Weaver, T. L. (1983). Yeast recombination: The association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 4417-4421. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4417>
- Peix, A. R.-B. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Perez, R. H. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13((Suppl 1):S3), (Suppl 1):S3.
doi:<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>

- Perez, R. H. (2018). Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-18.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02085>
- Plessis, A. y. (1993). Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination. *Gene*, 134(1), 41-50. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90172-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90172-Y)
- Regev, A. K. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581–3586.
- Restrepo, M. A. (2003). *Enfermedades Infecciosas*. Medellin, Colombia: Corporación para Investigaciones Biologicas.
- Saati-Santamaría Z, L.-M. R.-G.-M.-F. (2018). Discovery of phloeophagus beetles as a source of pseudomonas strains that produce potentially new bioactive substances and description of pseudomonas bohemica sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 9.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00913>
- Sambrook, J. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY*, 999.
- Sasaki, M. L. (2010). Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nature*, 11, 182-195. doi:<https://doi.org/10.1038/nrm2849>
- Schroeder, M. B. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, 39. doi:<https://doi.org/10.3390/genes8010039>

- Sharma, G. D. (2018). Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. *Medical Principles and Practice*, 27(2), 186-192.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Sung, P. M. (2000). Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Elsevier*, 451, 257-275. doi:[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00054-3)
- Symington, L. S. (2014). Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198, 795–835. doi:<https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>
- Tribelli, P. S.-L. (2015). Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS ONE*, 10(12), 1-19. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145353>
- Tribelli, P. y. (2018). Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria. *life*, 8(1), 8. doi:<https://doi.org/10.3390/life8010008>
- van Leeuwen, J. A. (2015). Rapid and Efficient Plasmid Construction by Homologous Recombination in Yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, 853-862. doi:<https://doi.org/10.1101/pdb.prot085100>
- Vasilchenko, A. S. (2018). Pore-forming bacteriocins: structural–functional relationships. *Springer*, 201(2), 147-154. doi:<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1610-3>

- WHO. (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 10(4), 284–294. doi:<https://doi.org/10.1590/s1020-49892001001000014>
- WHO. (2017). *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report*. Geneva: Organization World Health. doi:[https://doi.org/ISBN 978-92-4-151344-9](https://doi.org/ISBN%20978-92-4-151344-9)
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico microbiológico*. Panamericana.
- Zheng, S. y. (2018). Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. *Springer*, 102(10), 4243–4253. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8917-5>
- Zor, T. y. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*, 236, 302-308. doi:[doi:10.1006/abio.1996.0171](https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171)
- Zou, J. J. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 781-789. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233>