



Facultad de Farmacia  
Escuela de Química y Farmacia  
Laboratorio de LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA  
CENTRO DE MICROBIOINNOVACIÓN CMBi

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL COBRE EN LA INDUCCIÓN  
DEL GEN *nlpE* (COPPER RESISTANCE LIPOPROTEIN)  
EN *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**MARIAM CHARIFEH FERNÁNDEZ**

Director de Tesis: **Dr., Mg. Cs. Alejandro Dinamarca Tapia**

2017

Quiero agradecer a mi director de tesis, el profesor Alejandro Dinamarca por su conocimiento y ayuda entregados durante el desarrollo de la tesis.

A los miembros del Laboratorio de Biotecnología Microbiana: Natalia, Karoll, Claudia Ibacache, Claudia, Alejandro, Carlos, Becky y Scarleth. Por el apoyo y la ayuda prestada en cada momento que lo necesité.

A todos mis amigos de Siria y Chile especialmente a Ghazal y Caro que fueron un gran apoyo en los momentos más difíciles de mi tesis.

A Carlos Leiva por apoyarme y ayudarme con mucha paciencia, y sin darme la espalda en ningún momento.

A mis familiares paternos y maternos por estar ahí y preocuparse por mí siempre.

A mi mamá, mi papá y mis hermanos por confiar en mí y animarme en cada momento.

## Tabla de contenido

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Moléculas inmunomoduladoras de utilidad en la salud.....	4
2. Lipoproteínas bacterianas.....	6
3. Producción de innumomoduladores bacterianos.....	7
4. Cobetia sp. MM1IDA2H-1 una bacteria fuente de biomoléculas cuyo genoma se encuentra secuenciado .....	8
5. Moléculas producidas por Cobetia sp. MM1IDA2H-1.....	9
6. Cobetia sp. MM1IDA2H-1 y cobre.....	10
7. Propuesta.....	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Metodología general de trabajo.....	16
Materiales.....	17
Equipos.....	18
Reactivos.....	19
Metodología.....	21
1. Cultivo y conservación de la cepa.....	21
2. Exposición al cobre.....	23
3. Estudio de la capacidad de formación de biopelículas de Cobetia sp. MM1IDA2H-1..	26
4. Extracción de ARNm de la cepa expuesta al cobre.....	27
5. Estudio del gen de interés y su expresión.....	28
6. Medición de la tensión superficial.....	34
RESULTADOS.....	35
1. Efecto del cobre y la composición del medio de cultivo en el crecimiento de Cobetia sp. MM1IDA2H-1.....	36
1.1 Efecto del cobre en el crecimiento de Cobetia sp. MM1IDA2H-1 durante su crecimiento en medio marino preparado con agua de mar.....	36
1.2 Efecto del cobre en el crecimiento de Cobetia sp. MM1IDA2H-1 en medio marino con agua destilada y suplementado con NaCl al 4 % (p/vol).....	40
1.3 Efecto del cobre en el crecimiento de E.coli MG1655 en medio Luria Bertani (LB).....	42
2. Efecto del cobre en la capacidad de formación de biopelículas de Cobetia	

sp.MM1IDA2H-1.....	43
2.1. Formación de biopelículas en placa de 96 pocillos.....	43
2.2. Efecto del cobre en la formación de biopelículas de <i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H-1 en agua de mar.....	48
3. Estudio de la expresión del gen <i>nlpE</i> .....	51
3.1. Diseño de partidores.....	51
3.2. Efecto del cobre sobre la expresión genética del gen <i>nlpE</i> (qRT-PCR).....	52
4. Efecto del cobre en la producción de sustancias tenso activas por <i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H-1.....	54
DISCUSIÓN.....	57
1. Efecto del cobre en el crecimiento de <i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H-1.....	58
2. Estudio de la capacidad de formación de biopelículas de <i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H-1.....	59
3. Efecto del cobre sobre la expresión genética del gen <i>nlpE</i> .....	60
4. Efecto del cobre en la producción de sustancias tensoactivas por <i>Cobetia</i> sp. MM1IDA2H-1.....	62
5. Futuras aplicaciones farmacéuticas de <i>NlpE</i> en inmunología.....	63
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66

# Resumen

En los últimos años se ha visto el gran potencial que poseen los microorganismos para producir diversas moléculas inmunogénicas e inmunomoduladoras, con amplias aplicaciones en el campo de la salud humana y animal. La bacteria marina *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 es una fuente interesante de biomoléculas, algunas de las cuales fueron descubiertas y patentadas. Por su potencial e importancia biotecnológica, el genoma de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 ha sido secuenciado de forma completa indicando la existencia de genes de interés para la producción de moléculas inmunogénicas y que explican la capacidad de sobrevivir en el ambiente marino bajo múltiples condiciones físicas y químicas como es la presencia de compuestos químicos inorgánicos. En este proyecto se propone estudiar el efecto de la presencia de cobre sobre la expresión del gen Copper resistance lipoprotein NlpE. Esto permitirá establecer las bases biológicas de producción de una molécula de interés en su empleo en forma de aditivos de alimentos y como coadyuvantes en vacunas, dado que es una lipoproteína con potencial actividad inmunogénica.

# **Abstract**

The recent years has seen the great potential of microorganisms to produce various immunogenic and immunomodulatory molecules with a wide applications in the field of human and animal health. The marine bacterium *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 are an interesting source of biomolecules, some of which were discovered and patented. Due to its potential and biotechnological importance, the genome of *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 has been completely sequenced indicating the existence of genes of interest for the production of immunogenic molecules. This explains their ability to survive in the marine environment under many different physical and chemical conditions such as the presence of inorganic chemicals. This project is proposed to study the effect of the presence of copper on the expression of the Copper resistance lipoprotein NlpE gene. This will make it possible to establish the biological bases of production of a molecule of interest in its use as food additives and as an adjuvants in vaccines, given that is a lipoprotein with potential immunogenic activity.



**Lista de Abreviaturas**

**LPS:** lipopolisacárido.

**TNF:** factor de necrosis tumoral alfa.

**MLP:** monofosforil lípido A.

**FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos de los EUA.

**DBT:** dibenzotiofeno.

**g:** gramo.

**Kg:** kilogramo.

**cm:** centímetro.

**µl:** microlitro.

**ml:** mililitro.

**MM:** milimolar.

**V/V:** volumen/volumen.

**P/V:** peso/volumen.

**Seg:** segundo.

**Min:** minuto.

**H:** hora.

**DO:** densidad óptica.

**nm:** nanómetro.

**°C:** grados celsius.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**CMI:** concentración mínima inhibitoria.

**LB:** Luria Bertani.

**Tm:** temperatura de melting.

**PCR:** reacción en cadena de polimerasa.

**T:** temperatura.

**RPM:** revoluciones por minuto.

# Introducción

## **1. Moléculas inmunomoduladoras de utilidad en la salud.**

El sistema inmune es un mecanismo de defensa del organismo contra microorganismos patógenos y neoplasias (1). Es activado por la presencia de antígenos. Un antígeno es una molécula que tiene la capacidad de ser reconocida por los anticuerpos y unirse a ellos y a los receptores de células T (2). Dentro los antígenos se encuentran los inmunógenos, que son moléculas que provocan y activan a las células del sistema inmune, y los haptenos, que son moléculas que no activan por si solos al sistema inmune ya que deben unirse a una proteína para lograr tal efecto (3). Los antígenos pueden corresponder a proteínas de alto peso molecular; hidratos de carbono, antígenos de la superficie bacteriana; complejos glucofosfolípidos, que están en la pared celular de enterobacterias y lipoproteínas (4).

Los antígenos han sido utilizados para crear vacunas, para lo cual se utilizan bacterias vivas atenuadas, bacterias muertas (inactivas) o partes específicas de microorganismos (utilizando la tecnología de la proteína recombinante) capaces de inducir la respuesta inmune y por lo tanto la capacidad de este de combatir las infecciones posteriormente (5).

Actualmente ha aumentado el interés por encontrar y producir moléculas capaces de modificar la respuesta inmune (6), ya sea induciéndola o suprimiéndola. Estas sustancias son conocidas como inmunomoduladores. Hay variadas sustancias de origen bacteriano, como lipopolisacáridos (LPS), lipopéptidos, glicoproteínas capsulares y péptidos de muramilo, las que son inmunoestimulantes ya que activan al sistema inmune (7), con interés en salud humana (8) y animal (9). Estos moduladores pueden actuar con dos mecanismos: el mecanismo directo de inmunomodulación, que es la interacción directa

con los componentes de las células del sistema inmune (células T y B, monocitos y macrófagos, granulocitos y células NK) de manera que modifica directamente sus funciones, y el mecanismo indirecto de inmunomodulación, que es la interacción con un componente que no pertenece a las células del sistema inmunológico, generando la estimulación o inhibición de la liberación de sustancias que poseen actividad inmunomoduladora (7). Por otra parte, los inmunosupresores son sustancias que deprimen la respuesta inmune, y son usados en casos de trasplante y enfermedades autoinmunes. Muchas de estas sustancias son de origen bacteriano, como la Rapamicina (10), un antibiótico macrólido que es producido por *Streptomyces hygroscopicus*, y que fue en un principio usado como antifúngico (11). Algunos estudios clínicos de inmunosupresión crónica en niños con trasplante de órganos han demostrado que la Rapamicina podría ser una buena alternativa como bloqueador de calcineurina (12), siendo la calcineurina una enzima dependiente de calcio que estimula las vías de transducción de señales de los linfocitos T, activando la producción de interleucinas, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y el interferón gamma (13). También existen sustancias de origen fúngico como la Ciclosporina, un undecapéptido cíclico lípofílico que es producido por *Tolypocladium inflatum*, y cuyo efecto inmunosupresor se debe a que inhibe la señal de transducción para los linfocitos T a través de la inhibición de la calcineurina (14).

## **2. Lipoproteínas bacterianas.**

Las lipoproteínas tienen una gran importancia en la fisiología microbiana y explican su virulencia, siendo blanco tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Dada su importancia, varias lipoproteínas han sido estudiadas, como la 19-kDa, que es una glicolipoproteína expresada en *M. tuberculosis* y que puede ser secretada o encontrada en la membrana. Se sugirió que la 19-kDa es altamente inmunogénica y que tiene un rol en la patogenicidad de *M. tuberculosis*, por lo que fue objeto de estudio para diseñar nuevas vacunas vivas atenuadas. Sin embargo, los resultados mostraron que las respuestas fueron muy débiles y que por lo tanto no era aplicable (15). Otra molécula, el lípido A, que es una porción de los lipopolisacáridos de la membrana celular de las bacterias gram negativas, posee fuertes propiedades inmunoestimulantes. La sensibilidad del receptor TLR4 al lípido A puede explicar la estimulación de este a la respuesta inmune innata. Varias especies de lípido A fueron evaluadas con el objetivo de obtener una molécula apta para el tratamiento del cáncer. La molécula evaluada como vacuna para el cáncer fue el monofosforil lípido A (MLP). Se vio que el LPS y el MLP inducen el mismo perfil de citocinas, sin embargo la MLP es 100 veces menos tóxica. En este momento está siendo usada como coadyuvante en vacunas anticancerígenas (16).

### **3. Producción de inmunomoduladores bacterianos.**

Hace aproximadamente 30 años atrás surgió la tecnología para la producción de proteínas recombinantes en bacterias para uso terapéutico, logrando ya al año 2010 que la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos de los EUA) aprobara más de 200 productos biofarmacéuticos (17).

Para producir proteínas recombinantes se necesita primero identificar el gen de la proteína de interés, introducirlo en un plásmido e insertarlo en un microorganismo seleccionado para obtener el mejor rendimiento de la proteína. Luego se selecciona el medio de cultivo óptimo, para lo cual es importante alcanzar altas densidades celulares para una máxima producción proteica, finalizando el proceso con la purificación de las proteínas (17).

En la etapa de estudio e investigación las proteínas recombinantes son producidas en biorreactores a escala de laboratorio, logrando producir solo algunos microgramos que no pueden abastecer la necesidad farmacéutica, es por ello que para poder producir proteínas recombinante a gran escala, se necesita el uso de fermentación, que se define como la ciencia del cultivo de células y de microorganismos para la producción en grandes cantidades de compuestos químicos y farmacéuticos en condiciones específicas y bien determinadas. A diferencia de la producción en laboratorio, que usa fermentadores con capacidad de 1 a 2 L, los fermentadores a gran escala tienen una capacidad de contención de 30 L de medio de cultivo. Además, una de las condiciones requeridas por las células cultivadas es que deben tener la capacidad de crecer en suspensiones. Dentro de los microorganismos más utilizados se encuentran *Escherichia coli* en las procariotas y las levaduras en las eucariotas (18).

**4. *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 una bacteria fuente de biomoléculas cuyo genoma se encuentra secuenciado.**

La bacteria marina *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 es una cepa no patógena, gram negativa y oxidasa positiva, además es halófila moderada con requisito de sodio para crecer y puede utilizar el DBT (dibenzotiofeno) como única fuente de carbono. También es sensible a varios antibióticos como Amoxicilina, Ampicilina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Kanamicina, Metronidazol, Ácido Nalidíxico, Polimixina B, Rifampicina, Estreptomina y Sulfonamida. Tiene una alta similitud de secuencia genética con la cepa *C. marina* DSM 4741 (19). El genoma de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 ha sido recientemente secuenciado y está en proceso de curado y análisis transcripcional. (20)



## **5. Moléculas producidas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

*Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 puede producir moléculas tensoactivas (biosurfactantes) en presencia de microorganismos competidores o cuando se cultiva en un medio con DBT (19).

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas (contiene una zona polar y un zona apolar) que por su naturaleza disminuyen la tensión superficial y forman emulsiones a través de la capacidad de formar micelas. Los biosurfactantes son producidos por bacterias, hongos y levaduras durante su crecimiento (21).

El biosurfactante producido por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 está compuesto por una mezcla de ácidos grasos que son capaces de formar micelas cuando se encuentran fuera de la célula, inhibiendo la comunicación célula a célula (quorum sensing) y reduciendo la tensión superficial (19), por lo que fue propuesto como un reemplazo de los antibióticos al tener la ventaja de no desarrollar resistencia en bacterias. Se ha demostrado que pueden inhibir la formación de biopelículas y la síntesis de factores de virulencia de microorganismos patógenos (19,22).

## 6. *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 y cobre.

En el genoma de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 existen genes que codifican para la resistencia al cobre. Esto podría explicarse debido a que este microorganismo esta constantemente expuesto al cobre en su habitad natural (19).

El cobre es un metal que juega un doble rol en las bacterias. Por un lado es esencial como micronutriente, ya que es cofactor de varias enzimas bacterianas. Por otro lado, en altas concentraciones posee actividad citotóxica, ya que forma radicales libres que destruyen las estructuras celulares, lo que conlleva a la muerte de la bacteria. Sin embargo, se han descrito varios mecanismos de resistencia que poseen diversas bacterias para ayudarles a compensar el exceso de cobre. Entre estos están las bombas de expulsión y las enzimas oxidativas (23).

Entre los genes que codifican para la resistencia al cobre en *Cobetia* están:

**Multicopper oxidase:** es una familia de enzimas de varios dominios que tiene la capacidad de oxidar múltiples sustratos y se ha visto que tiene un rol en la homeostasis del cobre (24).

**Copper resistance protein B:** codifica la proteína CopB, cuya producción es estimulada por la presencia de cobre (25).

**Copper resistance protein A:** Su proteína se conoce como CopA que es una bomba de transporte de Cu (I) (26).

**Copper-exporting P-type ATPase A:** Codifica una bomba de ATPasa que expulsa el cobre fuera de la célula, manteniendo la homeostasis del cobre (27).

**Copper resistance lipoprotein NlpE (*cutF*):** Este gen codifica para la lipoproteína de membrana externa NlpE (figura 1) que tiene un rol en la activación del sistema de doble

componente Cpx, importante en la mantención de la homeostasis de la membrana celular frente a cualquier estrés. En *E. coli*, NlpE puede sobreproducirse en presencia de cobre lo que estimularía al sistema Cpx (28, 29). Desde este punto de vista es interesante saber si en *Cobetia* este gen puede ser regulado también por la presencia de cobre.

El NlpE, al ser una lipoproteína de membrana externa, podría tener un posible efecto inmunogénico de igual forma que ocurre con los mencionados lípido A y 19-kDa. Es por ello que sería de interés lograr producir esta molécula, para su posterior uso en futuras aplicaciones farmacéuticas.

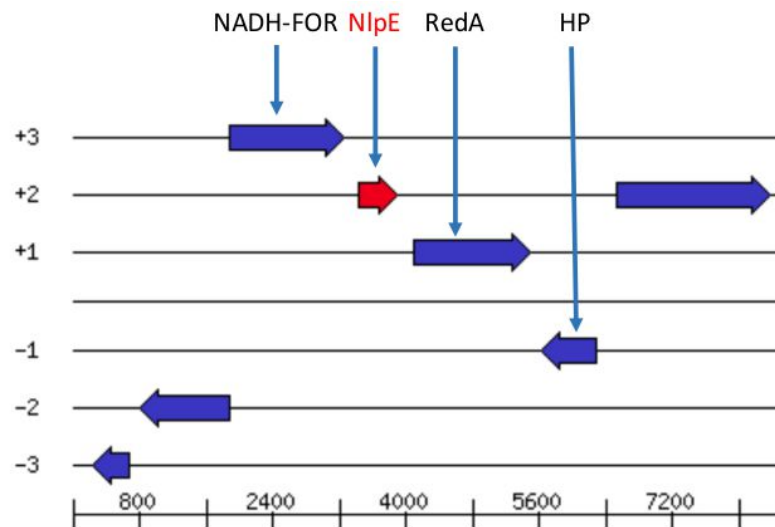


Figura.1: Contexto genético de *nlpE* en *Cobetia* sp MM1IDAD2H-1

## 7. Propuesta:

Por los antecedentes que fueron mencionados anteriormente se plantea la siguiente pregunta:

¿Podría *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 producir lipoproteínas de interés inmunogénico mediante el uso de moléculas inorgánicas como el cobre?

# **Hipótesis y objetivos**

## **Hipótesis**

En *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1, el gen copper resistance lipoprotein NlpE (*cutF*) que codifica para una lipoproteína es inducido por la presencia de cobre.

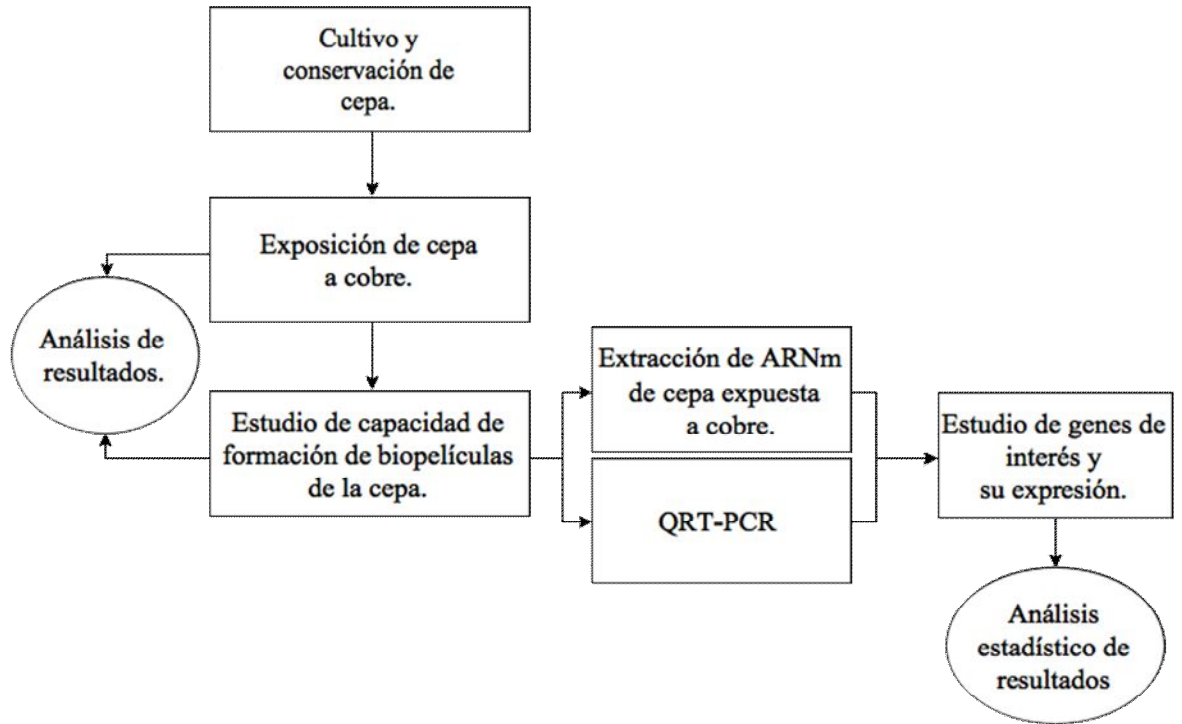
**Objetivo general**

Estudiar la producción de lipoproteínas de interés inmunogénico por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 como respuesta a un inductor inorgánico.

**Objetivos específicos**

- Estudiar el efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 y en la capacidad de formación de biopelículas.
- Estudiar el efecto del cobre y de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.
- Estudiar la expresión del gen *nlpE* relacionado con la resistencia al cobre en *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.
- Estudiar el efecto tensoactivo por las moléculas producidas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en exposición al cobre.

# **Materiales y Métodos**

**Metodología general de trabajo.**



**Materiales.**

- Micropipetas BioPette®, modelos p2, p10, p20, p200, p1000 y p5000.
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Matraces Erlenmeyer DURAN SCHOTT® de 25, 50, 250 mL de Capacidad.
- Tubos de ensayo DURAN SCHOTT®.
- Tubos EPPENDORF ® 1,5 mL y 2,0 mL libres de RNAsa.
- Placas de Petri desechables de 5 y 10 cm ZELLE®.
- Asa de siembra en Loop y Drigalski.
- Vasos Precipitados DURAN SCHOTT® de 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Botellas con tapa DURAN SCHOTT® de 100, 200, 500 y 1000 mL.
- Tubos Falcon cónicos para centrifuga de 15 y 50 mL.
- Guantes de nitrilo HEATH TOUCH®.
- Placa de 96 pocillos BECTON DICKINSON ®.
- Puntas para micropipetas, desechables.
- Filtros de 0,22 µm ORANGE®.
- Tubos para PCR SORENSON™ de 0,2 mL libres de RNAsa.
- Agua de mar.

**Equipos.**

- Autoclave HUXLEY® Speedy, modelo HL- 340.
- Refrigerador LG 3705, modelo GN-V29RLC.
- Incubador refrigerado MRC®, modelo LE-509. 10.
- Congelador -80°C NUAIRE®, modelo UN- 9483E.
- Congelador -20°C FRIGIDAIRE®, modelo FFFU17M1QWA.
- Incubador refrigerado VELP® Scientifica, FOC 2251.
- Agitador–incubador ZHICHENG®, modelo ZHWY-2000 .
- Gabinete de bioseguridad, luz ultravioleta y filtro HEPA marca STREAMLINE®, Modelo ESCO CLASS II BSC.
- Lector multimodo de microplaca TECAN®, modelo M200 pro.
- Baño termostático seco LABNET®, modelo Accu Block.
- Espectrofotómetro THERMO®, modelo Génesis 10uv.
- Balanza Semianalítica KERN®, modelo PLE 420-3N.
- Desionizador de agua AQUA SOLUTIONS®, modelo RODI-C-12 series.
- Vórtex CIENTEC® Maxi Mix II, tipo 37600 mixer.
- Mechero Bunsen, FISHER®.
- Centrífuga con refrigeración EPPENDORF®, modelo 5810R.
- Vórtex CIENTEC ® Maxi Mix II, tipo 37600 mixer.
- Cámara de electroforesis OWL® Separation System, modelo horizontal.
- Espectrofotómetro NANODROP® DN-1000.
- Termociclador STRATAGENE® modelo MX3000P.

- Termociclador con gradiente BIORAD®, modelo My® Cycler.

### **Reactivos.**

- Cristal violeta MERCK®.
- Etanol 96% VIMARONI.
- Bacto Tryptona BECTON DICKINSON®.
- Extracto de levadura BECTON DICKINSON®.
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado VIMARONI ®.
- NaCl MERCK®.
- Bacto-agar BECTON DICKINSON®.
- Etanol 70% (v/v).
- Glicerol MERCK®.
- Agua libre de RNAsa.
- Cloroformo MERK®.
- Alcohol isopropílico WINKLER®.
- Kit para extracción de RNAm, RNA-SOLV® REAGENTE.
- Partidores para PCR.
- Bromuro de Etidio WINKLER®.
- Agarosa WINKLER®.
- Marcador de peso molecular de 1 Kb INVITROGEN®.
- PCR Master Mix PROMEGA.
- Buffer carga 6 x para PCR INVITROGEN®.

- Buffer Tris-Borato EDTA 10 x PROMEGA®.
- Kit para extracción de ARN, RNA-SOLV® REAGENTE.
- RNeasy mini kit®.
- Kit para QRT-PCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix.

## Metodología.

### 1. Cultivo y conservación de la cepa:

- **Cepas**

En este trabajo se utilizó la cepa de estudio *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 y la cepa control *E. coli* MG1655 en el proceso de exposición a cobre.

- **Cultivo de las cepas y condiciones de cultivo**

*Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 se cultivó utilizando medio marino 4% NaCl (p/v) y medio marino preparado con agua de mar; Los componentes de estos medios se muestran en la tabla N.º 1. Incubándose a 26°C, 200rpm por 24 horas.

**Tabla N.º 1. Composición de los medios marinos utilizados en cultivos de *Cobetia* sp.**

**MM1IDA2H-1:**

Medio	Medio marino 4% NaCl líquido	Medio marino 4% NaCl solido	Medio marino agua de mar líquido
Extracto de levadura	1 g	1 g	1 g
Bacto triptona	5 g	5 g	5 g
Cloruro de sodio	4%	4%	-
Agua Up	1000 mL	1000 mL	-
Agua de mar	-	-	1000 mL
Agar	-	1,5%	-

Para cultivar *E. coli* MG1655 se utilizó el medio Luria Bertani (LB)(30), cuya composición se presenta en la tabla N.º 2. Incubándose a 37°C, 200rpm por 24 horas.

**Tabla N.º 2. Composición del medio Luria Bertani utilizado en el cultivos de *E. coli* MG1655:**

<b>Medio</b>	<b>LB líquido</b>	<b>LB solido</b>
<b>Extracto de levadura</b>	10 g	10 g
<b>Bacto triptona</b>	5 g	5 g
<b>Cloruro de sodio</b>	10 g	10 g
<b>Agua Up</b>	1000 mL	1000 mL
<b>Agar</b>	-	1,5%

La esterilización de los medios se realizó por autoclave a 121°C, 1 Kg/cm<sup>3</sup> por 20 minutos.

- **Conservación de cepas**

*Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 y *E. coli* MG1655 se mantuvieron en criotubos utilizando una solución de 20% glicerol y 80% medio de cultivo, de esa forma se conservaron a -80°C.

## 2. Exposición al cobre:

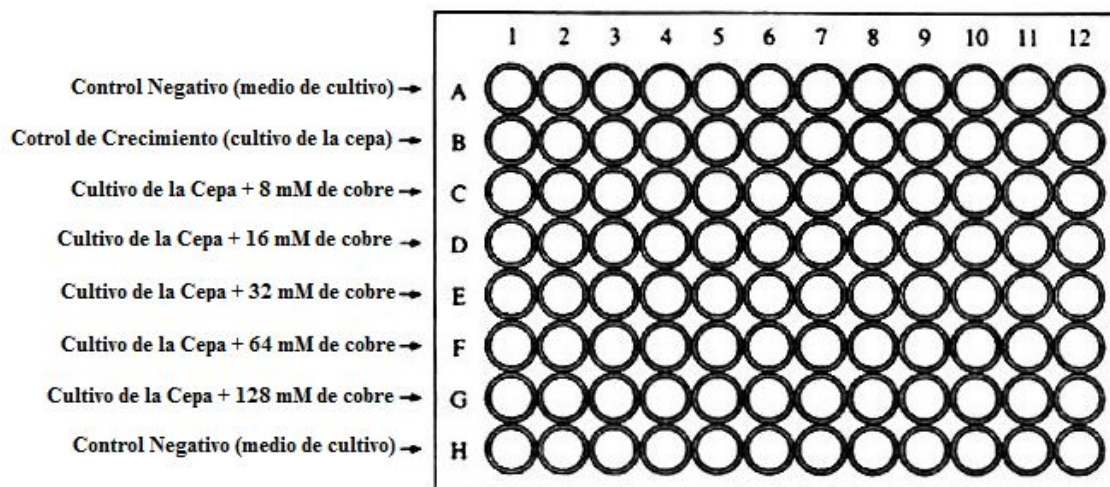
- **Solución de cobre**

Para preparar la solución de cobre 356 mM, se disolvió sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en el medio de cultivo correspondiente a cada cepa; esterilizando estas soluciones a través del paso por un filtro de membrana.

- **Curvas de crecimiento**

Se preparó un preinóculo de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1, que se diluyó de modo que la medición de la absorbancia fuera menor a 0,2; a partir del cual se inoculó el cultivo en la placa de 96 pocillos.

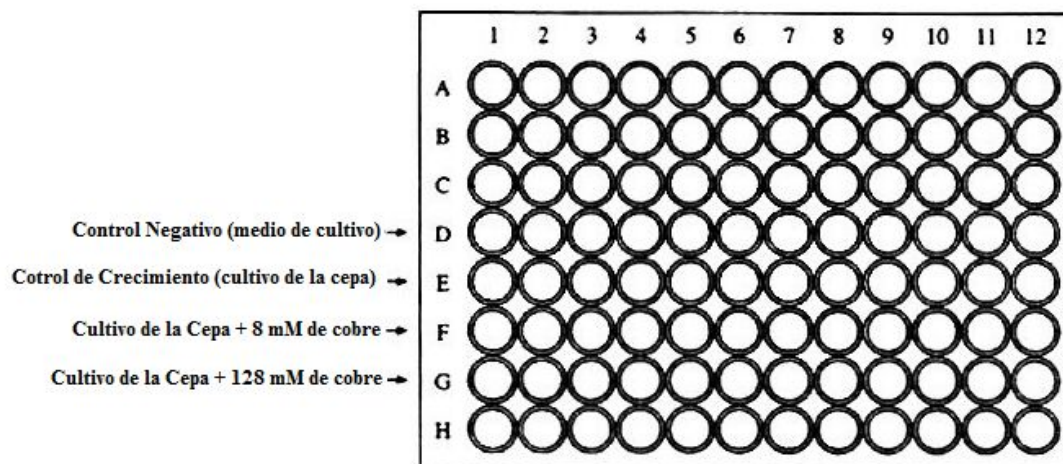
En cada placa se utilizaron dos controles negativos, que corresponden al medio de cultivo y a un control de crecimiento. El resto de los pocillos fueron expuestos a diferentes concentraciones de cobre 8, 16, 32, 64 y 128 mM (figura 2) (23-31); que se agregaron en la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 26 °C por 72 horas en el lector multimodo de microplaca TECAN®, midiendo la cantidad de absorbancia cada hora con una longitud de onda de 600nm. Las curvas de crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 se hicieron en ambos medios: medio marino 4% NaCl y medio marino con agua de mar.



**Figura 2.** Distribución de las distintas condiciones experimentales para el cultivo bacteriano de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1

Para *E. coli* MG1655 se preparó un overnight de 5 mL LB, inoculándola al día siguiente en un matraz con 100 mL de medio de cultivo LB, midiendo la absorbancia a 600nm cada hora. Cuando la absorbancia llegó a 0,2 el inóculo se separó en tres matraces de 25 mL siendo uno de ellos el control de crecimiento que sólo contiene la cepa, y los dos restantes fueron tratados con cobre a una concentración de 8 mM y 128 mM, respectivamente. Finalmente se introdujeron en una placa de 96 pocillos (figura 3), incubándola a 37 °C por 72 horas en el lector multimodo de microplaca TECAN® y midiendo la absorbancia cada hora con una longitud de onda de 600nm.





**Figura 3.** Distribución de las distintas condiciones experimentales para el cultivo de *E. coli* MG1655.

### 3. Estudio de la capacidad de formación de biopelículas de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1:

- **Formación de biopelículas en placa de 96 pocillos.**

La cuantificación de la biopelícula formada en las placas de 96 pocillos por el cultivo de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 se realizó una vez transcurridas las 72 horas de incubación.

Primero se lavó la placa con agua varias veces, se tiñó con cristal violeta al 1% y se dejó y se esperó 20 minutos. Luego se eliminó el cristal violeta y nuevamente se lavó la placa con agua, agregando etanol al 95% y se esperaron 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (32).

- **Formación de biopelículas a partir de cultivo de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en agua de mar.**

Para realizar este experimento se preparó un overnight de 24 horas y luego un preinóculo con 500 mL de medio de cultivo que se incubó 48 horas. Una vez crecido, se centrifugó y resuspendió en 500 mL de agua de mar previamente autoclaveada; separando posteriormente en 4 matraces de 50 mL.

El primer matraz corresponde al control que contiene solo medio de cultivo, mientras que los otros corresponden al cultivo expuesto a cobre en 8, 64 y 128 mM respectivamente. La formación de biopelículas se midió semanalmente por tres semanas.

De cada matraz se sacaron tres muestras de 200 uL, que se distribuyeron en una placa de 96 pocillos. Luego de 20 segundos, los pocillos se lavaron con agua destilada para continuar con la tinción con cristal violeta, detallada en el punto anterior.

#### **4. Extracción de ARNm de la cepa expuesta al cobre:**

- **Preparación del cultivo.**

En este procedimiento solo se usó *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1, que fue cultivada en medio marino NaCl 4%. Se utilizó un control negativo, control de crecimiento y dos muestras que fueron expuestas a 8 y 64 mM de cobre durante la fase exponencial, por 30 minutos. Luego se centrifugaron las muestras y se conservaron a -80 °C.

- **Extracción, cuantificación y purificación del ARNm.**

Para la extracción de ARN se utilizó el protocolo que especifica el fabricante del kit RNA-SOLV® REAGENTE (33). La cuantificación del ARNm se realizó con el Espectrofotómetro NANODROP®.

Se realizó un tratamiento con DNAsa (RQ1 Rnase-Free DNase), para degradar el ADN que pudo encontrarse en la muestra y se lavó según las especificaciones del fabricante del RNeasy mini kit®. Luego se cuantificó con el Espectrofotómetro NANODROP® y se conservó a -80 °C.

## 5. Estudio del gen de interés y su expresión:

El genoma de la cepa *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 ha sido secuenciado y esto permite el análisis del genoma anotado de este microorganismo.

Para secuenciar el genoma se analizó la calidad de la secuencia lectora utilizando la herramienta Prinseq (34). El recorte derecho se realizó para la secuencia con calidad <Q30, mientras que en el extremo izquierdo se recortó la primera base. Las secuencias filtradas se ensamblaron con SPAdes (35) utilizando las bibliotecas de pair-end y mate-pair. El ensamblaje final se evaluó utilizando QUAST (36).

Para la anotación del genoma se utiliza la anotación del genoma y análisis de la vía. Los ensamblajes obtenidos se anotaron con la herramienta BG7 (37), utilizando como referencia las secuencias de genes y proteínas de la familia Halomonadaceae. Las proteínas de referencia para la anotación BG7 incluyeron 62.441 proteínas de Uniprot. La anotación funcional se realizó utilizando BlastKOALA, un servidor de anotación automática para las secuencias del genoma, que fue realizado por KEGG Orthology assignments para caracterizar las funciones de los genes y reconstruir la vías de KEGG (38). Ambos procesos automatizados fueron comparados manualmente.

- **Diseño de partidores.**

Se diseñaron los partidores para la zona promotora y codificante del gen de interés Copper Resistance lipoprotein NlpE (*cutF*).

**Zona promotora del gen en *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1:**

C **GAACGTCTGCGTCTGGATG**CGCCGTTCAACGAGCAGGAT**CCTGATACCTT**C  
 TACGGTGGCGGTGCCGAGGGCTACACCGATTATCCCTTCCTCGACAACGGG  
 CATGATCGCCGTGGCTGAGGCCGACATGATTTAGCGAATGGCGTTCGATAAA  
 CGCCATCGGGGGTGGCCTCACGGGGCTGATACCCGC**TATTCT**TGAGCGTGG  
 AAGCTCGTGAGCGGTCCGTCTGTGCGAGGCAGTCGGGCCGCTCGCCGTCGAT  
 AGCGCTGACGCTGCTATCGAATCATCGCCTTAAGGAGGATTCA**ATGCAGATC**  
**AGGACTCTGATGGTGGGAG**CCGC

Sig70 (-10) **ACCTT** SigE (-35) **CCTGATACCTT** Sig70 (-10) **TATTCT**

Forward Primer: **GAACGTCTGCGTCTGGATG**

Revers primer: **CTCCCACCATCAGAGTCCTG**

**Zona codificante del gen en *Cobetia* sp. MM1IDA2H.1:**

**ATGCAGATCAGGACTCTGATGGTGGGAGCCGCGCTGATGGTTCGGTCTCGCCGG**  
 GTGCGCATCAACGGCCCAGACGACAGATGGTGCCGCTGCCAATGACGCCACCG  
 AGACAGCCAGCGAGCAGGTTGCCGTCTACAAGGGCACCTGCCGTGTCGTCGT  
 TGCACGGGCATTGACCTCGATGTGCGTCTCAAGGGAGCGGAAGATGCTGCCCC  
 GGAAGCGCGTACCTTCAGTCTCGATGCCACCTATCGCGATCATCCGCAGCAGCC  
 CGCGCCGGAGCACTACGAGGGTTCAGTGGGATGTACTGTCAGGTACGGTGACCG  
 ACCCGAATGCCACCGTCTATGAGCTGACGCCGAATGGCGAGGGCCAGACCTAC  
 TACTTCCTGCGTCTGGACCCCCAGACACTGGAAGTGGTCGACCCGCAGAAGCG  
 CCGCTTCCAGAACGGCGAGACACTGCGTCTCAAGCGCGAG

Se realizó con la ayuda de la plataforma NCIBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) teniendo en cuenta que:

- Cada partidador debe contar con una longitud de 18-24 bases.

- Un contenido de 40-60% de G-C.
- Los dos partidores deben tener una temperatura de melting ( $T_m$ ) cercanas.
- Evitar runs: TATATA y AAAA (39) .

Los partidores fueron probados con una reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, para asegurarse que sean específicos y que no formen dímeros.

#### ● **Extracción de ADN y PCR convencional.**

El ADN se extrajo utilizando el método de hervido de células, que consiste en suspender en 1 mL de agua ultrapura una colonia aislada de la cepa; en este caso *Cobetia* sp.

MM1IDA2H-1 (40), que se homogeneizó y se transfirió a un baño termostático en seco a 100 °C por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 20 segundos y se conservó el sobrenadante a -20 °C.

Mediante PCR convencional, se comprobó la eficacia de los partidores diseñados. Se mezcló en tubos para PCR libres de DNAsa y de RNAsa, 12,5 ul del Master Mix (que contiene Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y oligonucleótidos) con lo siguiente:

- 2 uL de ADN bacteriano.
- 2 uL de partidores.
- 7,5 uL de agua ultrapura para llevar a un volumen final de 25 ul.

Las  $T_m$  utilizadas correspondieron a cada uno de los pares de partidores diseñados.

Los productos de PCR luego de ser sometidos a electroforesis de ADN, fueron visualizados en el sistema captador de imagen DOC (Bio RAD). El gel utilizado fue de agarosa 1,5 %

preparado en buffer Tris-Acido acético-EDTA (TAE) y bromuro de etidio.

La electroforesis de ADN es una técnica que nos permite separar los productos de la PCR según su carga eléctrica y su tamaño, comparándolos con un marcador de peso. La electroforesis en gel de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN y a diferencia del gel de poliacrilamida que también puede ser utilizado, el gel de agarosa tiene un amplio rango de separación y es más fácil de preparar (41).

- **Retrotranscripción y PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).**

Para el proceso de qRT-PCR es necesario emplear un fluoróforo, y realizar una retro transcripción que genera una molécula de ADN a partir del ARNm, y así el proceso termina con la amplificación del ADN y su identificación al mismo tiempo (42). El uso de una transcripción reversa, seguido por una qRT-PCR nos permite estudiar la expresión de los genes; ya que tiene la capacidad de detectar bajas cantidades de ARNm y amplificarlas, pudiendo por lo tanto, cuantificar el nivel de expresión del ARNm; Existe además, una correlación entre la amplificación con intensidad de fluorescencia (43).

Los datos se analizaron mediante la cuantificación relativa que generalmente se utiliza en ensayos de expresión génica, mientras que la cuantificación absoluta se utiliza para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos. Este ensayo permite determinar el número exacto de ADN y ARN en una muestra (44).

Para los ensayos se utilizó el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green qRT-PCR Master Mix, y se realizaron en el termociclador Stratagen Mx3000P; realizando cada condición por triplicado.

Para cada tubo de reacción se calcularon los siguientes volúmenes de los reactivos del kit:

- 0,2 uL DTT (ditiotreitól, un agente reductor).
- 1 uL RT/RNAsa block (enzima transcriptasa reversa con neutralizador de RNAsa).
- 10 uL Master Mix 2X (Taq ADN polimerasa, Buffer para RT-PCR, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, SYBR Green ).
- 5,5 uL agua ultrapura libre de RNAsa.
- 1uL partidor F (diseñado previamente para los genes de interés).
- 1uL partidor R (diseñado previamente para los genes de interés).
- 1 uL RNA (las muestras fueron diluidas al décimo partiendo con una concentración de 112 ng/uL en el control, 206,9 ng/uL en la primera condición experimental y 195,8 ng/uL en la segunda condición experimental).

El perfil térmico de la reacción se describe en la siguiente tabla:

Segmento Ciclos	Pre Melt / Rt			Amplificación			Disociación		
	1	1	1	40			1		
Temperatura	25°C	50°C	95°C	95°C	55°C	72°C	95°C	55°C	95°C
Duración	1 s	10 min	3 min	5 s	20 s	15 s	1 min	30 s	30 s

La cuantificación relativa fue calculada con el método Livak ( $\Delta\Delta C T$  Method) (45),

que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo entre una muestra experimental y un calibrador, y se normaliza con un gen de referencia para corregir la variación de RNA en las muestras (44).

En este experimento el gen de interés es nlpE, donde el calibrador fue la muestra control y las muestras problema fueron ARN extraído del cultivo expuesto a 8 mM de cobre y 64 mM de cobre, mientras que el gen de referencia es el 16S.



**Para calcular la expresión relativa se siguieron los siguientes pasos:**

**Muestra problema:**

$$\Delta C T = C T \text{ gen de estudio} - C T \text{ gen normalizador}$$

**Muestra control (calibrador):**

$$\Delta C T = C T \text{ gen de estudio} - C T \text{ gen normalizador}$$

$$\Delta\Delta C T = \Delta C T \text{ Muestra problema} - \Delta C T \text{ Muestra control (calibrador)}$$

**Fold change (número de veces expresado) :**  $2^{-\Delta\Delta C t}$

El control (calibrador) se asume que es 1 y para graficar, se calcula el logaritmo en base 2 del fold change, y así el control (calibrador) queda en 0.

## **6. Medición de la tensión superficial:**

Se preparó un preinóculo de 24 horas con el cultivo de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1, desde el cual se cultivaron 6 matraces con medio marino 4% NaCl: para el control, y cobre a concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 mM; que se agregaron al pasar 3-4 horas. Luego de 24 horas, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm 5°C por 5 min, midiendo la tensión superficial mediante el tensiómetro de DU NOUNY.

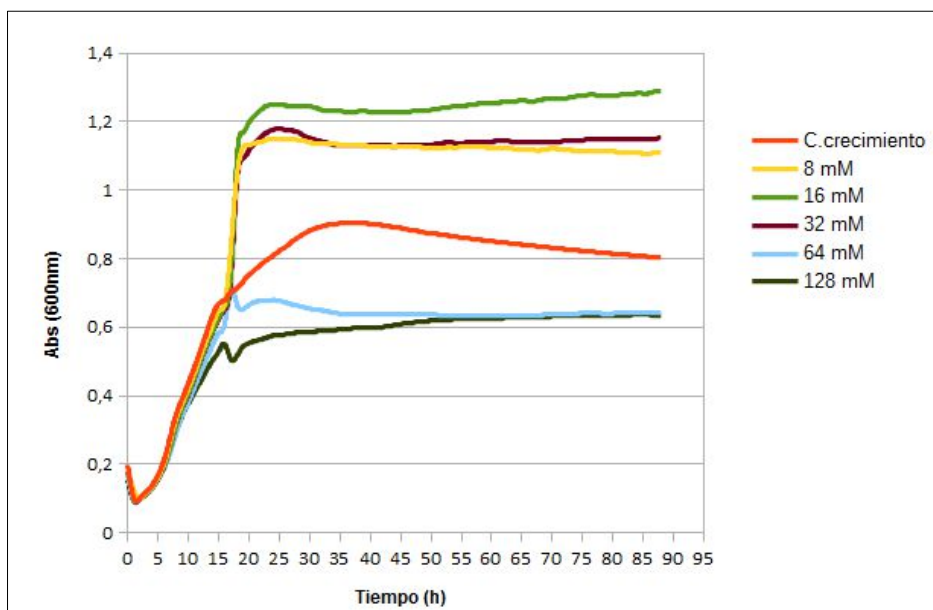
# Resultados

## **1. Efecto del cobre y la composición del medio de cultivo en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

### **1.1 Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 durante su crecimiento en medio marino preparado con agua de mar.**

#### **A. Fase exponencial (exponencial tardía):**

Es posible observar en el Gráfico 1 que las curvas de crecimiento obtenidas por la exposición al cobre (8 mM, 16 mM, 32 mM) sobrepasan a la del control de crecimiento (C.crecimiento). Para un análisis cuantitativo se consideró que la curva de crecimiento de la condición control es el 100% del crecimiento de la bacteria. De esta forma, las concentraciones de 64 y 128 mM reducirían la biomasa en un 29,2 % y 34,3 % respectivamente, mientras que las concentraciones 8, 16, 32 mM de cobre incrementan la biomasa hasta un 36,3 % (Tabla N.º 3).



**Gráfico 1.** Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en medio de cultivo preparado en base a agua de mar. Concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 mM de la solución sulfato de cobre pentahidratado. La exposición al cobre se realizó en la fase exponencial (exponencial tardía) del crecimiento.

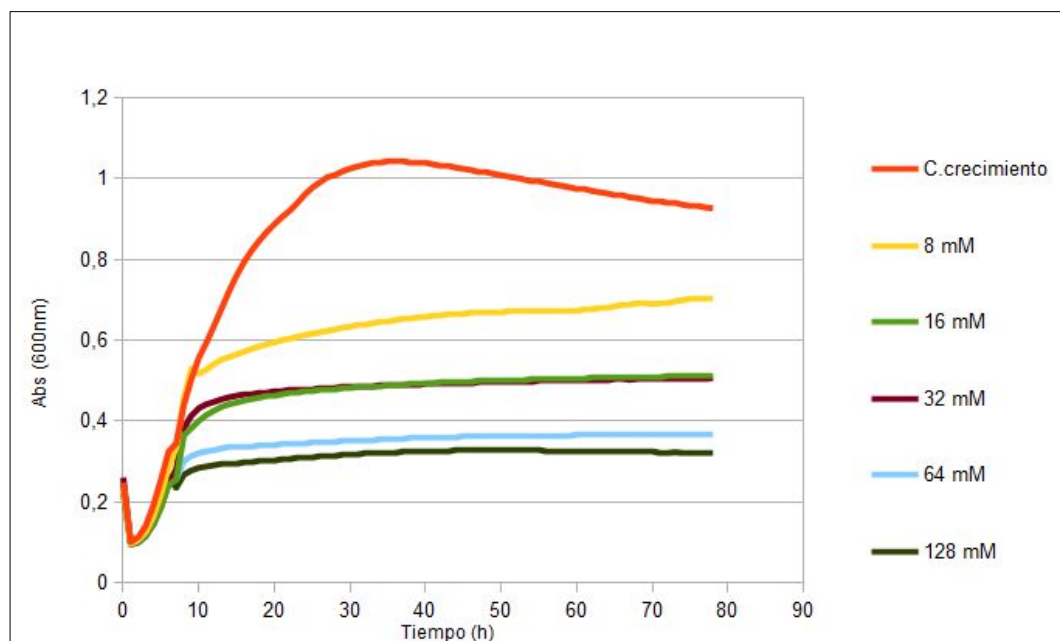
**Tabla N.º 3. Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

Concentración de cobre	8 mM	16 mM	32 mM	64 mM	128 mM
Porcentaje	125,4%	136,3%	125,3%	70,8%	65,7%
Aumento/disminución de la Biomasa	+ 25,4%	+ 36,3%	+ 25,3%	- 29,2%	- 34,3%

\*Se asume que el control de crecimiento es un 100% del crecimiento.

### B. Fase exponencial:

Es posible observar en el Gráfico 2 que las curvas de crecimiento obtenidas por la exposición al cobre (8 mM, 16 mM, 32 mM, 64mM, 128mM) no alcanzan a sobrepasar a la del control de crecimiento. Para un análisis cuantitativo se consideró que la curva de crecimiento de la condición control es el 100% del crecimiento de la bacteria. De esta forma, todas las concentraciones reducen la biomasa en un rango de un 36% a un 68% (Tabla N.º 4).



**Gráfico 2.** Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en medio de cultivo preparado en base a agua de mar. Concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 mM de la solución sulfato de cobre pentahidratado. La exposición al cobre se realizó en la fase exponencial del crecimiento.

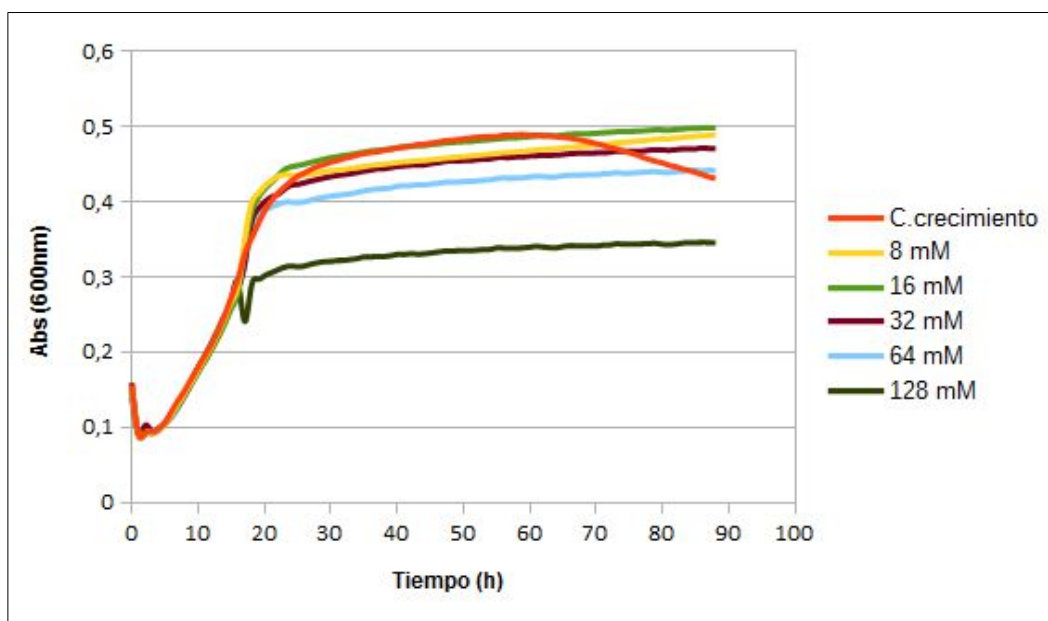
**Tabla N.º 4. Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

<b>Concentración de cobre</b>	<b>8 mM</b>	<b>16 mM</b>	<b>32 mM</b>	<b>64 mM</b>	<b>128 mM</b>
<b>Porcentaje</b>	63,8%	47,8%	47,5%	34,6%	31,5%
<b>Aumento/disminución de la Biomasa</b>	- 36,2%	- 52,2%	- 52,5%	- 65,4%	- 68,5%

\*Se asume que el control de crecimiento es un 100% del crecimiento.

## 1.2 Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en medio marino con agua destilada y suplementado con NaCl al 4 % (p/vol).

El crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 se vio poco afectado en el caso de las dos concentraciones de cobre más pequeñas (8mM y 16 mM), mientras que se vio más afectada (30,7 %) por la concentración de cobre de 128mM (Tabla N.º 5).



**Gráfico 3.** Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en medio marino con agua destilada y suplementado con NaCl al 4 % (p/vol). Concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 mM de la solución sulfato de cobre pentahidratado. La exposición al cobre se realizó en la fase exponencial del crecimiento.



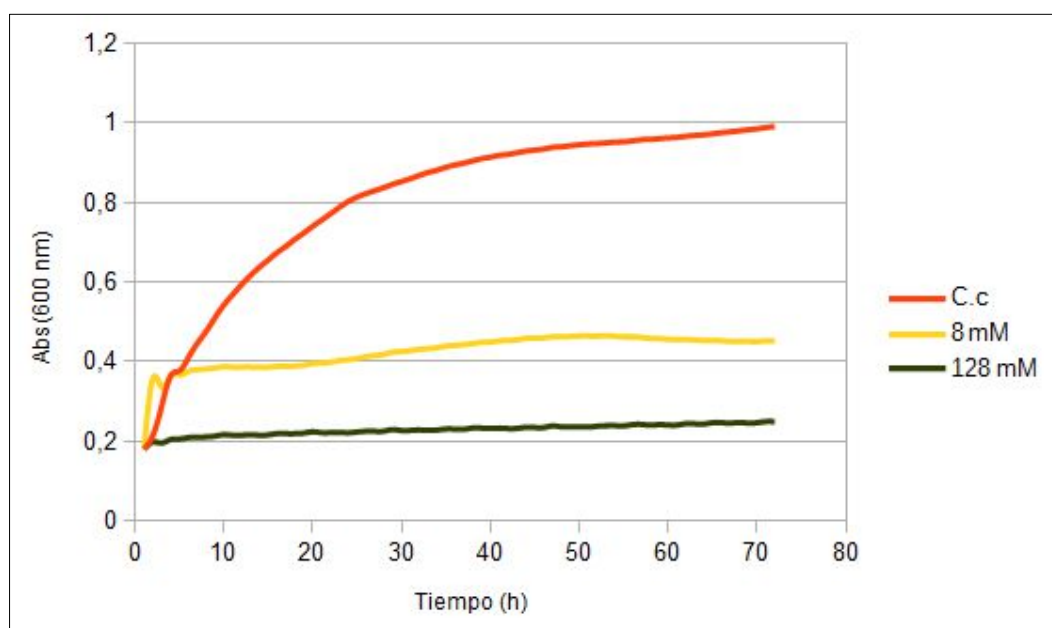
**Tabla N.º 5. Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

<b>Concentración de cobre</b>	<b>8 mM</b>	<b>16 mM</b>	<b>32 mM</b>	<b>64 mM</b>	<b>128 mM</b>
<b>Porcentaje</b>	95,2%	99,2%	94%	88,2%	69,3%
<b>Aumento/disminución de la Biomasa</b>	- 4,8%	- 0,8%	- 6%	- 11,8%	- 30,7%

\*Se asume que el control de crecimiento es un 100% del crecimiento.

### 1.3 Efecto del cobre en el crecimiento de *E.coli* MG1655 en medio Luria Bertani (LB).

En el gráfico 4 se visualiza el efecto de las concentraciones de cobre 8 y 128 mM en el crecimiento de la *E.coli* MG1655 con una disminución de la biomasa de un 50,6% y 74,1% respectivamente.



**Gráfico 4.** Efecto del cobre en el crecimiento de *E. coli* MG1655 en medio Luria Bertani (LB). Concentraciones 8 y 128 mM de la solución de sulfato de cobre pentahidratado. La exposición al cobre se realizó en la fase exponencial del crecimiento.

**Tabla N.º 6. Efecto del cobre en el crecimiento de *E. coli* MG1655.**

Concentración de cobre	8 mM	128 mM
Porcentaje	49,4%	25,9%
Aumento/disminución de la Biomasa	- 50,6%	- 74,1%

\*Se asume que el control de crecimiento es un 100% de crecimiento.

## **2. Efecto del cobre en la capacidad de formación de biopelículas de *Cobetia* sp.MM1IDA2H-1.**

### **2.1. Formación de biopelículas en placa de 96 pocillos.**

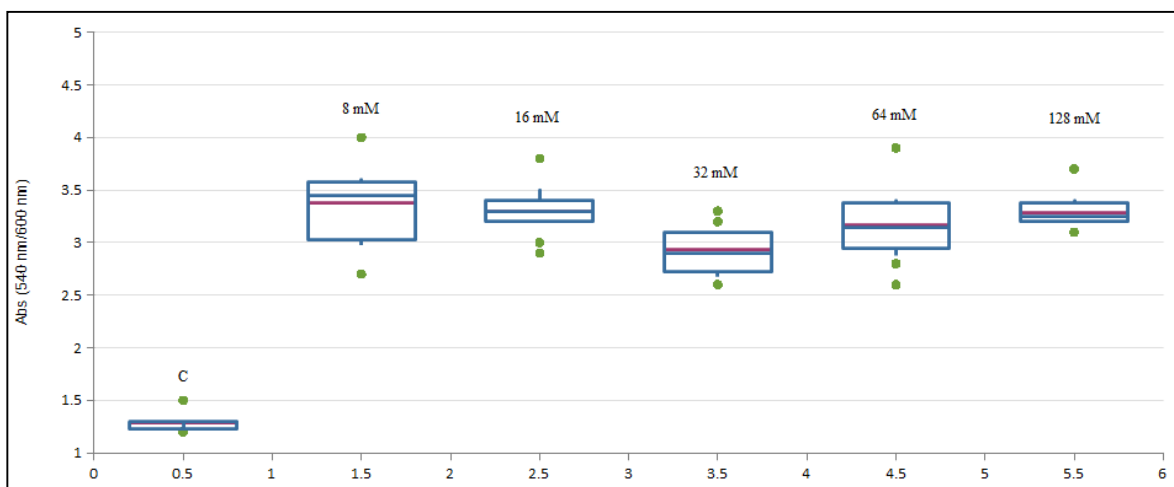
La bacteria *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 se caracteriza por formar biopelículas en superficies sumergidas, por lo que se procedió a evaluar si esta propiedad se veía afectada por la presencia de cobre, un agente antimicrobiano que entre sus características está la de evitar la formación de biopelículas.

Se midió la absorbancia mediante la tinción con cristal violeta 1%, lo que representa la cantidad de células adheridas a la superficie de los pocillos.

Este experimento se realizó luego de obtener la curva de crecimiento a las 72 horas en medio marino más agua de mar (Gráfico 5) y medio marino 4% NaCl (Gráfico 6).

### A. Medio marino preparado con agua de mar:

Los datos obtenidos se compararon con la media del control 1,29 para obtener este diagrama.



**Gráfico 5.** Formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 16, 32, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado. Se midió la absorbancia luego de 72 horas. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a al menos tres experimentos por separado.

Los resultados permiten observar un aumento estadísticamente significativo en la formación de biopelículas para todos los cultivos expuestos a las distintas concentraciones de cobre, en donde el máximo valor es de 159,5% para 8 mM (Tabla N.º 7). Para el análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza con análisis ANOVA, Tukey y Fisher LSD utilizando el software AnalystSoft Inc., StatPlus:mac - programa de análisis estadístico. Versión v6 (ver [www.analystsoft.com/es/](http://www.analystsoft.com/es/)). La comparación entre el control y las demás condiciones da una diferencia significativa con un  $p < 0,05$ .

**Tabla N.º 7.** Efecto del cobre en la formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1

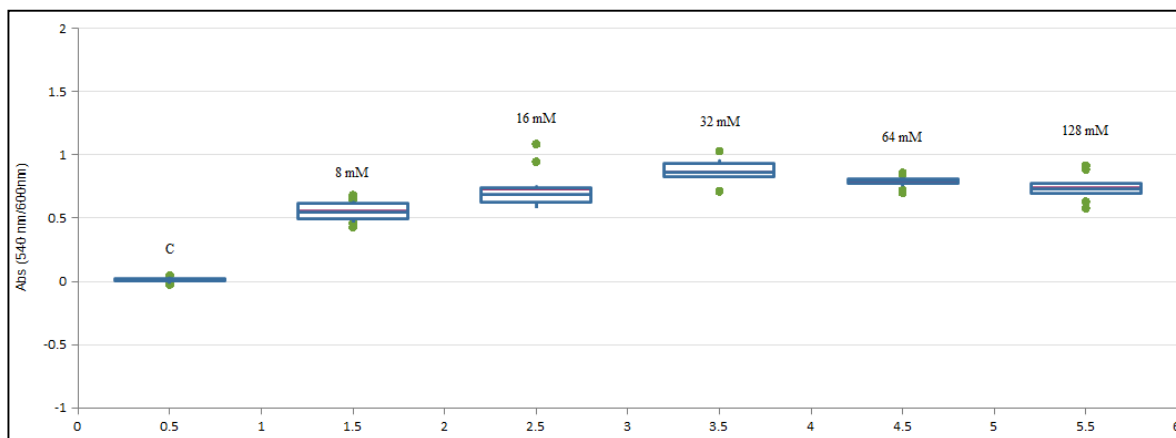
Concentración de cobre	8 mM	16 mM	32 mM	64 mM	128 mM
Porcentaje de formación biopelículas	259,5%	256%	222,9%	244%	252,5%
Aumento/disminución de formación de biopelículas	+ 159,5%	+ 156%	+ 122,9%	+ 144%	+ 152,5%

\*Se asume que el control de crecimiento es un 100%.

**B. Medio marino con agua destilada y suplementado con NaCl al 4 % (p/vol):**

Los datos obtenidos se compararon con la media del control 0,01 para obtener este diagrama. Se observó que, al igual que el caso anterior hay mayor formación de biopelículas en los cultivos expuestos a cobre que en el control.

El análisis de ANOVA, (Tukey y Fisher LSD) indica que la comparación entre el control y las demás condiciones dan una diferencia significativa con un  $p < 0,05$ .



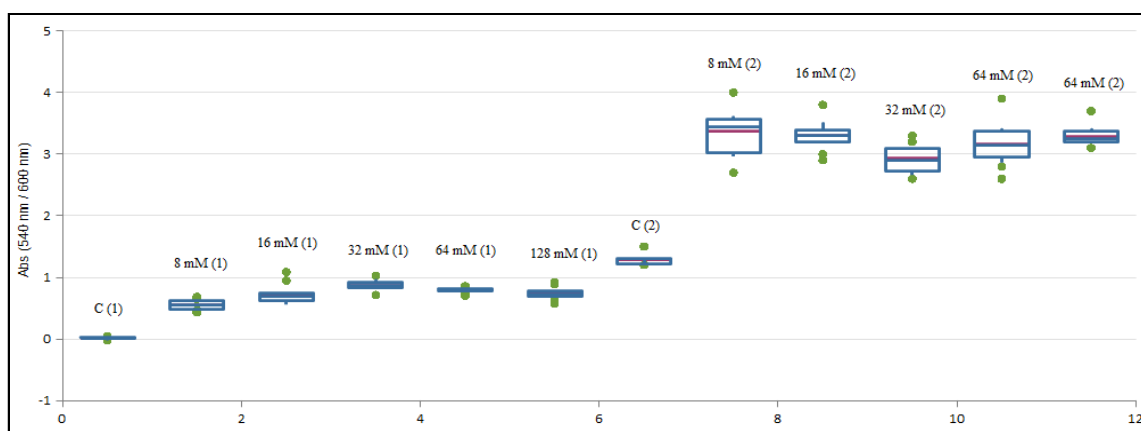
**Gráfico 6.** Formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 16, 32, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado. Se midió la absorbancia luego de 72 horas. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a al menos tres experimentos por separado.

**Tabla N.º 8. Efecto del cobre en la formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1**

Concentración de cobre	8 mM	16 mM	32 mM	64 mM	128 mM
Porcentaje de formación de biopelículas	3773,3%	5009,8%	5848,6%	5388,5%	5085,2%
Aumento/disminución de formación de biopelículas	+ 3673,3%	+ 4909,8%	+ 5748,6%	+ 5288,5%	+ 4985,2%

\*Se asume que el control es un 100%.

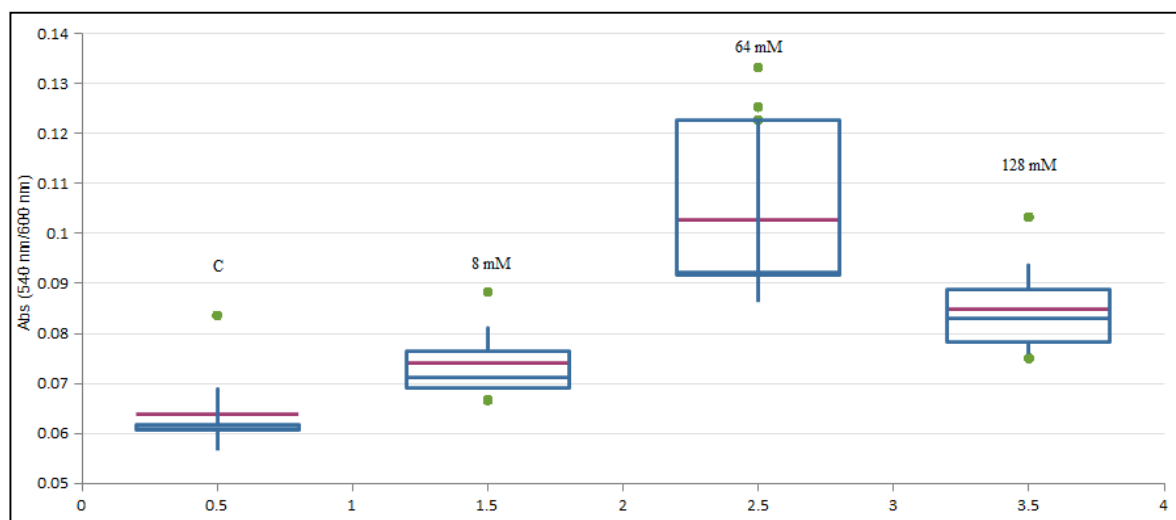
Hay que destacar que en comparación con los cultivos de medio marino más agua de mar, se formó menor cantidad de biopelículas en los cultivos en medio marino NaCl al 4 %. Y se puede visualizar con el análisis estadístico que hay una diferencia significativa entre el grupo de resultados de el medio marino agua de mar y el medio marino NaCl al 4 % con un  $p < 0,05$ .



**Gráfico 7.** Comparación de formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre en medio marino preparado con agua de mar y en medio marino con NaCl 4 %. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 16, 32, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado. (1) Corresponde a medio marino con NaCl 4 %. (2) Corresponde a medio marino preparado con agua de mar. Se midió la absorbancia luego de 72 horas. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a al menos tres experimentos por separado.

## 2.2. Efecto del cobre en la formación de biopelículas de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en agua de mar.

En este experimento la medición de la formación de biopelículas se realizó durante 3 semanas luego de la exposición a cobre, utilizando cristal violeta 1 % (vol/vol) como método de tinción. Los resultados muestran que existe una inducción por parte del cobre a la formación de biopelículas, siendo la concentración de 64 mM de cobre la que produjo mayor efecto (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** Formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre en agua de mar. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado para las semanas 1, 2 y 3. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a tres experimentos por separado.

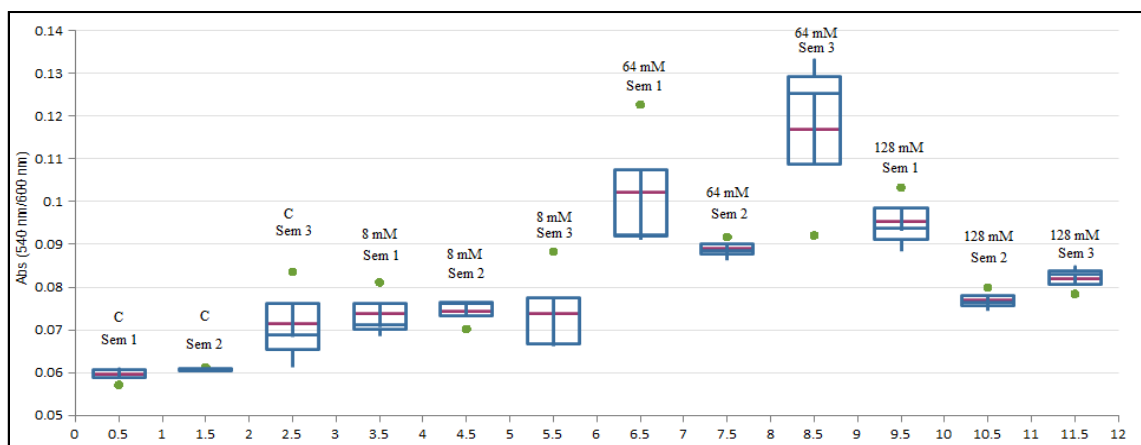


Para establecer diferencias entre las diferentes condiciones experimentales (concentración de cobre), se realizó un análisis estadístico de Test de Student para aprobar o rechazar la hipótesis planteada. La H1 para las concentraciones 8, 64 y 128 mM fueron aceptada según el test T cuando se compararon con la media del control 0,06, es decir que si hay una diferencia significativa entre cada una de las condiciones con el control por lo tanto se H1 es cierta.

Además se realizaron los análisis ANOVA, Tukey y Ficher LSD, considerando un  $p < 0,05$ .

Estos análisis mostraron los siguientes resultados:

- Diferencia entre control y 8 mM No significativa.
- Diferencia entre control y 64 mM significativa.
- Diferencia entre control y 128 mM significativa.
- Diferencia entre 8 mM y 64 mM significativa.
- Diferencia entre 8 mM y 128 mM No significativa.
- Diferencia entre 64 mM y 128 mM significativa.



**Gráfico 9.** Formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre en agua de mar. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado para las semanas 1, 2 y 3, siendo (Sem 1) primera semana, (Sem 2) segunda semana, (Sem 3) tercera semana. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a tres experimentos por separado.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en las tres semanas, en donde se comparan los porcentajes correspondientes a las tres concentraciones de cobre.

**Tabla N.º 9. Efecto del cobre en la formación de biopelículas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1**

Concentración de cobre	Semana (1)			Semana (2)			Semana (3)		
	8 mM	64 mM	128 mM	8 mM	64 mM	128 mM	8 mM	64 mM	128 mM
Porcentaje de formación de biopelículas	124%	171,5%	160%	122,3%	146,5%	126%	103%	263,6%	114,8%
Aumento/disminución de formación de biopelículas	+ 24%	+ 71,5%	+ 60%	+ 22,3%	+ 46,5%	+ 26%	+ 3%	+ 63,6%	+ 14,8%

\*Se asume que el control es el 100% .

### 3. Estudio de la expresión del gen *nlpE*:

#### 3.1. Diseño de partidores.

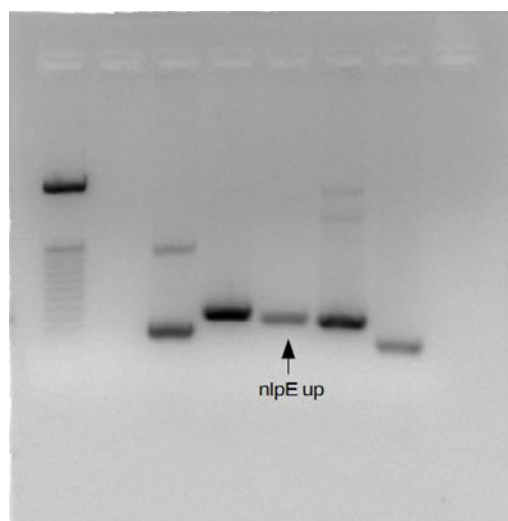
La tabla N.º 10 muestra los partidores diseñados, junto con su respectiva temperatura de melting. Estos son específicos para la zona promotora y codificante del gen de interés *nlpE*.

**Tabla N.º 10: Partidores diseñados para *nlpE*:**

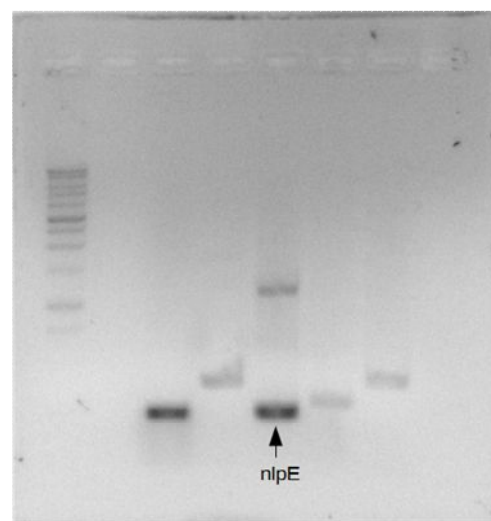
Región	Partidor directo (F)	Tm	Partidor reverso (R)	Tm
Promotora	5'- CTCCCACCATCAGAGTCCTG -3'	56,9 °C	5'- GAACGTCTGCGTCTGGATG -3'	55,9 °C
codificante	5'- GAGCAGGTTGCCGTCTACAA -3'	57,5 °C	5'- GTCGACCAGTCCAGTGTCT -3'	56,6 °C

El resultado de amplificación del gen *nlpE* utilizando los partidores F y R para cada región se muestra en la figura 4:

A.



B.

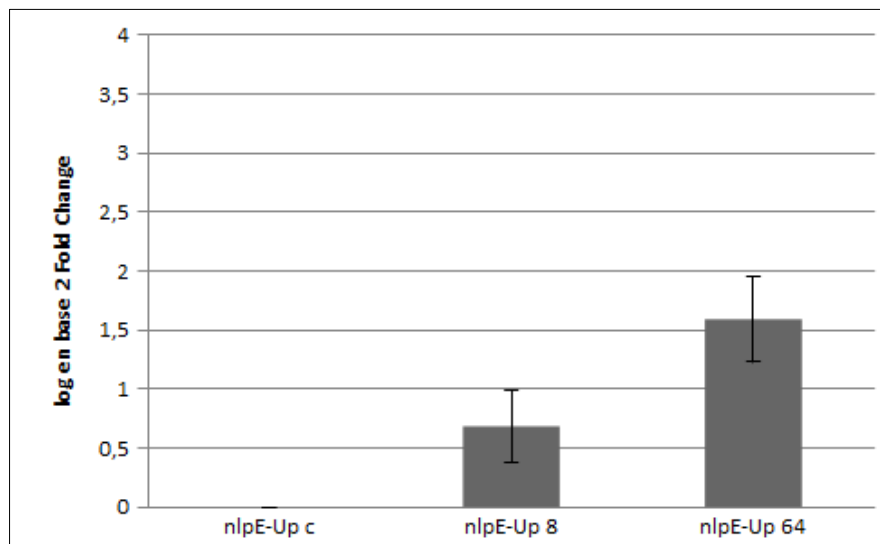


**Figura.4:** Productos de PCR convencional. A. Producto de amplificación de la zona promotora del gen *nlpE*. B. Producto de amplificación de la zona codificante del gen *nlpE*. Se utilizó un marcador de peso de 1 kb.

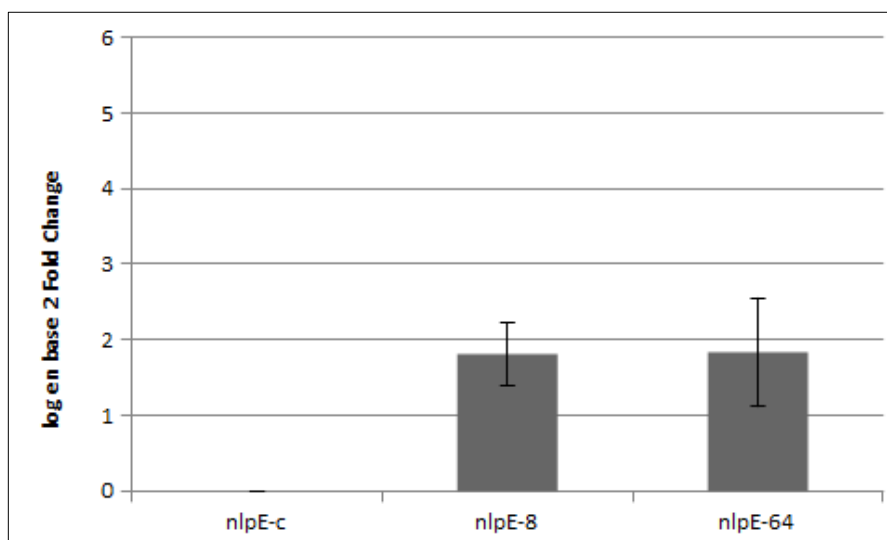
En las imágenes A y B se puede visualizar la banda de amplificación de las zonas promotora y codificante . Sin embargo, en la imagen B se puede visualizar de forma leve una segunda banda que puede deberse a la inespecificidad de los partidores a la  $T_m$  utilizada en el PCR convencional. Es por ello que para solucionar este problema, se elevó la  $T_m$  al realizar la qRT-PCR.

### **3.2. Efecto del cobre sobre la expresión genética del gen *nlpE* (qRT-PCR).**

Tras la exposición de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 a la solución de cobre, la qRT-PCR muestra una expresión relativa de la zona promotora de *nlpE* de 0,7 y 1,6 veces con respecto al control, a concentraciones de 8 mM y 64 mM respectivamente (Gráfico 10), mientras que la expresión relativa de la zona codificante es de 1,81 y 1,83 veces con respecto al control a concentraciones de 8 mM y 64 mM respectivamente (Gráfico 11). El control y las muestras expuestas al cobre fueron normalizadas con su correspondiente 16s.



**Gráfico 10:** Efecto del cobre en la expresión de la zona promotora del gen nlpE a concentraciones de cobre de 8mM y 64 mM. El control corresponde al ARN de nlpE no expuesto a cobre.

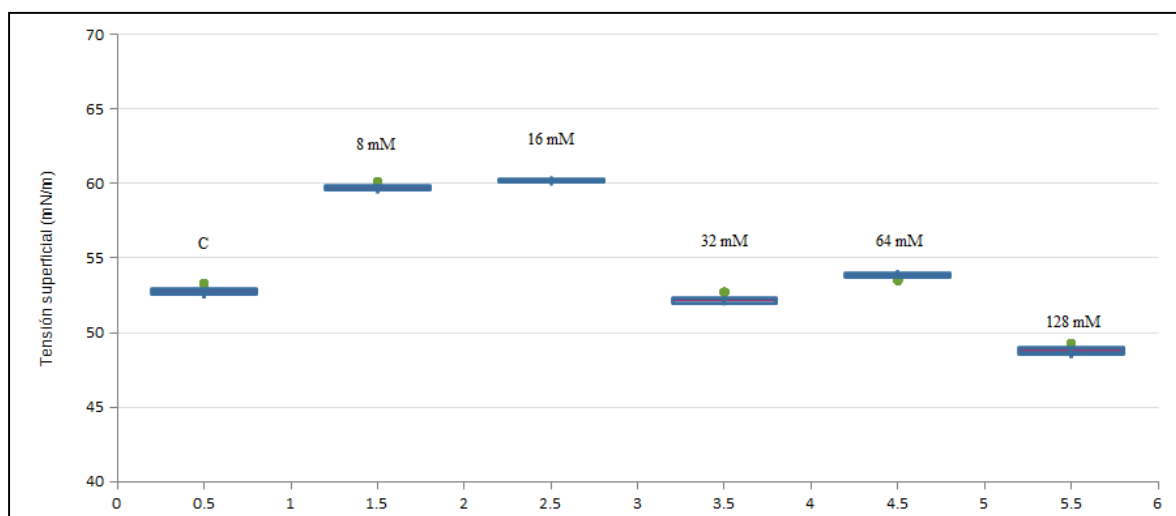


**Gráfico 11:** Efecto del cobre en la expresión de la zona codificante del gen nlpE a concentraciones de cobre de 8mM y 64 mM. El control corresponde al ARN de nlpE no expuesto a cobre.

#### 4.Efecto del cobre en la producción de sustancias tenso activas por *Cobetia sp.* MM1IDA2H-1 .

Mediante del uso del tensiómetro de DU NOUNY se midió la tensión superficial de las muestras con las distintas concentraciones de cobre.

Los resultados se muestran en el diagrama 6, en el que se aprecia el efecto notorio de la concentración 128 mM, la que disminuye la tensión superficial en un 14 %. Las concentraciones de 32 y 64 mM disminuyen de forma menor la tensión superficial en un 4,2% y 1,1% respectivamente (tabla N.º 11).

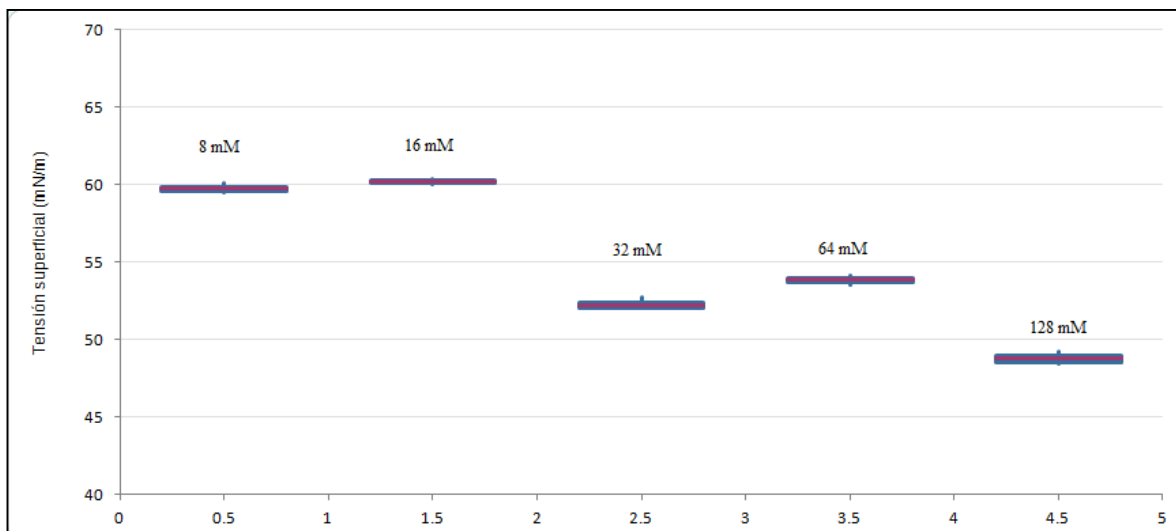


**Gráfico 12.** Efecto del cobre en la producción de sustancias tenso activas por *Cobetia sp.* MM1IDA2H-1. Los gráficos de cajas corresponden al control y a las concentraciones 8, 16, 32, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado. Se midió la tensión superficial luego pasar las 4 horas de crecimiento. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a tres experimentos por separado.

Se realizó un análisis de varianza con análisis ANOVA, Tukey y Fisher LSD. La comparación entre el 128 y las demás condiciones y el control da una diferencia significativa con un  $p < 0,05$ .

**Tabla N.º 11 Efecto del cobre en la producción de sustancias tenso activas por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

Concentración de cobre	8 mM	16 mM	32 mM	64 mM	128 mM
Porcentaje	113%	113,8%	98,8%	101,9%	88%
Disminución/aumento de tensión superficial	+ 13%	+ 13,8 %	- 1,2%	+ 1,9%	- 12%



**Gráfico 13.** Efecto del cobre en la producción de sustancias tenso activas por *Cobetia sp.* MM1IDA2H-1. Los gráficos de cajas corresponden a las concentraciones 8, 16, 32, 64 y 128 mM respectivamente de la solución sulfato de cobre pentahidratado. Se midió la tensión superficial luego pasar las 4 horas de crecimiento. La línea roja corresponde al promedio y las cajas corresponden a la desviación estándar de los datos. Los puntos verdes corresponden a datos fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico corresponde a tres experimentos por separado.



# Discusión

### 1. Efecto del cobre en el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.

El sulfato de cobre es un bactericida que se utiliza para cubrir las superficies metálicas en hospitales, el que ha demostrado reducir de un 90% a 95% la carga bacteriana de estas superficies, lo que reduce la transmisión de infecciones nosocomiales (46).

Además, se encuentra en preparaciones magistrales en farmacias como soluciones tópicas de 1g/1000L (4 mM) (47).

Se han realizado varios estudios sobre la acción del cobre en bacterias intrahospitalarias.

Se obtuvo la CMI 90 para *Enterococcus faecalis* siendo de 5,6 ug/ml (0,0224 mM) (46) y para *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* una CMI 90 de 10, 6, 10, 10 mM respectivamente (23).

Los resultados de este trabajo muestran que el cobre, a concentraciones de 8 mM, 16 mM, 32 mM, 64 mM y 128 mM, no afecta de manera crítica el crecimiento de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1. Incluso, en caso de exponer la cepa en su fase exponencial tardía induce su crecimiento. En ninguno de los casos y con ninguna concentración de cobre se logró inhibir el crecimiento de *Cobetia* en un 90%. El efecto del cobre varía dependiendo de el medio de cultivo y la fase de crecimiento en la que la bacteria fue expuesta al cobre. Por ejemplo en el medio marino 4% NaCl el efecto del cobre es menor que el medio marino más agua de mar, además, la exposición del cobre sobre *Cobetia* tiene un menor efecto durante la fase exponencial tardía que durante la fase exponencial.

Para *E. coli* MG1655 los resultados han mostrado que a concentración de 8 mM se ha visto aproximadamente una disminución del 50% de la biomasa y para la 128 mM una disminución de 74%.

## **2. Estudio de la capacidad de formación de biopelículas de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1.**

Una biopelícula es un conjunto de células microbianas que están irreversiblemente adheridas a una superficie envuelta en una matriz principalmente de material polisacárido. La interfaz sólido-líquido entre una superficie y una solución proporciona el entorno perfecto para la formación de biopelículas bacterianas (48).

Se ha visto que soluciones acuosas con altas concentraciones de varios cationes como sodio, calcio, lantano o hierro férrico mejoran la adhesión de *Pseudomonas fluorescens* al vidrio, a través de la reducción de la repulsión estática entre la superficie y la bacteria (49).

Por otro lado, un estudio encontró una significativa actividad de los complejos de cobre contra biopelículas en *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM), viéndose que son más efectivos en eliminar las biopelículas que Vancomicina, un antibiótico utilizado en el tratamiento de las infecciones por SARM (50).

En este estudio, se observó que el sulfato de cobre es capaz de inducir la formación de biopelículas. Las distintas concentraciones tuvieron un efecto positivo en todos los experimentos realizados, ya sea el de 96 pocillos a 72 horas en medio de cultivo o el de las 3 semanas en agua de mar.

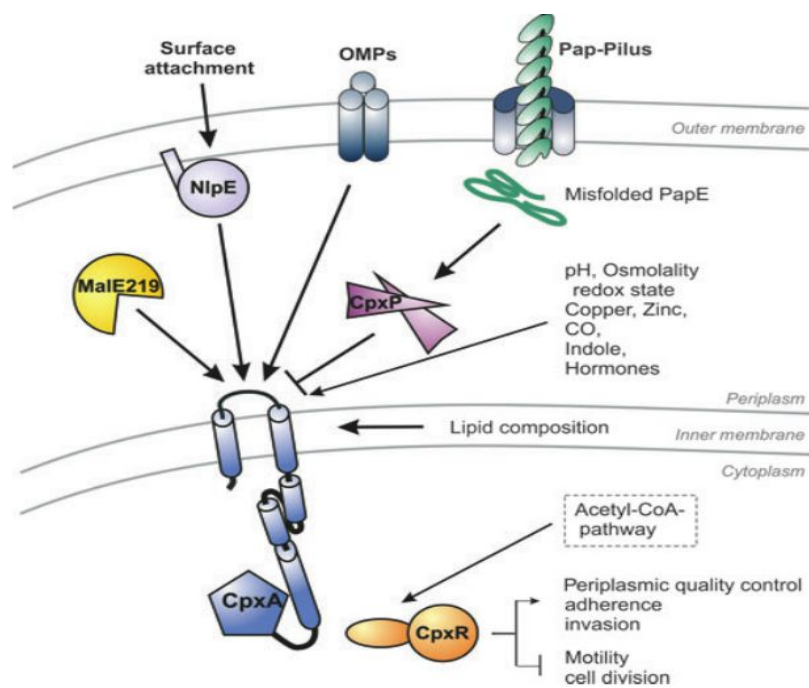
La formación de las biopelículas fue además afectada por el tipo de medio utilizado para cultivar la *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1. Por ejemplo, en el medio marino 4% NaCl hubo menor formación de biopelículas que en el medio marino más agua de mar.

### 3. Efecto del cobre sobre la expresión genética del gen *nlpE*.

El gen *nlpE* mejora la tolerancia de *E. coli* al cobre, como se ha visto en un estudio en donde *E. coli* mutante *cut f* sobrevive menos que *E. coli* original, en una placa de LB con una concentración de 4 mM de sulfato de cobre (51).

En otro estudio se ha visto que el sistema de doble componente Cpx tiene un rol importante en la formación de biopelículas en *E. coli*. Se ha observado que bajo condiciones específicas de estrés celular este sistema es activado por la lipoproteína NlpE mejorando la adhesión de las células y su estabilidad (52).

Este trabajo muestra que el gen *nlpE* es inducido en presencia de cobre a concentraciones 8 y 64 mM en un 0,7 y 1,6 veces respectivamente para la zona promotora y en un 0,4 y 0,7 veces respectivamente para la zona reguladora. Se vio en el punto anterior que la presencia de cobre induce la formación de biopelículas en *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1, por lo tanto se podría proponer que el mecanismo de la formación de biopelículas en *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 es por la activación del sistema doble componente Cpx, ya sea directamente por el cobre o por la lipoproteína NlpE (figura 5)



**Figura 5:** Integración de la señal de diversos estímulos del sistema de doble componente Cpx (28).

#### **4. Efecto del cobre en la producción de sustancias tensoactivas por *Cobetia sp.* MM1IDA2H-1.**

Existen varios lipopéptidos y lipoproteínas producidas por bacterias con propiedades tensoactivas, por ejemplo, la surfactina lipopeptídica cíclica que es un potente biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* y que reduce la tensión superficial del agua desde 72 mN/m hasta 27.9 mN/m a bajas concentraciones, o el biosurfactante BL-86, producido por *Bacillus licheniformis*, que reduce la tensión superficial del agua a 27 mN/m (53).

Sabiendo que el único gen en *Cobetia sp.* MM1IDA2H-1 relacionado con el cobre que produce moléculas lipoproteicas es el nlpE, y con el objetivo de averiguar de forma rápida si es que existe una regulación postranscripcional que merme la producción de la lipoproteína, se evaluó el efecto de la exposición en la tensión superficial. Los resultados mostraron que a una concentración de cobre de 128 mM, la tensión superficial del medio de cultivo se redujo desde 52,8 hasta 46,8 mN/m. Lo que indica que si se produjo la lipoproteína por efecto del cobre.

### **5. Futuras aplicaciones farmacéuticas de NlpE en inmunología.**

En estos últimos años, la investigación ha avanzado mucho para las distintas aplicaciones farmacéuticas en el área de las vacunas, ya sea en nuevos tipos de vacunas o en la forma de su administración. Se han estudiando nuevos tipos de coadyuvantes como emulsiones, saponinas, ADN bacteriano, liposomas, etc. y además se han logrado nuevas fórmulas de vacunas como ADN (gene gun, conjugado a lípidos o liposomas), vectores virales (adenovirus, polivirus) o vectores bacterianos (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*) (54). Con todos estos avances, la lipoproteína de membrana NlpE podría ser un potencial objeto de estudio para la investigación en las distintas aplicaciones farmacéuticas de vacunas.

# Conclusiones



1. La exposición de *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 a las distintas concentraciones de cobre induce la formación de biopelículas, especialmente a la concentración de 64 mM.
2. La expresión del gen *nlpE* es inducido por la presencia de cobre en 1,81 y 1,83 veces con respecto al control, a concentraciones de 8 mM y 64 mM respectivamente para la zona codificante y en 0,7 y 1,6 veces con respecto al control, a concentraciones de 8 mM y 64 mM respectivamente para la zona promotora.
3. La tensión superficial del medio de cultivo es reducida por la producción de una molécula tensoactiva por *Cobetia* sp. MM1IDA2H-1 en presencia de cobre a la concentración de 128 mM.

## **8. Bibliografía:**

1. Salazar F. 2000. El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. Rev. chil. Pediatr.71(4): 296-306.
2. Kalergis A. Fierro A. Figueroa C. González P y Tobar J. 2004. La detección antígeno-específica de linfocitos T y sus aplicaciones clínicas. Rev Méd Chile.132: 371-380.
3. Definition of Antigen, Immunogen, Hapten, Immunogenicity and Adyuvan.  
<http://www.biologyexams4u.com/2012/11/antigens-immune-system-elicitors.html#.V0T5J2aXtRk> (Pagina visitada el 25 de mayo del 2016).
4. Margini R. 1989. Inmunología e Inmunoquímica .Editorial Medica Panamericana de Argentina. Buenos Aires, 52 pp.
5. Tortora G. Funke B y Case C.2007 Introducción a la microbiología. Editorial Medica Panamericana de España. Madrid. 528 pp.
6. Salvini F. 2014. Bacterial Extracts as Immunomodulators for the Prevention of Recurrent Respiratory Infections in Children. J Med Microb Diagn. 3(2) :1-6.

7. García Hernández M, Guerrero Ramírez G , Castro Corona M y Medina de la Garza CE. 2009. Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. Elsevier. *Medicina Universitaria*.11(45): 247-259.
8. Franco D. 2004. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. *Rev Col Cienc Pec* 17(3): 280-289.
9. Vásquez M. Rondón I y Eslava P. 2012. Inmunoestimulantes en teleosteos: Probióticos, b-glucanos y LPS. *ORINOQUIA*. 16(1): 46-62.
10. Noguera A. Massó J. Soy D. Codina C y Ribas J. 2002. Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. *Farmacia Hospitalaria*. 26(2):96-105.
11. Vezina C, Kudelski A y Sehga SN. 1975. Rampamycin ( AY-22,989), a new antifungal antibiotic I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal Of Antibiotics*. 28(10): 721-726.
12. Buck M. 2006. Immunosuppression With Sirolimus After Solid Organ Transplantation in Children. *Pediatric Pharmacotherapy* 12 (2): 1-7.
13. Fonseca E., 2003, Inhibidores tópicos de la calcineurina Topic calcineurin inhibitors, *Med Clin*, 6:120-255.

14. Alberú J y Mancilla E. 2005. Inmunosupresión para receptores de trasplante renal estrategias actuales. *Revista de Investigación Clínica*. 57(2): 213-224.
15. Morandi M, Sali M, Manganelli R y Delogu G. 2013. Exploiting the mycobacterial cell wall to design improved vaccines against tuberculosis. *J Infect Dev Ctries* 7(3):169-181.
16. Cluff C. 2010. Monophosphoryl Lipid A (MPL) as an Adjuvant for Anti-Cancer Vaccines: Clinical Results. *Adv Exp Med Biol*. 667:111-23.
17. Lara AR. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10 (2): 209-223.
18. Ho R y Gibaidi M. 2003. *Biotechnology and Biopharmaceuticals Transforming protein and Genes into Drugs*. En: Wiley, editor. Hoboken, New Jersey, pp 63-67.
19. Ibacache Quiroga C. Ojeda J. Espinoza Vergara G. Olivero P. Cuellar M. y Dinamarca MA. 2013. The hydrocarbon-degrading marine bacterium *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1 produces a biosurfactant that interferes with quorum sensing of fish pathogens by signal hijacking. *Microbial Biotechnology* 6: 394–405.
20. Ibacache C., Canales C., Charifeh M. Y Dinamarca M. A., 2017, Genome of *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1, a hydrocarbon-degrading and biosurfactant producer marine bacterium, *Genome Announcement*.

21. Cortés S y Barragán B. 2013. Producción de biosufactantes por microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*. 6 : 1-8 .
22. Méndez A y Vilas. Microbial pathogane and strategies of combating them: science, technology and education, de España, 2013. 1135-1144.
23. Kappes T. Domínguez M. Bello H. Mella S. Riedel G y González Rocha G. 2012. Actividad de cobre sobre bacilos gram negativos multi-resistentes aislados en hospitales chilenos. *Rev Chil Infectol*. 29: 622-627.
24. Sakurai T y Kataoka K. 2007. Baisic applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *The Chemical Record*. 7: 220–229.
25. Behlau F. Canteros BI. Minsavage GV. Jones JB. y Graham JH. 2011. Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *Citrumelonis*. *American Society for Microbiology*. 77: 4089-4096.
26. Rensing Ch. Fan B. Sharma R. Mitra B y Rosen BP. 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *PNAS* 97: 652–656.
27. Gupta A y Lutsenko S. 2012. Evolution of Copper Transporting ATPases in Eukaryotic Organisms. *Current Genomics*. 13:124-133.

28. Hunke S. Keller R y Muller VS. 2012. Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* 326: 12–22.
29. Digiuoseppe PA y Silhavy TJ. 2003. Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. *JB*. 185: 2432–2440.
30. Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. *J Bacteriol*. 62: 293-300.
31. Harrison J. Turner R. Joo D. Stan M. Chan C. Allan N. Vrionis H. Olson M y Ceril H. 2008. Copper and Quaternary Ammonium Cations Exert Synergistic Bactericidal and Antibiofilm Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(8): 2870–2881.
32. O'Toole G y Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 28(3): 449-461.
33. RNA-SOLV® REAGENTE <http://www.genex.cl/stock/EZNAR683002.pdf> (Pagina visitada el 25 de mayo del 2016).
34. Schmeider R. y Edwards R., 2011, Quality control and preprocessing of metagenomic datasets, *Bioinformatic*, 26: 863-864.

35. Bankevich et al., 2012, SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J Comput Biol.*19(5):455-77.
36. Gurevich A. , Saveliev V., Vyahhi N. y Tesler G., 2013, QUILT: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 29(8):1072–1075.
37. Pareja-Tobes P., Manrique M., Pareja-Tobes E., Pareja E. y Tobe R., 2012, BG7: A New Approach for Bacterial Genome Annotation Designed for Next Generation Sequencing Data, *PLoS One*, 7(11):e49239.
38. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M y Tanabe M., 2016, KEGG as a reference resource for gene and protein annotation, *Nucl. Acids Res.* 44 (1): 457-462.
39. Thornton B. y Basu Ch. , 2011, Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software, *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY EDUCATION*, 39:145-154.
40. Green M. R., 2012, *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL*, en: New York, Green M. R. y Sambrook J. Editores, pp 2-21.
41. Referencia Fierro F. 2014, Electroforesis. En: México. Cornejo A. Serrato A. Rendón B y Rocha M, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología : aspectos teóricos y prácticos* 1ª ed. pp:27-51.

42. Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25:169–193.
43. Thornton B y Basu C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 39(2):145-54.
44. Aguilera P. Tachiquín M. Rocha M. Pineda B y Chánez M. 2014. PCR en tiempo real. En: México. Cornejo A. Serrato A. Rendón B y Rocha M, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología : aspectos teóricos y prácticos 1ª ed.* pp:175-201.
45. Livak K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 25: 402-408.
46. Sierra M, Sanhueza A, Alcántara R. y Sánchez G. 2013. Antimicrobial evaluation of copper sulfate (II) on strains of *Enterococcus faecalis*. In vitro study. *J Oral Res* 3: 114-118.
47. Cumbreño S. y Pérez F. L. , 2006, Cobre sulfato 1/1.000 solución tópica, *OFFRAM* 25:125-127.
48. Donlan R.M, 2002, Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious Diseases*., 8: 881-90.



49. Fletcher M., 1988, Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol*;170:2027–30.
50. Beeton M. L., Aldrich-Wright J.R. y Bolhuis A., 2014, The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes., *Journal of Inorganic Biochemistry*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 140:167–172.
51. Gupta S. D., Lee B. O. T, Camakris J. y Wu H. C, 1995, Identification of cutC and cutF (nlpE) Genes Involved in Copper Tolerance in *Escherichia coli*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 117: 4207-4215.
52. Otto K. , y Silhavy T. J. , 2001, Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway, *PNAS*, 99: 2287- 2292.
53. Desai J.D. y Banat I.M., 1997, Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 47–64.
54. Ho R y Gibaidi M. 2003. *Biotechnology and Biopharmaceuticals Transforming protein and Genes into Drugs*. En: Wiley, editor. Hoboken, New Jersey, pp 321-323.

