



**Universidad
de La Laguna**



Facultad de Farmacia
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



IPNA
CSIC

OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA PARA CUANTIFICAR LA EFICIENCIA DE LA CONJUGACIÓN BACTERIANA *IN VITRO* BASADO EN SELECCIÓN ANTIBIÓTICA

Trabajo de fin de Máster en Investigación y
Diagnóstico en Enfermedades Tropicales

Jordina Pujol Olivares

Tutores:

Eduardo Pérez Roth

Alicia Boto Castro

Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna

Tenerife, 2022

ÍNDICE

Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	5
3. Material y métodos	6
3.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	6
3.2 Medios de cultivo utilizados.....	6
3.3 Condiciones de cultivo y conservación	6
3.4 Stocks de antibióticos.....	7
3.5 Conjugaciones mediante co-cultivo en filtros de nitrocelulosa	7
3.6 Selección de transconjugantes y donadoras.....	7
3.7 Cálculo de la frecuencia/eficiencia de conjugación	8
3.8 Estudio del efecto inhibitor de la conjugación de diferentes compuestos.....	8
3.9 Medición de la emisión de fluorescencia.....	9
4. Resultados y discusión	10
4.1 Puesta a punto del protocolo de conjugación sobre filtros	10
4.2 Evaluación de la actividad inhibitora de la conjugación.....	12
4.3 Estabilidad del plásmido pJC01 en la cepa transconjugante	15
4.4 Fluorescencia emitida por la cepa transconjugante	16
5. Conclusiones.....	17
Bibliografía	18

ABSTRACT

Antibiotic resistance has become one of the major problems in health care nowadays. Bacteria can acquire antibiotic resistance by different natural mechanisms, but the most important is the acquisition through horizontal gene transfer (HGT). Despite HGT can occur in three main mechanisms, conjugation is the one that causes the greatest propagation of antibiotic resistance genes. Conjugation is based on the transmission of conjugative plasmids which carry these genes. One of the most promising strategies to fight antibiotic resistance is the investigation of conjugation inhibitors (COINs).

The aim of this study was the optimization of an *in vitro* conjugation protocol for the reproducible quantification of conjugation frequencies, which permits the study of anti-conjugation properties of candidate chemical compounds. Also, we tried to confirm the constitutive expression of the green fluorescent protein (GFP) in the transconjugant strain generated.

The optimized protocol using nitrocellulose filters and antibiotic selection, employing the donor *E. coli* MDS42 strain carrying plasmid pJC01 and the recipient *E. coli* BL21 (DE3) strain, allowed to obtain reproducible conjugation frequencies in the order of 10^{-1} . Additionally, the system was useful for the preliminary study of the possible conjugation inhibitory activity of five candidate chemical compounds. Finally, the pJC01 plasmid in the transconjugant strain was stable under antibiotic selection and constitutively express the GFP. This strain will be used for the optimization of a high-throughput *in vitro* conjugation protocol for the rapid and cost-effective evaluation of COIN candidates.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una de las grandes amenazas contra la salud global es la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, las cuales se van incrementando día tras día en todo el mundo causando enfermedades infecciosas que no responden a los tratamientos habituales (World Health Organization, 2020). En el año 2019 se cree que se produjeron 1.27 millones de muertes mundiales directamente atribuibles a la resistencia antibiótica (Murray *et al.*, 2022). Si no se pone remedio, se estima que para el 2050 se producirán hasta 10 millones de muertes al año debido a infecciones causadas por bacterias resistentes (Nabadda *et al.*, 2021).

La aparición de estas resistencias se debe a procesos naturales que incluyen mutaciones en el ADN, reordenamiento genético y la adquisición de material genético a través de vías de transferencia génica horizontal (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*), siendo esta última la que desempeña un papel más preponderante (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020). LA HGT tiene lugar, principalmente, a través de tres mecanismos: la transducción, la transformación y la conjugación (**Figura 1**) (Hall *et al.*, 2017). De los tres mecanismos, la conjugación bacteriana es probablemente el que en mayor medida contribuye a la propagación horizontal de las resistencias a los antibióticos (Graf *et al.*, 2019).

La conjugación es un proceso que se da entre dos células, que requiere un contacto directo entre ambas y puede darse incluso entre especies sin relación filogenética directa. En el caso de las bacterias gram-negativas, se requiere la formación de un pili (Koraimann & Wagner, 2014; Sørensen *et al.*, 2005). Este proceso se basa en la transferencia, principalmente, de plásmidos conjugativos que portan todos los genes necesarios para autotransferirse de una célula a otra (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020). Estos plásmidos son los portadores de genes que confieren resistencia a antibióticos (Peterson & Kaur, 2018).

La conjugación bacteriana se da de manera generalizada en una gran cantidad de ambientes y superficies (Li & Zhang, 2022; Viroille *et al.*, 2020). Es el mecanismo más importante de transmisión de resistencias en ambientes hospitalarios (Lerminiaux & Cameron, 2019). Por ejemplo, ocurre en los biofilms microbianos asociados a dispositivos médicos (Uruén *et al.*, 2020).

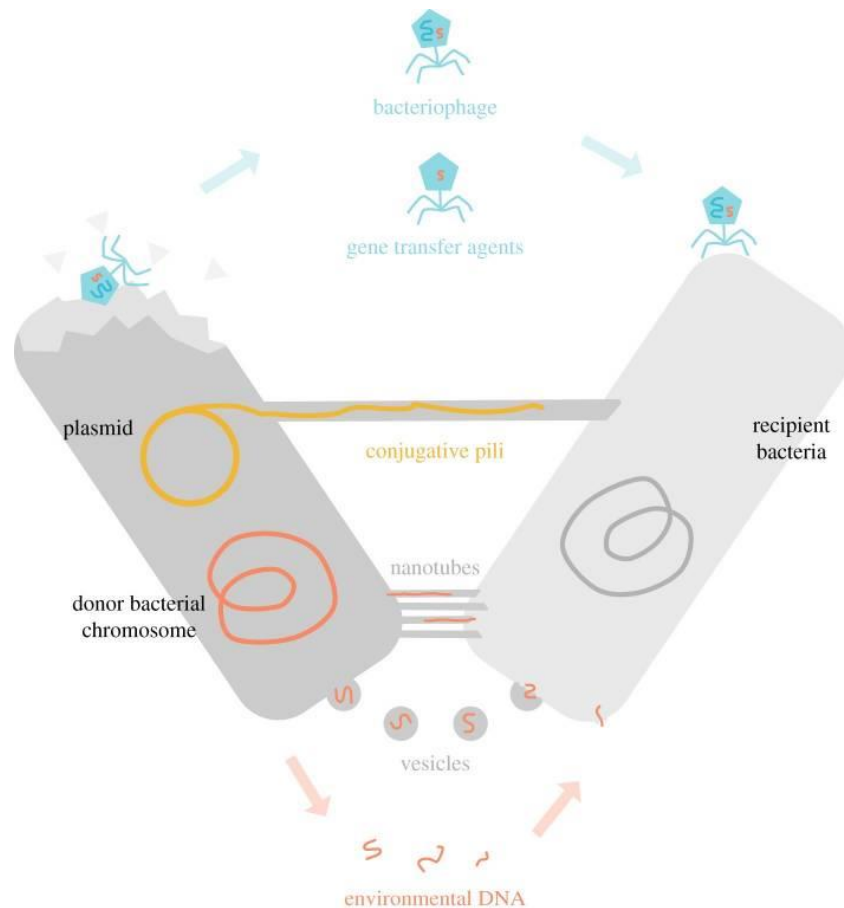


Figura 1. Ilustración de los tres mecanismos de transferencia génica horizontal. La transducción (en azul) se basa en la transferencia de ADN mediante bacteriófagos o agentes de transferencia de genes. La conjugación (en amarillo) es la transferencia de un plásmido a través de la formación de un pili conjugativo entre ambas células. La transformación (en rojo), proceso por el cual las células adquieren ADN libre del medio, aunque también se puede realizar a través de vesículas o la formación de nanotubos (Hall et al., 2017).

Actualmente, al problema del aumento de las resistencias se une el hecho de que cada vez se descubren menos antibióticos nuevos, en parte debido a la poca inversión que se destina en investigar nuevas moléculas con aplicación clínica. Se estima que únicamente 1 de cada 5.000 a 10.000 nuevas moléculas recibe la aprobación para uso en los humanos. Además, la rápida aparición de resistencias supone un reto para encontrar nuevos antibióticos eficaces (Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Por lo tanto, para intentar abordar el problema de la resistencia, se están investigando nuevas estrategias para tratar las infecciones con la intención de disminuir el uso de antibióticos. Algunas de esas estrategias son la terapia con fagos o fagoterapia (Gordillo Altamirano & Barr, 2019), el uso de péptidos antimicrobianos, el desarrollo de nuevos compuestos químicos, el reposicionamiento de fármacos con potenciales efectos antibacterianos o los compuestos que inhiben los factores de virulencia (Pacios et al., 2020).

Como medida para disminuir la propagación de las resistencias a los antibióticos, se ha considerado muy interesante el estudio de posibles inhibidores del proceso de conjugación (COINs, del inglés *Conjugation Inhibitors*) (Graf *et al.*, 2019). Los efectos de los COINs pueden tener lugar en cualquier punto del proceso de conjugación. Un requisito que debe cumplir un COIN ideal es que sea específico, es decir, que solamente afecte al proceso conjugativo sin interferir con el crecimiento o *fitness* de las bacterias (Graf *et al.*, 2019).

El estudio de posibles COINs *in vitro* requiere disponer de sistemas que permitan cuantificar la eficiencia de la conjugación mediante la determinación de la frecuencia con la que tiene lugar la transmisión de los plásmidos conjugativos. Se han desarrollado algunos métodos clásicos basados en selección con antibióticos, tanto en medio líquido como en medio sólido (Toomey *et al.*, 2009). Además, existen métodos basados en la detección de fluorescencia que permiten cuantificar la eficiencia de conjugación sin necesidad de selección con antibióticos (Getino *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

Debido a la gran importancia que desempeña la conjugación bacteriana en los procesos de transferencia de genes de resistencia a los antibióticos, en este trabajo se planteó la puesta a punto de un método de conjugación *in vitro* para estudiar la capacidad conjugativa de los plásmidos, y que permita evaluar la actividad inhibidora de la conjugación de compuestos químicos candidatos. Además, se programó confirmar la expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente (GFP) en la cepa transconjugante BL21 (DE3) portadora del plásmido pJC01 generada, cepa que será utilizada para la calibración del equipo de fluorescencia como requisito previo para la puesta a punto de un protocolo de conjugación basado en fluorescencia.

Para abordar dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de las condiciones experimentales de un protocolo de conjugación bacteriana *in vitro* en soporte sólido empleando filtros de nitrocelulosa y selección con antibióticos.
2. Evaluar la posible actividad inhibitoria de la conjugación de una serie de compuestos químicos candidatos empleando el sistema de conjugación *in vitro* optimizado.
3. Comprobar la emisión de fluorescencia en la cepa transconjugante *E. coli* BL21 (DE3) portadora del plásmido pJC01 y comparar dicha emisión con la de la cepa donadora *E. coli* MDS42 (pJC01).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

- MDS42 (pJC01). Cepa de *Escherichia coli* utilizada como donadora en los experimentos de conjugación. Esta cepa tiene resistencia cromosómica a rifampicina (Rf). Adicionalmente, esta cepa es portadora del plásmido conjugativo pJC01, el cuál codifica resistencia a cloranfenicol (Cm). El plásmido pJC01 es un derivado del plásmido R388 que tiene una proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor T7. En esta cepa la expresión de la GFP únicamente ocurre a niveles basales (Getino *et al.*, 2015).
- BL21 (DE3). Cepa de *E. coli* empleada como receptora en los experimentos de conjugación. Tiene resistencia cromosómica a estreptomicina (Sm) y está libre de plásmidos. Presenta codificado en su genoma el promotor T7, el cual permitirá expresar la proteína GFP cuando en la célula esté presente el plásmido pJC01.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Los medios de cultivo utilizados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

Medio	Composición (g/L)	
LB agar (Lennox) (Condalab®)	Agar bacteriológico	15
	Triptona	10
	Cloruro sódico	5
	Extracto de levadura	5
LB broth (Lennox) (Condalab®)	Triptona	10
	Cloruro sódico (NaCl)	5
	Extracto de levadura	5

También se prepararon medios de cultivo selectivos para los transconjugantes y para las células donadoras, los cuales están compuestos por medio LB agar al que se añadieron los antibióticos específicos a partir del stock descrito en el apartado 3.4.

3.3 CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN

Las cepas se crecieron rutinariamente en medio LB sólido a 37°C y líquido durante toda la noche (*o/n*). La conservación de los aislados se realizó en viales *Microbank* (Pro-lab diagnostics) a -80°C. Para comprobar la buena conservación y viabilidad de los aislados bacterianos, se realizaron siembras de cada aislado congelado en placas de LB.

3.4 STOCKS DE ANTIBIÓTICOS

Las cepas se seleccionaron, tanto en medio líquido como en medio sólido, usando los antibióticos (Sigma) apropiados a cada caso, los cuales fueron preparados según las instrucciones del fabricante en stocks de concentración 1000X (**Tabla 2**).

Tabla 2. Stocks de antibióticos utilizados.

Antibiótico	Concentración stock	Preparación stock (disolvente)
Estreptomicina (Sigma®)	300 mg/ml	1.5 g de antibiótico en 5 ml de agua
Cloranfenicol (Sigma®)	25 mg/ml	0.125 g de antibiótico en 5 ml de etanol
Rifampicina (Sigma®)	50 mg/ml	0.25 g de antibiótico en 5 ml de DMSO

3.5 CONJUGACIONES MEDIANTE CO-CULTIVO EN FILTROS DE NITROCELULOSA

Para realizar las conjugaciones se utilizaron filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (Millipore GSWP) como soporte. Se prepararon inóculos de las células receptoras y donadoras por separado en medio LB con selección antibiótica y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C en agitación (100 rpm). En el caso de las receptoras se añadió estreptomicina (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y en las donadoras cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Para cada conjugación, se depositaron en eppendorfs 100 μl de cada una de las cepas y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm. Los sedimentos se resuspendieron con 1 ml de LB y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Este paso del lavado se realiza para eliminar los restos de antibióticos que puedan interferir en el crecimiento de las cepas. Tras la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 50 μl de LB, los cuales se depositaron sobre filtros colocados previamente sobre placas LB sin selección antibiótica. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras dicha incubación, los filtros se colocaron en tubos de propileno de 15 ml a los que previamente se añadió 1 ml de medio LB. Los tubos se agitaron vigorosamente empleando un *vórtex* para favorecer que las células se desprendieran al medio líquido. A partir de esa solución, se realizaron diluciones seriadas en LB y cada una de ellas se sembró en placas con los correspondientes medios para seleccionar a las células donadoras y transconjugantes.

3.6 SELECCIÓN DE TRANSCONJUGANTES Y DONADORAS

La selección de las células transconjugantes (aquellas células receptoras que adquirieron el plásmido pJC01 durante el proceso de conjugación) se llevó a cabo sembrando las mezclas conjugativas en placas de LB con estreptomicina (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por otro lado, la selección de las células donadoras se realizó mediante la siembra de la mezcla

conjugativa en placas de LB con rifampicina (50 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C *o/n*, tras lo cual se procedió al recuento de colonias.

3.7 CÁLCULO DE LA FRECUENCIA/EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN

Tras la incubación *o/n* de las placas sembradas con las mezclas conjugativas, se contaron las colonias de donadoras (D) y transconjugantes (T) en las placas de LB agar. La estimación de la frecuencia de conjugación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{T}{D} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias transconjugantes} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{volumen sembrado}}{N^{\circ} \text{ colonias donadoras} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{volumen sembrado}}$$

3.8 ESTUDIO DEL EFECTO INHIBIDOR DE LA CONJUGACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS

Los compuestos químicos evaluados fueron cedidos por el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC (IPNA-CSIC), y su estructura se representa en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Estructuras de los compuestos químicos evaluados.

Compuesto	Estructura
Compuesto 1	<p>H-Ser-OMe.HCl PM 155,58</p>
Compuesto 2	<p>Z-L-Ala-OH PM 223,23</p>
Compuesto 3	<p>Z-Leu-Ser-OMe PM 366,41</p>
Compuesto 4	<p>Z-Ala-Ser-OMe PM 324,33</p>
Compuesto 5	<p>Z-D-Ala-OH PM 223,23</p>

La evaluación de la actividad inhibidora de la conjugación de los compuestos químicos se llevó a cabo según lo descrito en los apartados 3.5, 3.6 y 3.7 con la particularidad de que los filtros con las mezclas conjugativas se depositaron en placas de LB a las que previamente se les añadieron cada uno de los compuestos ensayados por separado a una concentración de 50 µM. En cada experimento se llevó a cabo, de forma paralela, la conjugación en placas de LB a las que no se añadió ningún compuesto químico como control.

3.9 MEDICIÓN DE LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA

Para comprobar la expresión de la proteína GFP y, por tanto, la emisión de fluorescencia en la cepa transconjugante BL21 (DE3) portadora del plásmido pJC01 se preparó un inóculo con selección antibiótica utilizando estreptomycin (300 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) y se incubó *o/n*. A partir de dicho inóculo se realizó una dilución 1/100 y se incubó en las mismas condiciones. Se cogieron 200 µl del inóculo en fase exponencial y se añadieron en una placa de 96 pocillos. La cepa donadora MDS42 se trató de la misma manera, pero realizando la selección con rifampicina (50 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml).

La lectura de la fluorescencia se llevó a cabo empleando el lector FLUOstar Omega (BMG LabTech) utilizando el filtro de excitación con una longitud de onda de 485-12 nm y un filtro de emisión con una longitud de onda de 520 nm. Además, se midió la densidad óptica a 595 nm para hacer una relación entre fluorescencia y crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$Ratio = \frac{Fluorescencia}{OD_{595}}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE CONJUGACIÓN SOBRE FILTROS

Nuestro primer objetivo consistió en la puesta a punto de un protocolo de conjugación que generase resultados reproducibles. Para ello empleamos la cepa donadora MDS42 portadora del plásmido conjugativo pJC01 y la cepa receptora libre de plásmidos BL21 (DE3). Ambas cepas fueron proporcionadas por el Profesor Raúl Fernández López de la Universidad de Cantabria. Tras la recepción de las cepas estas fueron crecidas en medio LB líquido con los antibióticos apropiados (estreptomomicina en el caso de la cepa receptora y cloranfenicol en el caso de la cepa donadora) para confirmar la presencia de los marcadores de selección antibiótica en cada caso.

Se realizó un experimento preliminar para confirmar la capacidad de transferencia conjugativa del plásmido pJC01, comprobar la correcta selección antibiótica de las cepas, así como el rango de diluciones más apropiado para el recuento de colonias. Para ello se colocaron 3 filtros de nitrocelulosa en una placa de LB que se preincubó a 37°C durante 30 minutos. Al primer filtro se le añadieron solo células donadoras, al segundo se le añadieron células receptoras y al tercer filtro la mezcla de células donadoras y receptoras. La placa fue incubada durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se procedió a realizar las diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) y posterior extensión en placas de LB con selección antibiótica para las células transconjugantes (Sm y Cm). Adicionalmente, las diluciones realizadas a partir del filtro en el que se depositó la mezcla de células donadoras y receptoras se sembraron en placas de agar LB con Rf y Cm.

Tras la incubación durante toda la noche a 37°C, y según lo esperado, no se observó crecimiento en ninguna de las placas con Sm + Cm sembradas a partir de los filtros en los que únicamente se habían añadido células donadoras o receptoras. Por otro lado, se observó el crecimiento de colonias en las placas sembradas a partir de los filtros en los que se habían mezclado donadoras y receptoras, lo que demuestra que el plásmido pJC01 se transfirió horizontalmente de las células donadoras a las receptoras, confirmando la capacidad conjugativa del mismo que había sido descrita previamente (Getino *et al.*, 2015). Asimismo, a partir de las diluciones de los filtros que contenían donadoras y receptoras se obtuvo crecimiento en las placas con selección para las células donadoras (Rf + Cm). En la **Figura 2** se muestra el crecimiento característico de las colonias de las células transconjugantes y donadoras, en ambos casos, colonias de color blanquecino, circulares y viscosas.

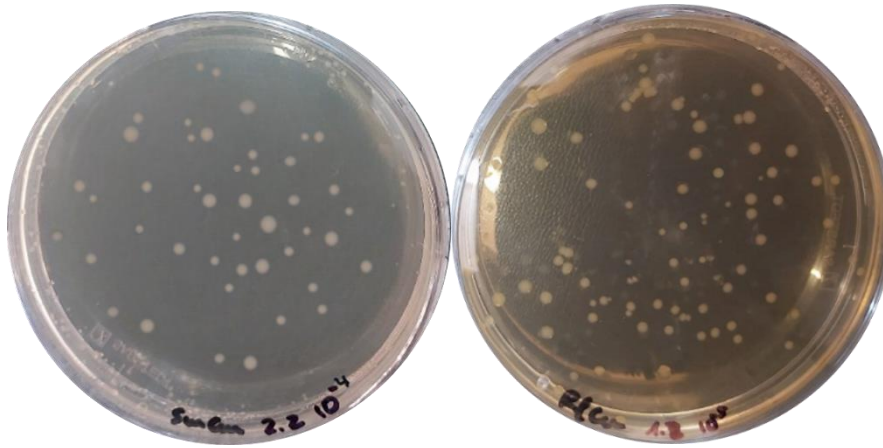


Figura 2. Crecimiento de la dilución 10^{-4} de transconjugantes en placas LB con estreptomicina y cloranfenicol a la izquierda y dilución 10^{-5} de las células donadoras en placas con rifampicina y cloranfenicol a la derecha. Se puede observar el aspecto de las colonias con coloración blanca, circulares y textura viscosa.

En este experimento preliminar, en base al número de colonias que crecieron en las placas, se pudo determinar que las diluciones más adecuadas para el recuento de transconjugantes eran las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , mientras que para las células donadoras las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , siendo dichas diluciones las que se decidió sembrar en los siguientes experimentos. La medida de la eficiencia de conjugación del plásmido pJC01 se realizó contabilizando el número de transconjugantes (T) que se obtienen cuando se pone en contacto una población de donadoras MDS42 (pJC01) con una población de receptoras BL21 (DE3), durante un tiempo t. Este primer ensayo permitió obtener una frecuencia de conjugación de 0.522×10^{-1} transconjugantes/donadoras (**Tabla 4**). Para calcular la frecuencia de conjugación se utilizó la dilución 10^{-4} en el caso de las placas Sm y Cm y la dilución 10^{-5} de las placas Rf y Cm.

Tabla 4. Recuento de colonias y frecuencias de conjugación en el experimento preliminar de conjugación *in vitro* entre las cepas *E. coli* MDS42 portadora del plásmido pJC01 y *E. coli* BL21 (DE3). Inc= incontable.

Placas	Sm + Cm					Rf + Cm					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Experimento inicial	Inc	Inc	265	106	5	Inc	Inc	>300	>300	203	23
Frecuencia (transconjugantes/donadoras)						0.522x10 ⁻¹					

Tras establecer las condiciones experimentales, se repitió el ensayo por triplicado para obtener valores medios de la frecuencia de conjugación y comprobar la reproducibilidad de los resultados. Esta vez, se utilizaron 3 filtros a los que se añadió la mezcla de donadoras + receptoras.

En la **Tabla 5** se presentan los resultados obtenidos en dicho experimento. Para calcular las frecuencias de conjugación se utilizó la dilución 10^{-4} en el caso de las placas Sm+Cm y la dilución 10^{-5} en las placas Rf+Cm. La frecuencia de conjugación media obtenida fue de 0.469×10^{-1} transconjugantes/donadoras, muy similar a la obtenida en el experimento preliminar y acorde a la frecuencia de conjugación descrita en estudios previos para el plásmido pJC01.

Tabla 5. Recuento de colonias y frecuencias de conjugación de las réplicas de conjugación in vitro entre las cepas *E. coli* MDS42 portadora del plásmido pJC01 y *E. coli* BL21 (DE3).

Placas	Sm + Cm		Rf + Cm		Frecuencia (transconjugantes/donadoras)
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
Filtro 1	334	34	73	5	0.465×10^{-1}
Filtro 2	256	31	66	14	0.469×10^{-1}
Filtro 3	252	34	74	6	0.472×10^{-1}
Media \pm desviación estándar					$0.469 \times 10^{-1} \pm 0.361 \times 10^{-3}$

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA CONJUGACIÓN

Una vez se puso a punto el ensayo en el que se estableció un valor de la frecuencia de conjugación reproducible del plásmido pJC01, se utilizó dicho sistema para evaluar la capacidad inhibitoria de la conjugación de varios compuestos químicos candidatos (ver apartado 3.8). Desafortunadamente, no se pudo disponer de un compuesto químico inhibidor de la conjugación de referencia para incluirlo como control positivo en los experimentos de inhibición.

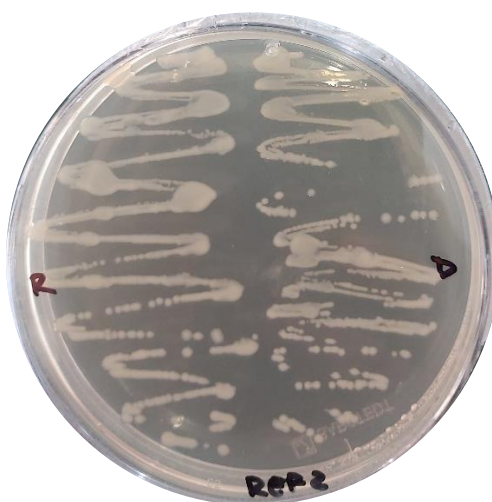


Figura 3. Crecimiento de las cepas *E. coli* MDS42 portadora del plásmido pJC01 y *E. coli* BL21 (DE3) en placa LB junto con el compuesto 2. R= células receptoras BL21 (DE3), D= células donadoras MDS42 (pJC01).

Un inhibidor de la conjugación ideal debe mostrar actividad inhibidora específica, es decir, no debe afectar al crecimiento de las células. Por tanto, en primer lugar, para asegurarnos que los compuestos candidatos no afectaban al crecimiento de las células donadoras y receptoras, se comprobó la actividad antibacteriana de cada uno de ellos a la concentración empleada en los experimentos (50 μ M) mediante experimentos de crecimiento en medio sólido. Se confirmó que los compuestos no afectaban al crecimiento (**Figura 3**), y, por lo tanto, se continuó estudiando su posible capacidad inhibidora de la conjugación.

Los experimentos con cada uno de los compuestos se realizaron como se indicó anteriormente. Para calcular las frecuencias de conjugación se utilizaron los recuentos de las diluciones 10^{-4} en el caso de las placas con Sm y Cm, y los recuentos de las diluciones 10^{-5} de las placas con Rf y Cm, a excepción del compuesto 3 en el que se utilizó el recuento de la dilución 10^{-3} de las placas Sm y Cm. Paralelamente, se realizó el experimento sin incluir ningún compuesto químico como control. En todos los experimentos, los controles salieron con una frecuencia en el orden de 10^{-1} , indicando que los valores de frecuencia de conjugación del plásmido pJC01 son reproducibles empleando el protocolo optimizado. En la **Tabla 6** se muestran los resultados de los ensayos realizados con los cinco compuestos químicos.

Tabla 6. Recuento de colonias y frecuencias de conjugación obtenidas en los experimentos empleando los compuestos químicos.

Placas Dilución (UFC/placa)	Sm + Cm		Rf + Cm		Frecuencia (transconjugantes/donadoras)
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Control ensayo compuesto 1 y 2					
Filtro 1	204	64	142	20	0.451 x10 ⁻¹
Filtro 2	307	91	204	17	0.446 x10 ⁻¹
Compuesto 1					
Filtro 1	342	74	113	13	0.654x10 ⁻¹
Filtro 2	>300	71	91	45	0.78x10 ⁻¹
Filtro 3	>300	77	123	6	0.626x10 ⁻¹
Media ± desviación estándar					0.687x10 ⁻¹ ± 0.819x10 ⁻²
Compuesto 2					
Filtro 1	>300	153	184	20	0.831x10 ⁻¹
Filtro 2	>300	65	165	28	0.818x10 ⁻¹
Filtro 3	>300	139	185	20	0.751x10 ⁻¹
Media ± desviación estándar					0.800x10 ⁻¹ ± 0.429x10 ⁻²
Control ensayo compuesto 3, 4, 5					
Filtro 1	175	75	158	23	0.474 x10 ⁻¹
Filtro 2	276	94	179	35	0.525 x10 ⁻¹
Compuesto 3					
Filtro 1	157	37	118	18	0.133x10 ⁻¹
Filtro 2	244	16	149	49	0.163x10 ⁻¹
Filtro 3	189	33	132	10	0.143x10 ⁻¹
Media ± desviación estándar					0.146x10 ⁻¹ ± 0.156x10 ⁻²
Compuesto 4					
Filtro 1	>300	31	127	20	0.244x10 ⁻¹
Filtro 2	>300	42	163	20	0.257x10 ⁻¹
Filtro 3	259	45	134	31	0.193x10 ⁻¹
Filtro 4	138	16	196	15	0.704x10 ⁻²
Filtro 5	118	17	182	16	0.648x10 ⁻²
Media ± desviación estándar					0.166x10 ⁻¹ ± 0.930x10 ⁻²
Compuesto 5					
Filtro 1	>300	119	167	22	0.712x10 ⁻¹
Filtro 2	>300	149	252	22	0.591x10 ⁻¹
Filtro 3	>300	91	145	18	0.627x10 ⁻¹
Media ± desviación estándar					0.643x10 ⁻¹ ± 0.622x10 ⁻²

Según estos resultados, podemos concluir que ningún compuesto ha disminuido la frecuencia de conjugación por debajo de 10⁻² transconjugantes/donadoras. Se realizó una comparación estadística de cada compuesto con la frecuencia de conjugación de los controles utilizando la herramienta estadística *t-test* para dos muestras independientes mediante el

software SPSS. Estas comparativas estadísticas permitieron establecer que los compuestos 3 y 4 son significativamente diferentes de los controles (p -valor <0.05) (**Figura 4**).

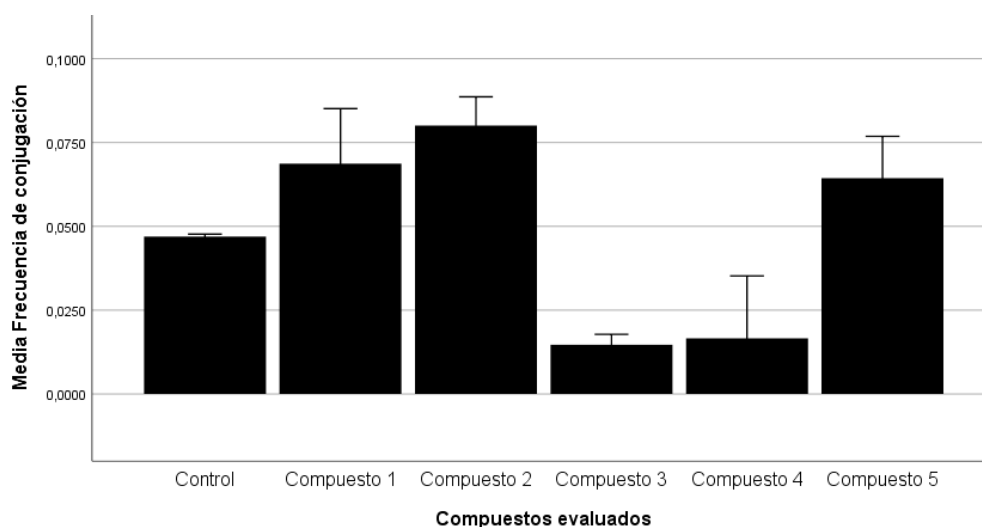


Figura 4. Representación gráfica de las frecuencias de conjugación obtenidas en el ensayo de conjugación *in vitro*, donde se puede observar la diferencia de los compuestos 3 y 4 respecto al control.

El análisis de la relación estructura-actividad muestra que los compuestos dipéptidos (que corresponden a los compuestos 3 y 4) son los únicos que alteran ligeramente la conjugación. Si comparamos estos dos compuestos, observamos que la diferencia radica en la unidad hidrofóbica, donde el compuesto 3 tiene una leucina que tiene mayor volumen que la alanina del compuesto 4. Por consiguiente, podemos decir que los cambios en el residuo hidrofóbico no anulan la actividad.

Como se puede observar, el valor de frecuencia del compuesto 3 (0.146×10^{-1} transconjugantes/donadoras) es ligeramente inferior al del compuesto 4 (0.166×10^{-1} transconjugantes/donadoras). Esto podría ser indicativo de una mayor actividad de los compuestos con mayor volumen en la unidad hidrofóbica. De cualquier manera, se trata de resultados muy preliminares y se deben estudiar en mayor profundidad dichos compuestos.

4.3 ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO pJC01 EN LA CEPA TRANSCONJUGANTE

Como resultado de la conjugación entre las cepas MDS42 (pJC01) y BL21 (DE3), se obtuvo la cepa transconjugante BL21 (DE3) portadora del plásmido pJC01. Esta cepa es necesaria para la calibración del lector de fluorescencia como paso previo a la puesta a punto de un sistema de conjugación basado en fluorescencia en el futuro. Esta cepa tiene como particularidad la capacidad de emitir fluorescencia, gracias a la expresión de la proteína GFP contenida en el plásmido bajo el control del promotor T7 presente en el cromosoma de la célula BL21 (DE3).

La GFP se debe expresar de manera constitutiva a altos niveles en dicha cepa y, debido a ello, se podría ver comprometida la estabilidad del pJC01. Sin embargo, se pudo comprobar que el plásmido pJC01 se mantiene de manera estable en la cepa BL21 (DE3) bajo selección antibiótica, no siendo así cuando los cultivos se crecían sin dicha selección, conllevando la pérdida de pJC01. No obstante, en el caso de la cepa donadora, al no expresarse la proteína GFP, el plásmido pJC01 se mantiene estable en la célula incluso sin selección antibiótica.

4.4 FLUORESCENCIA EMITIDA POR LA CEPA TRANSCONJUGANTE

Con el objetivo de comprobar y comparar la emisión de fluorescencia, se realizaron inóculos de la cepa transconjugante y de la cepa donadora MDS42 portadora del plásmido pJC01, y se midió la emisión de fluorescencia y la absorbancia en fase exponencial. Los resultados se incluyen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados de la fluorescencia emitida por las células donadoras MDS42 (pJC01) y transconjugantes BL21 (DE3) portadoras del plásmido pJC01.

Cepa	Emisión (520 nm)	OD ₅₉₅	Ratio Fluorescencia/OD ₅₉₅
MDS42 (pJC01)	174	1.067	163.1
BL21 (DE3) + pJC01	468	0.834	561.2

Según lo esperado, la cepa transconjugante emite aproximadamente 3,5 veces más fluorescencia que la cepa donadora, donde la expresión de la proteína GFP está reprimida y sólo se detectan niveles basales de expresión. Para realizar esta comprobación se calcularon los ratios fluorescencia/OD₅₉₅ de ambas cepas y se comparó la relación entre ambos. Así, nos aseguramos que la diferencia en la emisión de fluorescencia no se debió a un crecimiento diferente de ambas cepas, sino a la diferente expresión de la proteína GFP entre las cepas transconjugante y donadora. Tras establecer que la nueva cepa transconjugante expresa de manera constitutiva la proteína GFP, se podrán realizar estudios en un futuro para poner a punto un protocolo de conjugación *in vitro* mediante fluorescencia. La diferencia entre la ratio fluorescencia/OD₅₉₅ de la cepa transconjugante y la donadora proporciona el rango dinámico que se utilizarán en los ensayos en dicho sistema de conjugación basado en fluorescencia.

5. CONCLUSIONES

1. El protocolo de conjugación permitió obtener valores reproducibles de la frecuencia de conjugación del plásmido pJC01 alrededor de 0.5×10^{-1} transconjugantes/donadoras, similares a los descritos previamente para dichos plásmidos.
2. Se ha podido llevar a cabo la evaluación preliminar de la posible actividad inhibitoria de la conjugación de cinco compuestos químicos candidatos.
3. Los compuestos dipéptidos dieron lugar a una ligera reducción de la frecuencia de conjugación del plásmido pJC01.
4. Cambios en la unidad hidrofóbica de los compuestos dipéptidos no dieron lugar a pérdidas de actividad.
5. El plásmido pJC01 es estable en la cepa BL21 (DE3) empleando selección antibiótica.
6. La cepa BL21 (DE3) portadora del plásmido pJC01 expresa de manera constitutiva la proteína GFP, no siendo así en el caso de la cepa donadora que tiene reprimida su expresión.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Rodríguez, I., Arana, L., Ugarte-Uribe, B., Gómez-Rubio, E., Martín-Santamaría, S., Garbisu, C., & Alkorta, I. (2020). Type IV Coupling Proteins as Potential Targets to Control the Dissemination of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 201. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00201>
- Getino, M., Sanabria-Ríos, D. J., Fernández-López, R., Campos-Gómez, J., Sánchez-López, J. M., Fernández, A., Carballeira, N. M., & de la Cruz, F. (2015). Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer. *MBio*, 6(5), e01032-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01032-15>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Graf, F. E., Palm, M., Warringer, J., & Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Development Research*, 80(1), 19–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21457>
- Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A., & Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: Innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1735), 20160424. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>
- Koraimann, G., & Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 54. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00054>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

- Li, W., & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *Environmental Research*, 212, 113267.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nabadda, S., Kakooza, F., Kiggundu, R., Walwema, R., Bazira, J., Mayito, J., Mugerwa, I., Sekamatte, M., Kambugu, A., Lamorde, M., Kajumbula, H., & Mwebasa, H. (2021). Implementation of the World Health Organization Global Antimicrobial Resistance Surveillance System in Uganda, 2015-2020: Mixed-Methods Study Using National Surveillance Data. *JMIR Public Health and Surveillance*, 7(10), e29954.
<https://doi.org/10.2196/29954>
- Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., González Bardanca, M., Ambroa, A., López, M., Bou, G., & Tomás, M. (2020). Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. *Antibiotics*, 9(2), 65.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020065>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 700–710. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>

- Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S., & Bolton, D. J. (2009). Assessment of horizontal gene transfer in Lactic acid bacteria – A comparison of mating techniques with a view to optimising conjugation conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.12.002>
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Violle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11(11), 1239. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- World Health Organization. (2020, July 31). *Antibiotic resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>