

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología



**Mecanismos de Comunicación Intercelular
en *Halomonas anticariensis***

Ali TAHRIQUI
Tesis Doctoral, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ali Tahrioui
D.L.: GR 346-2013
ISBN: 978-84-9028-366-0



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica

D. Ali TAHRIOUI para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2012

Vº Bº Las directoras

Fdo. **Dra. Emilia Quesada Arroquia**
Catedrática de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. **Dra. Inmaculada Llamas Company**
Profesora Titular de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

El Doctorando

Fdo. **Ali TAHRIOUI**

La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada por las ayudas de los siguientes proyectos de investigación:

Título del proyecto: **Construcción de biosensores para el análisis de sistemas quorum sensing en bacterias de interés sanitario y/o biotecnológico.**

Entidad financiadora: Junta de Andalucía, Proyectos de Excelencia. P07-CVI-03150 (2007-2011).

Investigador principal: Dra. Emilia Quesada Arroquia.

Título del proyecto: **Nueva estrategia para controlar las enfermedades infecciosas en criaderos de moluscos. Quorum Sensing y Quorum Quenching.**

Entidad financiadora: CICYT; AGL2009-07656 (2010-2012).

Investigador principal: Dra. Inmaculada Llamas Company.

Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, el doctorando ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Junta de Andalucía (2008-2012).

Parte de los resultados de esta Tesis se obtuvieron gracias a las estancias realizadas por el doctorando en el departamento de Biotecnología Agraria de la Universidad de Florencia (Italia), bajo la dirección del Dr. Carlo Viti, así como en el grupo de Bacteriología ubicado en el Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (Italia) bajo la dirección del Dr. Vittorio Venturi.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

PUBLICACIONES

Ali Tahrioui, Emilia Quesada & Inmaculada Llamas (2011). The *hanR/hanI* quorum sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology*, 157: 3378-3387.

Ali Tahrioui, Emilia Quesada & Inmaculada Llamas (2012). Genetic and phenotypic analysis of the *GacS/GacA* system in *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology* (en revisión).

Ali Tahrioui, Melanie schwab, Emilia Quesada & Inmaculada Llamas (2012). Diversity and detection of quorum sensing in the family *Halomonadaceae*. (en preparación para ser enviado a la revista *life* en su número especial "Extremophiles and Extreme Environments").

Marta Torres, Manuel Romero, Susana Prado, Javier Dubert, Ali Tahrioui, Ana Otero & Inmaculada Llamas (2012). *N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from bivalve larval cultures in hatchery*. *Marine Biotechnology* (en revisión).

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. Descripción de genes implicados en la producción de AHLs en *Halomonas anticariensis* FP35^T, una bacteria halófila de interés industrial. VI Reunión del grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM. Barcelona, 2008.

Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. Sistemas quorum sensing en bacterias halófilas y su uso biotecnológico. VI Reunión del grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM. Barcelona, 2008.

Ali Tahrioui, Sara Rosa, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. Sistemas de regulación tipo *gacA/gacS* y *luxI/luxR* en *Halomonas anticariensis* FP35^T. VII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Cádiz, 2008.

Ali Tahrioui, Sebastian García, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. **Caracterización del locus *hanR/hanI* en *Halomonas anticariensis* FP35^T**. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Almería, 2009.

Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. **The HanRI quorum sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium**. X Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Girona, 2010.

Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. **Regulación del operón *hanR/hanI* responsable de la síntesis de AHLs en *Halomonas anticariensis* FP35^T**. VII Reunión del grupo de Microbiología Molecular de la SEM. Barcelona, 2010.

Marta Torres, Susana Prado, Manuel Romero, Javier Dubert, Ana Otero, Ali Tahrioui e Inmaculada Llamas. **El ambiente marino como fuente de bacterias con actividad quorum quenching sobre microorganismos patógenos de peces y moluscos**. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Salamanca, 2011.

Ali Tahrioui, Inmaculada Llamas y Emilia Quesada (2012). **Genetic and phenotypic analysis of a two-component regulatory system in the moderately halophilic bacterium *Halomonas anticariensis***. 9th International Congress on Extremophiles. Sevilla, 2012.

Melanie Schwab, Ali Tahrioui, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. **Quorum sensing in the family *Halomonadaceae***. 9th International Congress on Extremophiles. Sevilla, 2012.

Marta Torres, Susana Prado, Javier Dubert, Ali Tahrioui, Manuel Romero, Emilia Quesada e Inmaculada Llamas. **Interference in the quorum-sensing system of pathogenic vibrios for fish and molluscs**. 9th International Congress on Extremophiles. Sevilla, 2012.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. SISTEMA QUORUM SENSING.....	3
1.1. Historia: la autoinducción pasó a ser quorum sensing.....	3
1.2. Tipos de autoinductores y circuito quorum sensing clásico.....	5
1.3. Sistemas quorum sensing mediados por las moléculas AHLs.....	7
1.4. Sistemas quorum sensing múltiples.....	13
1.5. El sistema quorum sensing como parte de una red de regulación bacteriana global ...	15
1.6. Identificación de los sistemas quorum sensing: uso de cepas biosensoras.....	17
1.7. Importancia del estudio de los sistemas quorum sensing.....	19
2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS.....	20
2.1. Ambientes hipersalinos y clasificación de los microorganismos halófilos.....	20
2.2. Diversidad filogenética y metabólica de los microorganismos halófilos.....	21
2.3. Adaptación de los microorganismos halófilos al estrés salino.....	24
2.4. Genética de los microorganismos halófilos.....	25
2.5. Biotecnología de los microorganismos halófilos.....	27
3. QUORUM SENSING EN EL GÉNERO <i>HALOMONAS</i>	28
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
1. PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	37
1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	37
1.2. Técnicas básicas de biología molecular.....	39
1.3. Ensayos de expresión génica mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa.....	51
1.4. Determinación de la actividad promotora.....	52
1.5. Construcción de una librería genómica de promotores.....	53
2. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE MOLÉCULAS AHLs.....	54
2.1. Extracción y concentración de las AHLs.....	54
2.2. Detección y caracterización de las AHLs.....	55
2.3. Cuantificación de las AHLs.....	57
3. CONSTRUCCIÓN Y COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES.....	57
3.1. Mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5km2 en <i>Halomonas anticariensis</i>	57
3.2. Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.....	58
3.3. Obtención de mutantes por recombinación homóloga simple.....	59
3.4. Complementación de los mutantes.....	59
4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES.....	60
4.1. Pruebas fenotípicas.....	60

4.2. Extracción y purificación del material extracelular.....	64
4.3. Estudio de formación del biofilm	65
4.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
Capítulo I.	69
Caracterización del sistema quorum sensing <i>hanR/hanI</i> en <i>Halomonas anticariensis</i> FP35^T	69
RESUMEN.....	70
ABSTRACT	70
RESULTADOS.....	71
1. Aislamiento y caracterización de mutantes deficientes en la producción de AHLs	71
2. Secuenciación del locus quorum sensing <i>hanR/hanI</i> homólogo a <i>luxR/luxI</i>	72
2.1. Clonación y secuenciación de las regiones adyacentes al transposón mini-Tn5Km2 en el mutante FP35-111.....	72
2.2. Análisis bioinformático de la secuencia del locus quorum sensing <i>hanR/hanI</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	77
3. Análisis transcripcional del sistema quorum sensing <i>hanR/hanI</i> de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	81
3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>hanR/hanI</i>	81
3.2. Análisis de la región promotora del locus <i>hanR/hanI</i>	81
3.3. Análisis de la expresión de los genes quorum sensing <i>hanR/hanI</i> en función de la densidad celular	82
4. Función del gen <i>hanI</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	83
4.1. Inactivación y complementación del gen <i>hanI</i>	83
4.2. Regulación de la expresión del gen <i>hanI</i>	84
5. Función del gen <i>hanR</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	86
5.1. Inactivación del gen <i>hanR</i>	86
5.2. Análisis de la regulación transcripcional del gen <i>hanR</i>	87
DISCUSIÓN	89
MATERIAL SUPLEMENTARIO	93
Capítulo II.....	95
Control del sistema quorum sensing <i>hanR/hanI</i> mediante el sistema regulador de dos componentes <i>gacS/gacA</i> en <i>Halomonas anticariensis</i> FP35^T	95
RESUMEN.....	96
ABSTRACT	96
RESULTADOS.....	97
1. Aislamiento de los mutantes FP35-48XII y FP35-79X deficientes en la producción de AHLs	97
2. Análisis de las secuencias de los genes afectados por la inserción del transposón en los mutantes FP35-48XII y FP35-79X	98
2.1. Localización del transposón miniTn.5 en el mutante FP35-48XII	98
2.2. Localización del transposón miniTn5Km2 en el mutante FP35-79X	104
2.3. Análisis filogenético del sistema GacS/GacA de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	108

3. Análisis de la regulación de la producción de AHLs por el sistema GacS/GacA.	108
3.1. Obtención de mutantes afectados en los genes <i>gacS</i> y <i>gacA</i> y complementación..	108
3.2. Regulación de la expresión de los genes <i>hanR/hanI</i> mediante el sistema <i>gacS/gacA</i>	
.....	111
DISCUSIÓN	112
MATERIAL SUPLEMENTARIO	115
Capítulo III.....	119
Estudio del papel de la comunicación intercelular en <i>Halomonas anticariensis</i> FP35^T	119
RESUMEN.....	120
ABSTRACT	120
RESULTADOS.....	121
1. Estudio de los fenotipos controlados por el sistema regulador de dos componentes	
GacS/GacA	121
1.1. Tolerancia al estrés osmótico de los mutantes <i>gacS/gacA</i>	121
1.2. Análisis de la producción de enzimas hidrolíticas en los mutantes <i>gacS/gacA</i>	122
1.3. Análisis de la producción de exopolisacáridos en los mutantes <i>gacS/gacA</i>	122
1.4. Formación del biofilm en los mutantes <i>gacS/gacA</i>	124
1.5. Análisis de la movilidad en los mutantes <i>gacS/gacA</i>	125
2. Estudio de los fenotipos controlados por el sistema quorum sensing HanR/HanI.....	125
2.1. Análisis de la tolerancia al estrés osmótico, la producción de enzimas hidrolíticas, la	
producción de exopolisacáridos, formación del biofilm y la movilidad	125
2.2. Microarray fenotípico	127
2.3. Inducción de la transcripción de los genes controlados por el sistema quorum sensing	
en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	132
DISCUSIÓN	133
MATERIAL SUPLEMENTARIO	139
Capítulo IV.	159
Detección de sistemas quorum sensing en la familia <i>Halomonadaceae</i>	159
RESUMEN.....	160
ABSTRACT	160
RESULTADOS.....	161
1. Detección de moléculas señal quorum sensing en especies de la familia <i>Halomonadaceae</i>	
.....	161
2. Caracterización de las moléculas señal producidas por las especies de la familia	
<i>Halomonadaceae</i>	164
3. Distribución del gen sintasa de las AHLs en las especies de la familia <i>Halomonadaceae</i>	
.....	166
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	171
BIBLIOGRAFÍA	175

ANEXOS	191
1. Composición de los medios de cultivo	193
2. Soluciones.....	194
3. Preparación de células competentes.....	196
4. Secuencias	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de sistemas QS en bacterias Gram negativas.	8
Tabla 2. Algunos ejemplos de los fenotipos controlados por sistemas QS.	12
Tabla 3. Ejemplo de bacterias que contienen sistemas QS múltiples	14
Tabla 4. Tipos de metabolismos microbianos que funcionan a altas concentraciones de NaCl encontrados en los microorganismos halófilos.	24
Tabla 5. Ejemplo de algunos genes caracterizados en especies de la familia <i>Halomonadaceae</i>	26
Tabla 6. Cepas bacterianas de colección.	37
Tabla 7. Plásmidos utilizados en este trabajo.	46
Tabla 8. Características de las cepas biosensoras utilizadas en este trabajo.	55
Tabla 9. Descripción de los ORFs identificados.	78
Tabla 10. Homólogos de HanR en distintas especies bacterianas.	78
Tabla 11. Homólogos de HanI en distintas especies bacterianas.	80
Tabla 12. Actividad β -galactosidasa de las regiones corriente arriba de los genes <i>hanR</i> y <i>hanI</i>	82
Tabla 13. Comparación de una posible secuencia "caja <i>lux</i> " corriente arriba del gen <i>hanR</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T con la secuencia consenso "caja <i>lux</i> " y" otras secuencias de "caja <i>lux</i> " conocidas.	87
Tabla S1. Listado de cepas bacterianas y plásmidos construidos en este trabajo.	93
Tabla S2. Secuencia de los cebadores sintéticos.	94
Tabla 14. Descripción de los ORFs encontrados en el fragmento analizado en el mutante FP35-48XII. ...	101
Tabla 15. Descripción de los ORFs encontrados en el fragmento analizado en el mutante FP35-79X.	105
Tabla S3. Listado de cepas bacterianas y plásmidos construidos en este trabajo.	115
Tabla S4. Secuencia de los cebadores sintéticos.	116
Tabla 16. Cuantificación de la producción de EPS en la cepa FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i> y sus mutantes derivados FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i>	123
Tabla 17. Resultados del microarray fenotípico de las rutas metabólicas (PM01-PM10) para el mutante FP35 <i>hanI</i> de <i>H. anticariensis</i>	129
Tabla 18. Resultados de la susceptibilidad del mutante FP35 <i>hanI</i> de <i>H. anticariensis</i> a diferentes compuestos químicos (PM11-PM20).	131
Tabla 19. Expresión diferencial relativa de los clones candidatos en respuesta a AHLs.	133
Tabla 20. Activación de las cepas biosensoras por las especies de la familia <i>Halomonadaceae</i>	162
Tabla 21. Caracterización de AHLs en los miembros de la familia <i>Halomonadaceae</i> mediante TLC empleando el biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4).	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funcionamiento del sistema QS en <i>A. fischeri</i>	4
Figura 2. Ejemplo de las estructuras de algunos representantes de las moléculas señal de QS.....	6
Figura 3. Esquema del sistema clásico QS (González y Keshavan, 2006).	7
Figura 4. AHLs producidas por diferentes bacterias Gram negativas.	9
Figura 5. Esquema de la reacción de síntesis de las AHLs y de un polipeptido tipo LuxI	9
Figura 6. Esquema de la arquitectura modular de un regulador transcripcional tipo LuxR.	11
Figura 7. Cascada del sistema de regulación QS.....	12
Figura 8. Integración del sistema QS en la regulación global	15
Figura 9. Esquema básico de la transducción de señal en los sistemas reguladores de dos componentes ..	16
Figura 10. Construcción y uso de una bacteria biosensora	18
Figura 11. Ejemplos de diversos ambientes hipersalinos.....	20
Figura 12. Árbol filogenético de la vida y distribución de algunos de los microorganismos halófilos	22
Figura 13. AHLs producidas por <i>Halomonas anticariensis</i> FP35 ^T	28
Figura 14. Microfotografía electrónica de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	29
Figura 15. Fotografía del crecimiento de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T en medio sólido.....	29
Figura 16. Esquema de la estrategia seguida para la amplificación de secuencias desconocidas mediante PCR inversa.....	46
Figura 17. Estrategia utilizada para la construcción de los mutantes por recombinación homóloga simple.	59
Figura 18. Esquema de las etapas experimentales de la técnica del microarray fenotípico.....	63
Figura 19. Proceso de extracción del EPS.....	64
Figura 20. Obtención de mutantes deficientes en la producción de AHLs.....	72
Figura 21. Análisis de restricción para localizar la inserción del transposón mini-Tn5Km2 en el transconjugante <i>H. anticariensis</i> FP35-111.....	73
Figura 22. Mapa de restricción del plásmido recombinante pP111.	73
Figura 23. PCR-inversa A. Amplificación de un fragmento <i>Bam</i> HI corriente arriba de la secuencia conocida	74
Figura 24. Estrategia de secuenciación del locus QS de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	75
Figura 25. Secuencia de nucleótidos correspondientes a los insertos de los plásmidos recombinantes pP111 y pBFP35	77
Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína HanR.....	79
Figura 27. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína HanI	80
Figura 28. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes <i>hanR/hanI</i>	81
Figura 29. Secuencia de ADN de la región promotora situada corriente arriba de los genes <i>hanR</i> y <i>hanI</i> /82	
Figura 30. Análisis mediante TLC de la producción de AHLs en el mutante FP35 <i>hanI</i> de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	83
Figura 31. Análisis de la expresión del gen sintasa <i>hanI</i> mediante la medida de la actividad β -galactosidasa en <i>E. coli</i> (pMP- <i>phanI</i> , pJN-HanI)	85
Figura 32. Análisis de la expresión del gen sintasa <i>hanI</i> mediante la medida de la actividad β -galactosidasa en <i>H. anticariensis</i>	85

Figura 33. Análisis mediante TLC de la producción de AHLs en los mutantes <i>hanR</i> de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	86
Figura 34. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen sintasa <i>hanI</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T y en los mutantes FP35-111 y FP35 <i>hanR</i>	87
Figura 35. Expresión del promotor <i>hanR</i> en <i>E. coli</i> (pMP- <i>phanR</i> y pJN-HanR) mediante la adición de diferentes moléculas señal AHLs	88
Figura 36. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen <i>hanR</i> en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T y en el mutante FP35 <i>hanI</i> en ausencia y presencia de extractos AHLs	89
Figura 37. Producción de AHLs en las cepas FP35 ^T , FP35-48XII y FP35-79X de <i>H. anticariensis</i>	98
Figura 38. PCR-inversa 48A. Amplificación de un fragmento <i>PstI</i> corriente abajo de la secuencia conocida	99
Figura 39. PCR-inversa 48B. Amplificación de un fragmento <i>EcoRI</i> corriente abajo de la secuencia conocida	100
Figura 40. Organización genética de la region cromosómica del mutante FP35-48XII que contiene el transposón miniTn5Km2	101
Figura 41. Secuencia del gen <i>gacS</i>	103
Figura 42. Esquema que muestra la arquitectura modular de la proteína HK-GacS.....	104
Figura 43. Organización genética de la región cromosómica del mutante FP35-79X que contiene el transposón mini-Tn5Km2	104
Figura 44. Producción de AHLs en las cepas mutantes de <i>H. anticariensis</i> , FP35 <i>uvrC</i> y FP35-79X.....	106
Figura 45. Secuencia completa del gen <i>gacA</i> y secuencia parcial correspondiente al gen <i>uvrC</i>	107
Figura 46. Esquema que muestra la arquitectura modular de la proteína RR-GacA.....	107
Figura 47. Árboles filogenéticos resultantes del alineamiento de las secuencias de las proteínas HH-GacS (a) y RR- GacA (b).....	108
Figura 48. (a) Construcción del mutante FP35 <i>gacA</i> de <i>H. anticariensis</i> por reemplazamiento alélico. (b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) correspondiente a la comprobación de la inserción del casete km en el mutante FP35 <i>gacA</i>	109
Figura 49. Efecto del sistema regulador de dos componentes GacS/GacA sobre la producción de AHLs en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	110
Figura 50. Producción de AHLs en la cepa silvestre FP35 ^T , los mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i> y los complementados FP35 <i>gacS</i> (pJN-GacS) y FP35 <i>gacA</i> (pJN-GacA) de <i>H. anticariensis</i>	111
Figura 51. Expresión de los genes <i>hanR/hanI</i> mediante ensayos RT-PCR en los mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i> y en la cepa silvestre FP35 ^T	111
Figura 52. Crecimiento de cultivos bacterianos de la cepa FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i> y sus mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i> en medio sólido MY a diferentes concentraciones de sales (% p/v). (a) 0,5 (b) 2 (c) 5 (d) 7,5 (e) 10 (f) 12,5 y (g) 15 tras la incubación durante 5 días a 32°C.....	122
Figura 53. Fotografía del crecimiento de <i>Halomonas anticariensis</i> FP35 ^T (a) y sus mutantes FP35 <i>gacS</i> (b) y FP35 <i>gacA</i> (c).....	122
Figura 54. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa silvestre <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T (a) y sus mutantes FP35 <i>gacS</i> (b) y FP35 <i>gacA</i> (c).....	123
Figura 55. Aspecto mucoso del crecimiento de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T , sus mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i> y sus complementados FP35 <i>gacS</i> (pJN-GacS) y FP35 <i>gacA</i> (pJN-GacA).....	124

Figura 56. Formación del biofilm por la cepa FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i> , los mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i> y sus complementados FP35 <i>gacS</i> (pJN-GacS) y FP35 <i>gacA</i> (pJN-GacA) en medio líquido MY 7,5% (p/v) de sales	124
Figura 57. Estudio de la movilidad en la cepa FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i> y sus mutantes FP35 <i>gacS</i> y FP35 <i>gacA</i>	125
Figura 58. Estudio fenotípico de la cepa silvestre FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i> y sus mutantes FP35 <i>hanR</i> y FP35 <i>hanI</i>	126
Figura 59. Resultados de la comparación de la cepa mutante FP35 <i>hanI</i> con la cepa silvestre FP35 ^T mediante análisis microarray fenotípico. Los datos cinéticos fueron recogidos mediante el programa Omnilog	127
Figura S1. Resultados y claves de la comparación del microarray fenotípico (PM01-PM20) de la cepa mutante FP35 <i>hanI</i> y la cepa silvestre FP35 ^T de <i>H. anticariensis</i>	158
Figura 60. Análisis TLC de las AHLs producidas por las 42 especies de la familia <i>Halomonadaceae</i>	164
Figura 61. Distribución del gen sintasa en los miembros de la familia <i>Halomonadaceae</i> con respecto a su distribución taxonómica	167
Figura 62. Árbol filogenético basado en un fragmento del gen <i>luxI</i> , obtenido mediante el método Neighbour-Joining	168

ABREVIATURAS

A:	adenina
aa:	aminoácidos
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
AHL:	<i>N</i> -acil homoserín lactona
Ap ^R :	fenotipo de resistencia a ampicilina
ARN:	ácido ribonucleico
ARNasa:	ribonucleasa
ARNm:	ARN mensajero
ATP:	adenosín trifosfato
c.s.p:	cantidad suficiente para
C:	citocina
col.:	colaboradores
DDBJ:	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
D.O _{600nm} :	densidad óptica a 600nm
DEPC:	dietil pirocarbonato
dNTPs:	desoxinucleótidos trifosfato
dUTP:	desoxiuridín trifosfato
ed.:	editor
EDTA:	ácido etilén-diamino-tetraacético
EE.UU:	Estados unidos
EMBL:	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EPS:	exopolisacárido
g:	gramo
G:	guanina
G+C:	contenido en guanina + citosina
Gm ^R :	fenotipo de resistencia a gentamicina
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
HSL:	homoserín lactona
IJSEM:	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
Km ^R :	fenotipo de resistencia a kanamicina
l:	litro
M:	molar
mg:	miligramo
min:	minuto
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mM:	milimolar
ng:	nanogramo
nm:	nanómetro
°C:	grados centígrados
ONPG:	orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORF:	marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
Ori:	origen de replicación

p/v:	relación peso/volumen
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
QS:	quorum sensing
r.p.m.:	revoluciones por minuto
Rf ^R :	fenotipo de resistencia a rifampicina
SDS:	dodecil sulfato sódico
Sp.:	especie
Sp ^R :	fenotipo de resistencia a estreptomicina
SSC:	solución salina citrada
T:	timina
T ^a :	temperatura
TAE:	tris acetato EDTA
TBE:	tris borato EDTA
Tc ^R :	fenotipo de resistencia a tetraciclina
TCS:	sistema regulador de dos componentes (del inglés <i>Two component System</i>)
TE:	tampón TrisHCl-EDTA
TLC:	cromatografía en capa fina (del inglés <i>Thin Layer Chromatography</i>)
T _m :	temperatura de desnaturalización
Tn:	transposón
TSA:	agar tripticasa soja (del inglés <i>Tryptone Soy Agar</i>)
μg:	microgramo
μl:	microlitro
μM:	micromolar
UV:	ultravioleta
v/v:	relación volumen/volumen
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Tabla de aminoácidos

Aminoácidos	Abreviación	
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Colecciones de cultivo

ATCC:

American Type Culture Collection

CECT:

Colección Española de Cultivos Tipo

DSM (también DSMZ):

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

RESUMEN

Halomonas anticariensis FP35^T es una gammaproteobacteria perteneciente a la familia *Halomonadaceae* que fue aislada de suelos salinos de la Laguna de Fuente de Piedra, situada en Antequera (Málaga). En esta bacteria halófila moderada se describió por primera vez en 2004 la producción de moléculas señal *N*-acil homoserín lactonas (AHLs) típicas de los sistemas quorum sensing (QS). En el presente trabajo se ha caracterizado dicho sistema a nivel genético y está compuesto por genes homólogos a los del tipo *luxR/luxI*: el gen *hanR* (regulador transcripcional) y el gen *hanI* (sintasa de AHLs). Los genes QS *hanR/hanI* en *H. anticariensis* FP35^T forman parte de un único operón cuya transcripción es dependiente de la densidad celular. El análisis transcripcional de ambos genes indicó que se transcriben a partir de sus propios promotores y de forma independiente de las moléculas señal AHLs lo que sugirió que dicho sistema QS no estaba autorregulado a diferencia del sistema de regulación clásico. La producción de AHLs y la expresión de los genes QS *hanR/hanI* en *H. anticariensis* RP35^T están regulados de forma positiva por un sistema regulador global de dos componentes (TCS) compuesto por una proteína histidina quinasa híbrida (HK-GacS) y un regulador de respuesta (RR-GacA). Este sistema también controla la producción del exopolisacárido (EPS), la movilidad y la formación del biofilm, aunque el control de estos fenotipos no tiene lugar a través de las moléculas señal AHLs del sistema QS *hanR/hanI*. Mediante la tecnología del microarray fenotípico se ha puesto de manifiesto que el sistema QS mediado por las AHLs interviene de forma directa o indirecta en el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno y fosfato posiblemente a través del control de los sistemas de transporte, y con ello se afecta la resistencia o sensibilidad hacia ciertos compuestos químicos. En definitiva este trabajo representa un primer estudio de los mecanismos de comunicación intercelular en *H. anticariensis* FP35^T y los fenotipos asociados que posiblemente reflejan su papel en la adaptación al medio ambiente. Por otra parte, mediante el análisis de la producción de moléculas señal tipo AHLs en 42 especies de la familia *Halomonadaceae* se ha demostrado que este tipo de comunicación se encuentra ampliamente distribuida en dicho grupo bacteriano en el que existe una diversidad de AHLs producidas entre los diferentes géneros e incluso entre las diferentes especies.

ABSTRACT

Halomonas anticariensis FP35^T is a gammaproteobacterium belonging to the *Halomonadaceae* family, which was isolated from soil samples taken from Fuente de Piedra, a saline wetland in the province of Málaga (Spain). This halophilic bacterium has been reported to produce *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), signal molecules in quorum-sensing (QS) systems. We have characterized this system at the genetic level and found that it is composed of *luxR/luxI* homologues: *hanR*, believed to be the transcriptional regulator gene, and *hanI*, the autoinducer synthase gene. The *hanR* and *hanI* genes are on the same transcript and their transcription is growth-phase dependent. Moreover, both genes appear to be transcribed from their own promoters and their expression does not depend upon AHL signalling molecules, which suggests that classical self-regulation does not take place in our strain in the same way as has been described in other bacteria. AHL production and QS *hanR* and *hanI* genes in *H. anticariensis* are positively regulated by a two-component system composed of a multisensory, hybrid, histidine kinase (HK-GacS) and a response regulator (RR-GacA). This system also controls exopolysaccharide production, motility and biofilm formation. It would seem however that this regulation does not take place via the QS HanR/HanI system. Microarray phenotype analysis indicates that in *H. anticariensis* AHL QS molecules seem to exert either a direct or indirect influence upon carbohydrate, nitrogen and phosphate metabolism, and also resistance or susceptibility to some antibiotics, toxic anions and cations and other inhibitor compounds, presumably by altering the expression of the genes involved in transport systems. In summary, I describe here an analysis of the intercellular communication mechanisms in *H. anticariensis* as well as the phenotypes controlled by them, which probably reflect their role in their adaptation to their environment. An analysis of 42 species belonging to the *Halomonadaceae* family designed to detect AHL signal molecules showed that the AHL-QS system is widespread within them and provided evidence for diversity in the AHLs produced by different genera and even different species.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten percibir y responder a las condiciones ambientales, que incluyen estímulos clásicos como los cambios de temperatura o los valores de pH, presión y oxígeno, las variaciones en la concentración salina del medio externo, la presencia de sustancias químicas tóxicas, las variaciones en la disponibilidad de nutrientes, la desecación o el exceso del agua, entre otros. El estudio de los mecanismos de detección de estos cambios, denominados genéricamente mecanismos de transducción de señales, constituye uno de los campos más activos de la investigación en Microbiología. A principios de la década de 1990 se puso de manifiesto que las bacterias al igual que las células eucariotas producen y responden a señales extracelulares producidas por otras bacterias. Estos mecanismos de comunicación intercelular permiten a las bacterias desarrollar comportamientos cooperativos, lo que ha cambiado totalmente nuestro concepto del mundo bacteriano, descubriéndose como una red mucho más compleja de lo imaginado hasta ahora.

1. SISTEMA QUORUM SENSING

Quorum sensing (QS) es un término utilizado para describir la modalidad de comunicación intercelular bacteriana que permite la expresión de los genes en respuesta a la densidad celular (Williams, 2007; Diggle y col., 2007; Ng y Bassler, 2009). Este fenómeno se basa en la acumulación de moléculas señal o autoinductores en el medio extracelular que, al alcanzar un valor crítico, controlan la expresión de numerosos genes y en consecuencia responden de forma coordinada a los cambios del medioambiente (Fuqua y col., 1994).

1.1. Historia: la autoinducción pasó a ser quorum sensing

El descubrimiento de la comunicación bacteriana tuvo lugar en el año 1970 cuando J. W. Hastings abordó el estudio de una luciferasa en *Aliivibrio fischeri* (bacteria que antiguamente se denominaba *Vibrio fischeri*) (Urbanczyk y col., 2007). La luciferasa es una proteína que genera luz en este microorganismo. *A. fischeri* es una bacteria marina Gram negativa que establece una relación de simbiosis con el calamar *Euprymna scolopes*, en el que coloniza sus órganos visuales y cuando alcanza alta densidad celular induce la expresión de los genes esenciales para la bioluminiscencia. En esta relación, el calamar utiliza la luz proporcionada por la bacteria para buscar presas y camuflarse de sus depredadores gracias a un fenómeno denominado contrailuminación (Visick y col., 2000). Por su parte, la bacteria se beneficia de la disponibilidad de nutrientes encontrados en el órgano del calamar.

Hastings estaba intrigado por el hecho de que la luciferasa se producía en gran cantidad en fase logarítmica tardía de crecimiento. Años más tarde puso de manifiesto que la síntesis de la luciferasa era debida a la presencia de un componente difusible que se acumulaba a la largo del crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo. A este compuesto le denominó "autoinductor" (Hastings y Nealson, 1977). El autoinductor producido por *A. fischeri* activaba la producción de la luciferasa cuando se alcanzaba una determinada densidad bacteriana. Por esta

razón se sugirió que *A. fischeri* utilizaba el sistema de autoinducción con el fin de detectar la alta densidad bacteriana que se alcanzaba en el órgano luminiscente. En aquel momento el modelo propuesto para la autoinducción, que significaba un sofisticado sistema de comunicación intercelular bacteriana, fue recibido con escepticismo por parte de la comunidad científica. Se tuvo que esperar hasta el año 1980 para conocer el funcionamiento en detalle del sistema de autoinducción.

Así, la estructura del autoinductor producido por *A. fischeri* fue resuelta en 1981 y se identificó como 3-oxo-hexanoil homoserín lactona (Eberhard y col., 1981), una molécula del tipo *N*-acil homoserín lactona. En 1984, Engebrecht y Silverman demostraron que la inducción de la expresión de la luciferasa necesitaba dos genes: *luxI* que codifica una proteína necesaria para la síntesis del autoinductor y *luxR* que codifica un regulador transcripcional que responde a la presencia del autoinductor.

Todos estos descubrimientos condujeron a un modelo cuyo esquema se presenta en la Figura 1. Cuando *A. fischeri* se encuentra en su modo de vida libre, LuxI produce constitutivamente un nivel basal de autoinductores que difunden en el medio marino. Cuando la bacteria entra en el espacio confinado que constituye el órgano luminoso del calamar, durante la asociación de simbiosis, los autoinductores se acumulan en el interior y alrededor de las células. Cuando se alcanzan los niveles umbrales de autoinductores, el regulador transcripcional LuxR se activa por unión con el autoinductor y el complejo formado induce la expresión del operón bi-direccional *lux*. La activación simultánea a ambos lados del operón permite tanto un incremento rápido en los niveles de autoinductores por la existencia de un sistema regulador retroalimentado de forma positiva, como la generación de luminiscencia (Eberhard y col., 1991; Fuqua y col., 1996).

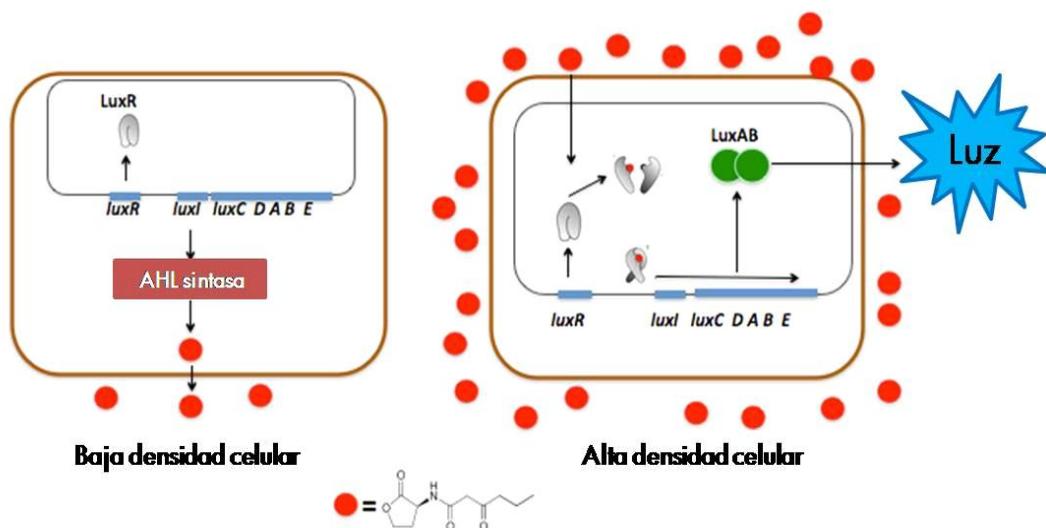


Figura 1. Funcionamiento del sistema QS en *A. fischeri*.

Durante muchos años se pensó que este mecanismo de regulación génica era único de ciertas especies marinas del género *Vibrio*. Sin embargo en los años noventa, y gracias a la disponibilidad de herramientas genéticas que permitían detectar los autoinductores presentes en los cultivos bacterianos, se demostró que los sistemas de comunicación bacteriana basados en las moléculas señal y en las proteínas LuxR/LuxI estaban extendidos en numerosas especies de bacterias Gram negativas y se propuso el concepto quorum sensing (QS) (Fuqua y col., 1994).

El sistema QS se ha detectado también en bacterias Gram positivas aunque en este caso los autoinductores identificados son diferentes. El sistema QS tradicionalmente se ha asociado a los microorganismos que viven en asociaciones de patogénesis o en simbiosis entre los que está muy extendido (de Kievit y Iglewski, 2000; Fuqua y col., 1994; Kleerebezem y col., 1997). Sin embargo a partir del año 2000 también ha sido detectado en microorganismos de vida libre, tales como bacterias marinas del género *Roseobacter* que viven formando agregados en el océano (Gram y col., 2002) y en la arquea haloalcalófila *Natronococcus occultus* que sintetiza una proteasa extracelular cuya producción está controlada por las moléculas señal de QS (Paggi y col., 2003).

1.2. Tipos de autoinductores y circuito quorum sensing clásico

En los últimos años se están identificando y caracterizando nuevos autoinductores en las bacterias, como son las moléculas del tipo furanosilboratodiéster, los oligopéptidos y las quinolonas, entre otras (Camilli y Bassler, 2006; González y Keshavan, 2006). La mayoría de los señalizadores de QS son moléculas orgánicas pequeñas (Figura 2) (Williams, 2007).

Las bacterias Gram negativas utilizan las moléculas *N*-acil homoserín lactonas (AHLs), ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos metil ésteres como el éster etílico del ácido hidroxipalmítico (PAME), así como los autoinductores tipo 2 (AI-2), un término utilizado para un grupo de furanonas. Por su parte, las bacterias Gram positivas producen también las AI-2, aunque en estos microorganismos es más frecuente la síntesis de péptidos cíclicos, lineares o modificados como los péptidos autoinductores (AIPs) producidos por los estafilococos. En el caso de los estreptomicetos las moléculas señal son del tipo γ -butirolactonas como el factor-A, que están relacionadas con las AHLs desde el punto de vista estructural dado que ambas pertenecen al grupo de los butanolidos.

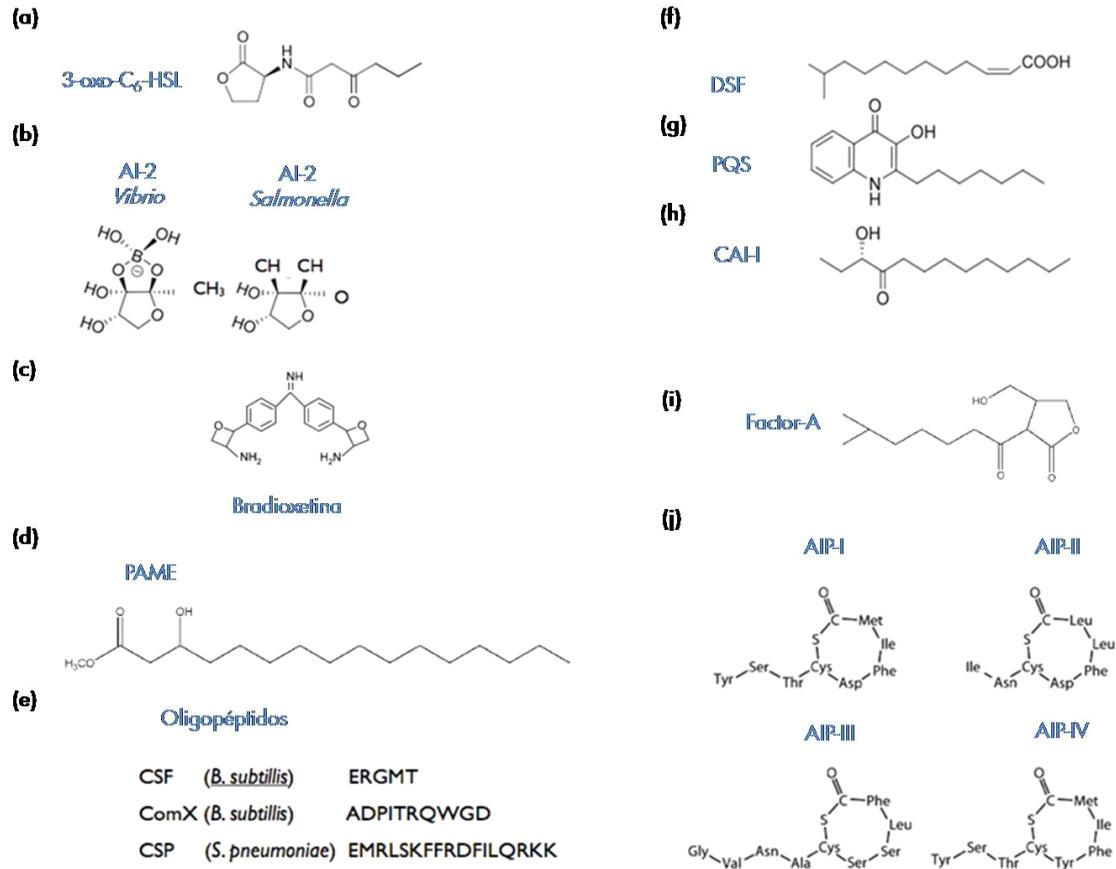


Figura 2. Ejemplo de las estructuras de algunos representantes de las moléculas señal de QS. (a) 3-oxo-C₆-HSL, *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserín lactona. (b) AI-2, autoinductores tipo 2. (c) bradiocastina. (d) 3OH-PAME, éster metil del ácido hidroxipalmitico. (e) secuencia de aminoácidos de 3 oligopéptidos producidos por bacterias Gram positivas. (f) DSF, ácido metildodecanoico. (g) PQS (del inglés *Pseudomonas* *Q*uinolone *S*ignal), 2-heptil-3-hidroxi-4 quinolona. (h) CAI-1, autoinductores-1 de *Vibrio cholerae*. (i) Factor-A, 2-isocapriolil-3-hidroximetil-γ-butirolactona. (j) AIPs, péptidos autoinductores de los estafilococos.

En el año 2007, Yim y sus colaboradores sugirieron que los metabolitos extracelulares de las bacterias, incluyendo los antibióticos, tienen el potencial de funcionar como moléculas señal. Sin embargo es muy importante diferenciar entre las verdaderas moléculas señal implicadas en la comunicación intercelular y otros metabolitos. Por ello, se establecieron cuatro criterios fundamentales que permiten clasificar una molécula como una señal de QS: (i) la molécula señal tiene que ser producida durante una etapa específica del crecimiento bajo ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a cambios ambientales; (ii) la molécula señal se tiene que acumular en el medio extracelular y ser detectada por un receptor específico; (iii) la molécula tiene que generar una respuesta concertada al alcanzar una concentración umbral y (iv) la respuesta tiene que ir más allá de los cambios fisiológicos necesarios para la producción o degradación de la molécula señal (Winzer y col., 2002).

Aunque existe una gran variedad de moléculas señal o autoinductores, las etapas fundamentales implicadas en la respuesta a las fluctuaciones en el número de células son parecidas en la mayoría de los sistemas QS. En un sistema canónico o clásico como el que existe en *A. fischeri* entre otros microorganismos, las moléculas autoinductoras se sintetizan dentro de la célula y luego son secretadas de forma pasiva o activa al medio extracelular. A medida que el número de células de la población aumenta, la concentración de los autoinductores crece. Cuando los autoinductores alcanzan la concentración umbral para su detección se unen a sus respectivos receptores y desencadenan las cascadas de transducción de señal que originan un cambio global de la expresión génica de la población (Figura 3).

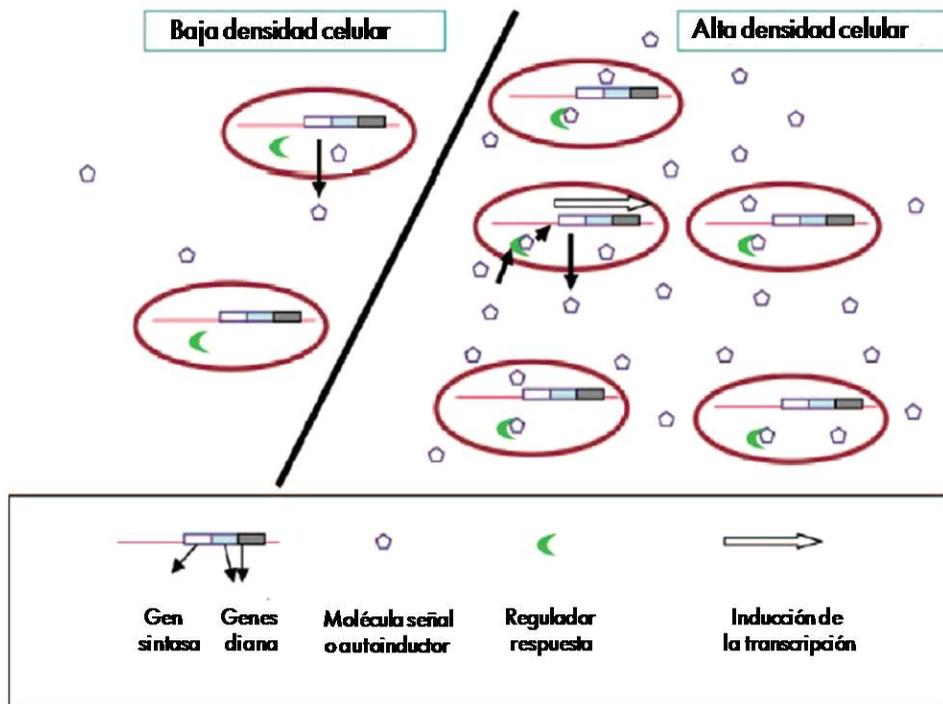


Figura 3. Esquema del sistema clásico QS (González y Keshavan, 2006).

1.3. Sistemas quorum sensing mediados por las moléculas AHLs

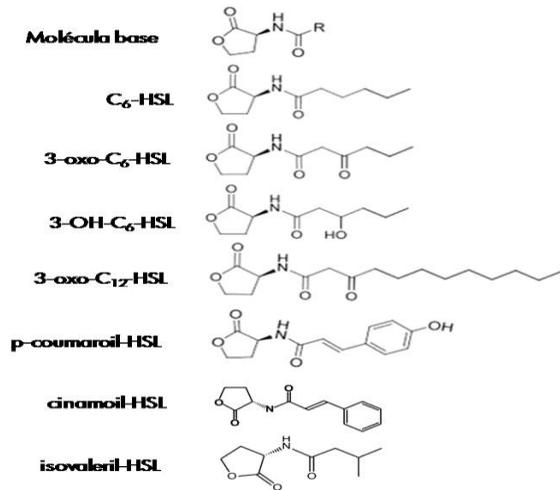
Los sistemas QS dependientes de la producción de moléculas señal tipo AHLs descritos en las bacterias Gram negativas se componen generalmente de dos genes, el gen sintasa de estas moléculas (*luxI* y sus homólogos) y el gen regulador de la transcripción (*luxR* y sus homólogos). En la mayoría de los microorganismos productores de AHLs, el gen que codifica el regulador transcripcional se encuentra adyacente al gen sintasa aunque se han descrito tres posibles variaciones en cuanto a la organización genética de estos dos genes: en tandem (unidireccional), convergente y divergente (Salmond y col., 1995). En la Tabla 1 se describen algunos ejemplos de microorganismos en los que se ha descrito este tipo de sistema QS y las moléculas AHLs.

Tabla 1. Ejemplos de sistemas QS en bacterias Gram negativas.

Organismo	Homólogos de LuxR/LuxI	Autoinductor	Referencias
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TarR/Tral	3-oxo-C ₈ -HSL	Piper y col., 1993
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	BjaR/Bjal	Isovaleril-HSL	Lindemann y col., 2011
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepR/Cepl	C ₈ -HSL	Lewenza y col., 1999
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviR/Cvil	C ₆ -HSL	McClellan y col., 1997
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpR/Expl	3-oxo-C ₆ -HSL	Pirhonen y col., 1993
	CarR/Carl	3-oxo-C ₆ -HSL	Bainton y col., 1992
<i>Pantoea ananatis</i>	EanR/EanI	3-oxo-C ₆ -HSL; C ₆ -HSL	Morohoshi y col., 2007
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaR/Esal	3-oxo-C ₆ -HSL	Von Bodman y col., 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR/LasI	3-oxo-C ₁₂ -HSL	Davies y col., 1998; Pearson y col., 1994
	RhlR/RhlI	C ₄ -HSL	Latifi y col., 1996; Pearson y col., 1995
	RhlR/RhlI	C ₆ -HSL; C ₇ -HSL; C ₈ -HSL	Rodelas y col., 1999
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	CinR/CinI	3OH-C _{14:1} -HSL	Lithgow y col., 2000
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerR/CerI	7- <i>cis</i> -C ₄ -HSL	Puskas y col., 1997
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	RpaR/RpaI	p-cumaroil-HSL	Schaefer y col., 2008
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrR/SwrI	C ₄ -HSL; C ₆ -HSL	Eberl y col., 1996

a) Variación estructural de las AHLs

La mayoría de los autoinductores caracterizados en bacterias Gram negativas son del tipo *N*-acil homoserín lactonas (AHLs). Estas moléculas están compuestas por un anillo lactónico (parte hidrofílica) y un ácido graso de cadena hidrocarbonada (parte hidrofóbica) que puede variar entre 4 y 18 átomos de carbono. Estos ácidos pueden ser saturados o monoinsaturados. Además, algunos de ellos presentan una sustitución en el carbono 3 que puede ser un grupo oxo o hidroxilo que proporcionan una variación y especificidad a los sistemas de comunicación QS en una población bacteriana mixta (Figura 4) (Fuqua y col., 1995; Fuqua y col., 2001; Hwang y col., 1995; González y Keshavan, 2006). Las AHLs, al ser moléculas anfipáticas, difunden libremente a través de la membrana celular pero esto se ha demostrado solamente en las AHLs de cadena hidrocarbonada corta (menos de 8 carbonos) (Kaplan y Greenberg, 1985); sin embargo las AHLs de cadena larga necesitan ser transportadas mediante bombas de flujo activo que les permitan pasar de la célula al medio y de éste al interior celular (Pearson y col., 1999; Kohler y col., 2001).



En los últimos años se han descubierto nuevas clases de moléculas señal del tipo AHL. La bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* produce *p*-cumaroil-HSL a partir del ácido *p*-cumárico presente en el medio ambiente (Schaefer y col., 2008). Una bacteria del género *Bradyrhizobium* produce una homoserín lactona parecida, cinamoil-HSL (Ahlgren y col., 2011). Así mismo *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, simbionte de la soja, sintetiza isovaleril-HSL (Figura 4) (Lindemann y col., 2011).

Figura 4. AHLs producidas por diferentes bacterias Gram negativas.

b) Síntesis de AHLs

Las proteínas sintasas de la familia LuxI catalizan en la mayoría de las bacterias la formación de un enlace amido entre una S-adenosilmetionina (SAM) y una acil-proteína transportadora de acilos (acil-ACP). El complejo SAM-acil es convertido en acil homoserín lactona (AHL) con la liberación de 5'-metiltioadenosina (MTA). Dicho de otra forma, las sintasas LuxI unen un grupo homoserín lactona derivado del metabolismo de los aminoácidos y una cadena acilo lateral derivada del metabolismo de los ácidos grasos, que son los componentes de la acil homoserín lactona resultante (Figura 5) (Hanzelka y Greenberg, 1996; Moré y col., 1996).

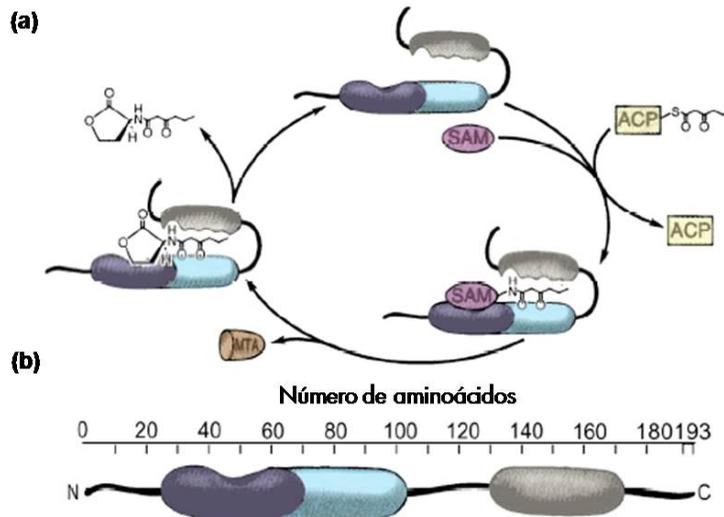


Figura 5. Esquema de la reacción de síntesis de las AHLs y estructura de un polipeptido tipo LuxI. (a) Modelo del mecanismo de síntesis de las AHLs por la enzima del tipo LuxI. (b) Esquema del polipeptido LuxI de *A. fischeri*. Los aminoácidos 25 hasta 104 forman el sitio activo para la formación del enlace amido (Greenberg, 1997).

La naturaleza de las AHLs sintetizadas por un microorganismo particular depende de los sustratos disponibles como es la cantidad de acil-ACP en la célula y de la especificidad de las sintasas. La mayoría de las sintasas LuxI aceptan diferentes acil-ACP, lo que permite la síntesis de diferentes AHLs. Por ejemplo, la sintasa YenI de *Yersinia pseudotuberculosis* sintetiza hasta veinticuatro AHLs diferentes (Ortori y col., 2007). Sin embargo las proteínas sintasas Rpal, Btal y Bjal de *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium* sp. y *Bradyrhizobium japonicum* respectivamente, descritas recientemente, parecen utilizar sustratos ligados al coenzima A (CoA) en lugar de acilo-ACP para la síntesis de nuevas AHLs (Ahlgren y col., 2011; Lindemann y col., 2011; Schaefer y col., 2008). Estos descubrimientos por tanto extienden el rango de posibilidades de nuevas moléculas señal AHLs de QS.

Las proteínas de la familia LuxI tienen entre 190 y 226 aminoácidos y se caracterizan por tener cuatro bloques conservados en la parte N-terminal que incluyen ocho residuos conservados (Hanzelka y col., 1997; Pappas y col., 2004; Parsek y col., 1997). Otra de las características estructurales de las proteínas LuxI es la cavidad del sitio catalítico y la presencia de una treonina en la posición 143. Cuando la cavidad es estrecha, la sintasa puede acomodar sólo sustratos con una cadena de ácidos grasos corta. Por ejemplo Esal de *Pantoea stewartii* sintetiza 3-oxo-C₆-HSL. Por el contrario, cuando la cavidad es elongada y forma un túnel, la sintasa no tiene restricciones estéricas para acomodar una cadena de ácidos grasos larga, como es el caso de LasI de *Pseudomonas aeruginosa*, que sintetiza 3-oxo-C₁₂-HSL (Gould y col., 2004; Watson y col., 2002).

En algunos casos se han descrito otras sintasas de moléculas señal AHLs como las pertenecientes a la familia LuxM/AinS, que se han encontrado en el género *Vibrio*, con una composición de aminoácidos distinta a las proteínas LuxI pero análogas en cuanto a su función. Las sintasas LuxM utilizan los mismos sustratos que las sintasas LuxI aunque sustituyen las acil-ACP por las acil coenzima A (acil-CoA) (Hanzelka y col., 1999; Milton y col., 2001). Otra potencial AHL sintasa es la HdtS, identificada por Laue y colaboradores (2001) en *Pseudomonas fluorescens*.

c) Percepción de las AHLs: Reguladores transcripcionales de la familia de proteínas LuxR

La percepción de las moléculas AHLs es mediada por un regulador transcripcional que generalmente pertenece a la familia LuxR. Sin embargo en algunos casos puede ser una proteína sensora histidina quinasa, de tal forma que su activación desencadena una cascada de reacciones de fosforilación que induce la transcripción de genes diana (Milton, 2006). A pesar de su baja similitud, todas las proteínas homólogas LuxR poseen varios aminoácidos conservados (Whitehead y col., 2001) y una arquitectura idéntica (Figura 6): un dominio N-terminal de interacción con las AHLs, un dominio C-terminal con un motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN y la parte central de la proteína que permite la oligomerización (Fuqua y Greenberg, 2002; Stevens y Greenberg, 1997; Zhu y Winans, 1999). Estudios bioquímicos han demostrado que

existen nueve residuos idénticos en al menos el 95% de las proteínas LuxR, seis de ellos se localizan en la parte N-terminal de unión a las AHLs, mientras que los otros tres se sitúan en la parte C-terminal, en el motivo de unión al ADN (Figura 6) (Fuqua y col., 2001; Nasser y Reverchon, 2007).

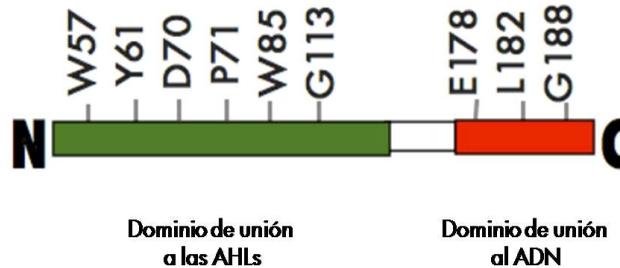


Figura 6. Esquema de la arquitectura modular de un regulador transcripcional tipo LuxR.

Los estudios de análisis de estructura-función realizados hasta el momento en las proteínas LuxR sugieren que el dominio de unión al ADN está altamente conservado mientras que el dominio de unión de las AHLs tiende a variar y esto condiciona el tipo de moléculas que se les puede unir (Schuster y col., 2004a; Urbanowski y col., 2004; Vanniniy col., 2002).

Un estudio filogenético de los reguladores transcripcionales del tipo LuxR ha permitido identificar dos grupos filogenéticamente distintos. Los reguladores del grupo A que pertenecen a proteobacterias de las clases alfa, beta y gamma, y el grupo B restringido a las gamma-proteobacterias (Lerat y Moran, 2004).

d) Mecanismo de acción del sistema quorum sensing tipo LuxR/LuxI

Como en un sistema QS clásico, la síntesis de moléculas señal del tipo AHLs depende de la proteína sintasa y comienza a bajas densidades celulares. La mayoría de las AHLs pasan a través de la membrana celular mediante difusión, por lo que a medida que aumenta la densidad celular, se acumulan estas moléculas en el interior y alrededor de las células. Cuando se alcanzan los niveles umbrales de AHLs, el regulador transcripcional tipo LuxR, que posee un dominio de unión a dichas moléculas, forma el complejo LuxR-AHL que se activa y por su dominio C-terminal se une a secuencias consenso en el ADN conocidas como cajas "/ux". Son secuencias palindrómicas de 18 a 22pb localizadas a -40 hasta -80pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (Egland y Greenberg, 1999). Una vez que LuxR se ha unido a la caja "/ux", se favorece la unión de la ARN polimerasa al promotor de los genes diana. No obstante se ha descrito la regulación de la transcripción de genes que carecen de dicha secuencia consenso (Figura 7) (Egland y Greenberg, 2001; Zhu y Winans, 1999).

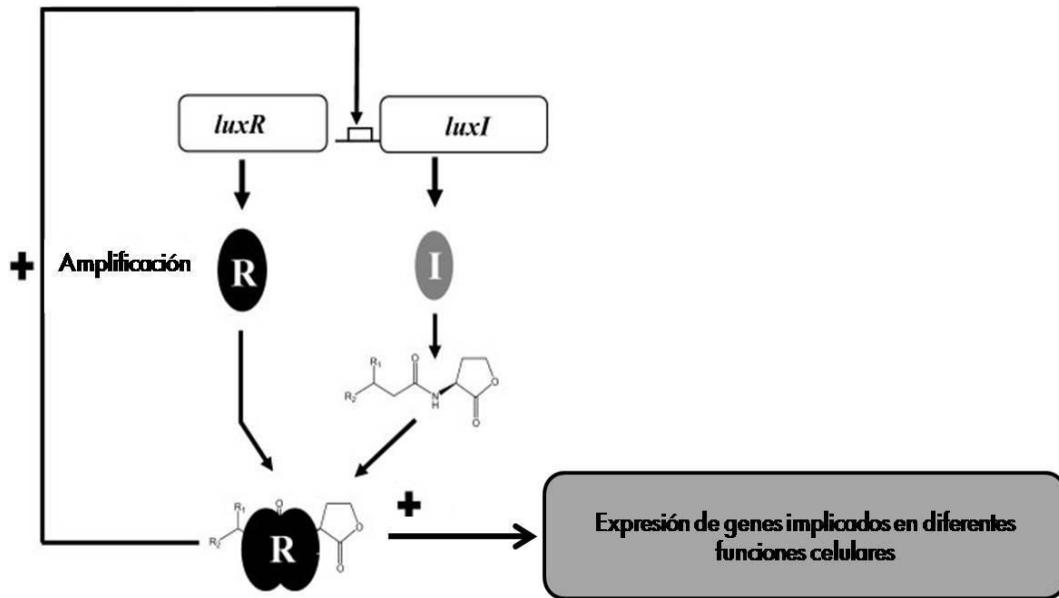


Figura 7. Cascada del sistema de regulación QS. Los genes *luxR* y *luxI* son los ortólogos correspondientes en *A. fischeri* que codifican una sintasa de AHLs y un receptor de AHLs. En la mayoría pero no en todos los sistemas QS, las AHLs son autoinductores que activan su propia producción a través de un sistema regulador retroalimentado de forma positiva (Williams, 2007).

Las proteínas de la familia LuxR pueden actuar como activadores, pero también como represores de la transcripción de sus genes diana. En este último caso, algunos reguladores se unen a la caja "*lux*" en ausencia de las AHLs y bloquean la transcripción de los genes diana impidiendo el acceso de la ARN polimerasa. La presencia de moléculas señal AHLs y su unión al regulador LuxR induce cambios conformacionales que causan la disociación del regulador de la caja "*lux*" y permite la transcripción de genes implicados en diferentes funciones celulares (Minogue y col., 2002; Von Bodman y col., 1998).

e) Funciones dependientes de quorum sensing

En la Tabla 2 se indican algunos ejemplos de las funciones celulares controladas por el sistema regulador QS en bacterias Gram negativas. Muchas de ellas están relacionadas con la virulencia del microorganismo en cuestión.

Tabla 2. Algunos ejemplos de los fenotipos controlados por sistemas QS.

Microorganismo	Fenotipo controlado por QS
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Formación del biofilm, exoproteasas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Conjugación
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Exoenzimas, formación del biofilm, movilidad swarming, sideróforos
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Exoproteasas

<i>Chromobacterium violaceum</i>	Exoenzimas, pigmento
<i>Erwinia carotovora</i>	Carbapenem, exoenzimas
<i>Pantoea stewartii</i>	Exopolisacárido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exoenzimas, exotoxinas, formación del biofilm, movilidad swarming, metabolitos secundarios, señal 4-quinolona
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Fenazinas, proteasa, morfología colonial, agregación celular, colonización de raíces
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Fenazina 1-carboxamida
<i>Pseudomonas putida</i>	Formación del biofilm
<i>Pseudomonas syringae</i>	Exopolisacárido, movilidad swimming
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Nodulación de raíces y simbiosis, conjugación
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Agregación celular
<i>Serratia</i> sp.	Antibiótico, pigmento, exoenzimas
<i>Serratia marcescens</i>	Movilidad sliding, biosurfactante, pigmento, nucleasa, frecuencia de transposición
<i>Serratia proteamaculans</i>	Exoenzimas
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Eficiencia de la nodulación, simbiosis, exopolisacárido
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Movilidad swimming y swarming
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Movilidad, agregación celular

El desarrollo de técnicas de microarray de ADN y la proteómica han permitido poner de manifiesto que los sistemas QS controlan de una forma global la expresión de numerosos genes en un gran número de bacterias. En *Pseudomonas aeruginosa* por ejemplo, casi el 10% de los genes están bajo control directo o indirecto de este tipo de sistemas (Wagner y col., 2003; Shuster y col., 2003). Entre los genes controlados por QS se encuentran los genes de virulencia (más de 70) descritos en *Vibrio cholerae* (Zhu y col., 2002). Los estudios realizados en este campo sugieren que el sistema QS permite a las bacterias alternar entre los diferentes programas genéticos con el fin de adaptarse a las condiciones ambientales. Además debido a que algunos genes son reprimidos en presencia de moléculas señal, este sistema podría ser utilizado a fin de finalizar algunos procesos que no son beneficiosos para las bacterias (Waters y Bassler, 2005).

1.4. Sistemas quorum sensing múltiples

Algunas especies bacterianas contienen dos o más sistemas QS dependientes de moléculas AHLs para coordinar la respuesta dependiente de la densidad celular. En la Tabla 3 se recogen algunos ejemplos de microorganismos que disponen de múltiples sistemas QS. En estos casos los sistemas QS suelen estar organizados en una red jerárquica. Por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* la presencia de esta red organizada de regulación le permite responder de una forma ordenada cronológicamente y en consecuencia controlar la expresión de genes que podrían ser decisivos para una infección exitosa (Shuster y col., 2003).

Tabla 3. Ejemplo de bacterias que contienen sistemas QS múltiples

Bacteria	Moléculas señales de QS	Homólogos de LuxI/LuxR	Referencias
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	C ₆ -HSL; C ₈ -HSL	Ccil/CciR	Malott y col. (2005)
	C ₆ -HSL; C ₈ -HSL	Cepl/CepR	Huber y col. (2001); Lewenza y Sokol (2001); Lewenza y col. (1999, 2002)
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	3-oxo-C ₆ -HSL	Carl/CarR	Jones y col. (1993), McGowan y col. (1995,2005)
		VirR*	Burr y col. (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-oxo-C ₁₂ -HSL	LasI/LasR	Pearson y col. (1997)
	C ₄ -HSL	RhlI/RhlR	Latifi y col. (1995, 1996)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3-OH-C _{14:1} -HSL	CinI/CinR	Lithgow y col. (2000)
	C ₆ -HSL; C ₇ -HSL; C ₈ -HSL; 3-OH-C ₈ -HSL	RaiI/RaiR	Wisniewski-Dyé y Downie (2002); Wilkinson y col. (2002)
	C ₈ -HSL; 3-oxo-C ₈ -HSL; 3-oxo-C ₁₀ -HSL	Tral/TraR	Danino y col. (2003)
	C ₆ -HSL; C ₇ -HSL; C ₈ -HSL	RhlI/RhlR ExpR*	Rodelas y col. (1999) Edwards y col. (2009)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C ₈ -HSL; C ₁₂ -HSL; 3-oxo- C ₁₄ -HSL; C _{16:1} -HSL; 3-oxo-C _{16:1} -HSL; C ₁₈ - HSL	SinI/SinR	Marketon y González (2002); Marketon y col. (2003); Teplitski y col. (2003); Gao y col. (2005)
		ExpR*	Pellock y col. (2002)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	3-oxo-C ₆ -HSL; C ₆ -HSL	YpsI/YpsR	Atkinson y col. (1999, 2008)
	C ₆ -HSL; C ₈ -HSL	YtbI/YtbR	Atkinson y col. (1999)

*Proteínas de la familia LuxR desaparejadas.

Case y colaboradores (2008) observaron que el número de proteínas tipo LuxR y LuxI no es siempre igual debido a que algunas bacterias contienen una proteína del tipo LuxR desaparejada. Estas proteínas se han encontrado tanto en especies bacterianas con uno o varios sistemas QS dependientes de AHLs como en otras que no poseen sintasas LuxI. En este último caso, las bacterias no producen AHLs pero las proteínas LuxR les permiten percibir y responder a moléculas exógenas. A estas proteínas se les atribuyó el nombre de LuxR huérfanas o LuxR "solos" (Patankar y González, 2009; Subramoni y Venturi, 2009).

1.5. El sistema quorum sensing como parte de una red de regulación bacteriana global

Desde que se describió por primera vez el sistema QS, muchos estudios han demostrado que es un proceso de regulación mucho más complejo de lo que se pensaba. A nivel celular los genes *luxR* y *luxI* están regulados directamente o indirectamente a través de distintos reguladores transcripcionales, sistemas reguladores de dos componentes y postranscripcionales que responden a las condiciones ambientales (Boyer y Wisniewski-Dyé, 2009). De este modo el sistema QS está integrado en una red de regulación global con el fin de controlar la producción de AHLs en respuesta a varios factores (abióticos y bióticos) y optimizar la expresión de los genes regulados por el mismo (Figura 8).

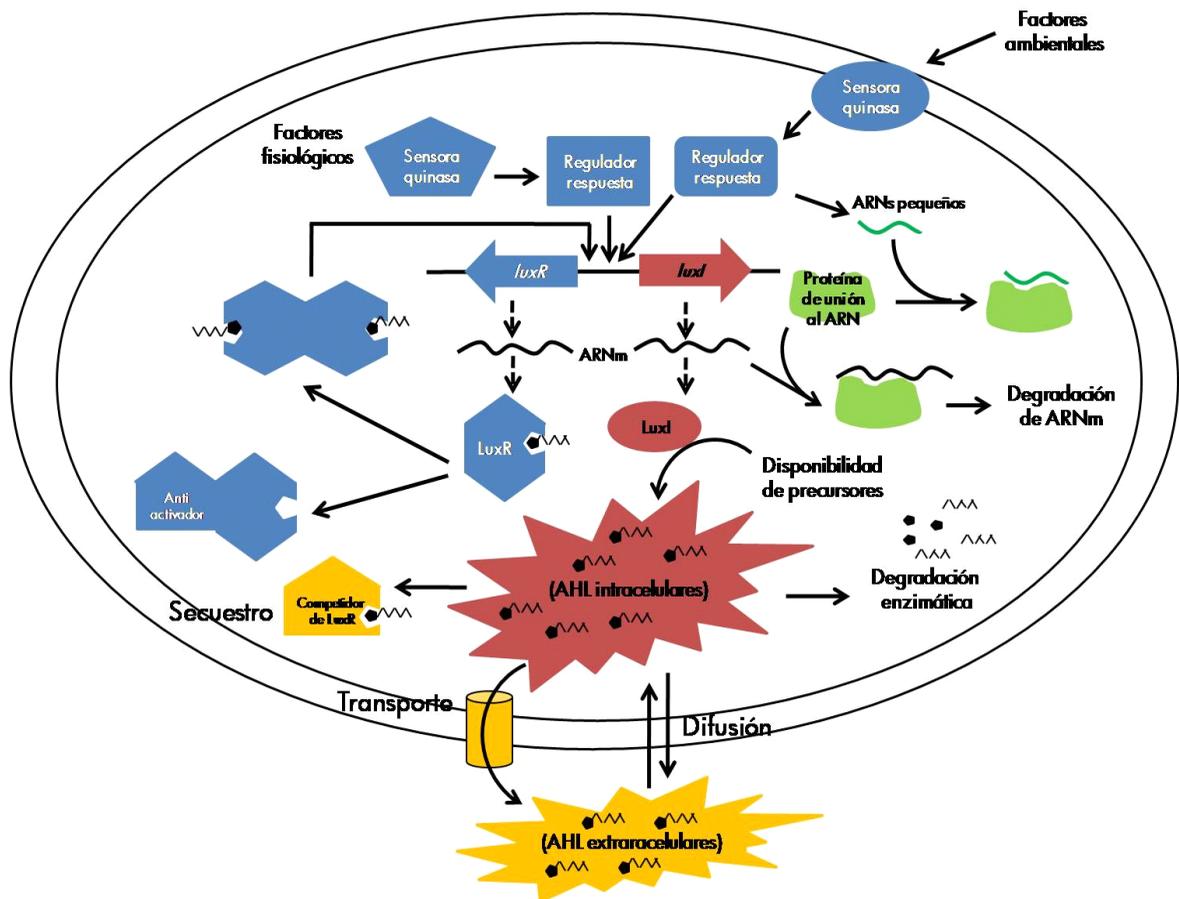


Figura 8. Integración del sistema QS en la regulación global (Boyer y Wisniewski-Dyé, 2009).

Uno de los ejemplos más antiguos en el control de la síntesis de las AHLs es el que se da en *A. fischeri* a través del represor catabólico CRP en respuesta a sustratos específicos (Dunlap y Greenberg, 1985; Dunlap, 1989).

El regulador transcripcional σ^s o σ^{38} , también conocido como factor sigma alternativo RpoS, es un regulador central que participa en la respuesta al estrés y en la entrada de las bacterias en la fase estacionaria de crecimiento. Este regulador actúa activando o reprimiendo los genes QS

(Regine, 2002; Stockwell y Loper, 2005). En un principio los resultados de los estudios sobre la relación del sistema QS con el factor RpoS fueron confusos. Así en *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema QS RhlR/RhlI parecía requerir la expresión de *rpoS* (Latifi y col., 1996). Sin embargo, posteriormente, Whitely y colaboradores (2000) encontraron que el gen *rpoS* regulaba negativamente el sistema QS y reprimía la expresión del gen *rhlI*. Finalmente, años más tarde, Shuster y colaboradores (2004) demostraron mediante un análisis transcriptómico del regulón RpoS que existía una relación entre el sistema QS y RpoS, dado que un 40% de los genes regulados por QS estaban regulados también por el factor RpoS. En otras especies del género *Pseudomonas*, como por ejemplo *P. putida* WCS358, el factor RpoS regula también positivamente el sistema QS PpuR/PpuI demostrando que constituyen un circuito regulatorio jerárquico (Bertani y Venturi, 2004). Por el contrario, en *Pseudomonas fluorescens* 2P24 se ha demostrado que el factor RpoS regula negativamente la expresión del sistema QS PcoR/PcoI (Yan y col., 2009).

Por otra parte GacS/GacA, uno de los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) más estudiados y altamente conservado en las especies de *Pseudomonas*, está interconectado también con el sistema QS. Los TCS, en los casos más sencillos, están constituidos por dos proteínas: una histidina quinasa (HK) y su correspondiente regulador de la respuesta (RR) relacionados entre sí mediante fosfotransferencia (Figura 9) (West y Stock, 2001; Gao y Stock, 2009). La transducción de señales en un TCS típico tiene lugar una vez que el sensor, la HK situada en la membrana, se activa en respuesta a un estímulo extracelular adecuado y se autofosforila, concretamente en un residuo de histidina conservado. En una segunda etapa, el grupo fosfato es transferido desde la HK hasta un residuo de aspártico que está conservado en el RR. El estado de fosforilación del RR controla la actividad de esta proteína y por tanto, determina la respuesta frente al estímulo inductor. El cese de esta señal se realiza por la pérdida del grupo fosfato del RR, un proceso que puede ser controlado por el propio RR o inducido por la HK (Figura 9) (Stock y col., 2000; West y Stock, 2001).

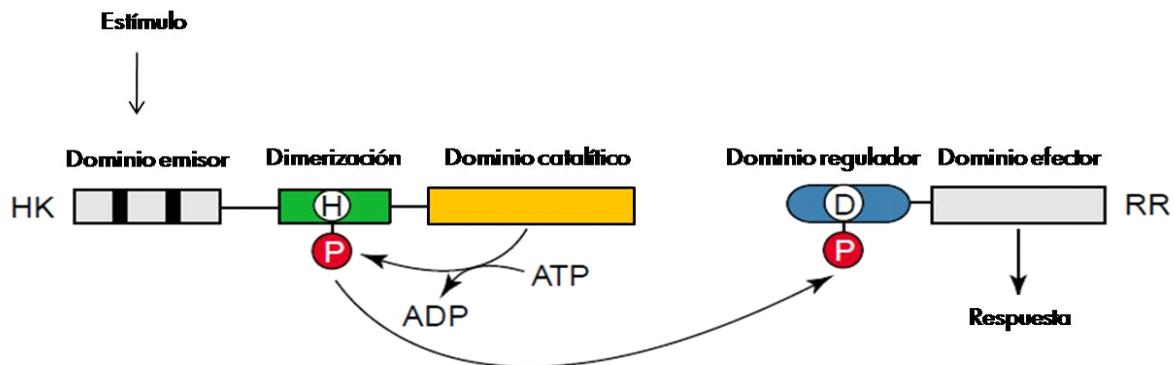


Figura 9. Esquema básico de la transducción de señal en los sistemas reguladores de dos componentes (West y Stock, 2001).

Los sistemas reguladores de dos componentes GacS/GacA se emplean para la regulación de una amplia variedad de funciones celulares que incluyen, entre otras, el metabolismo, la movilidad, el transporte de nutrientes, la adaptación a condiciones de estrés, la virulencia, la síntesis de exopolisacáridos, el desarrollo de biopelículas y la acumulación de moléculas señal QS (Bertani y Venturi, 2004; Castañeda y col., 2000; Heeb y Hass, 2001; Kitten y col., 1998; Kinscherf y Willis, 1999; Marutani y col., 2008; Reimann y col., 1997; Winson y col., 1995).

Recientemente, se ha descubierto que las moléculas pequeñas no codificantes de ARN juegan un papel central en la regulación de los sistemas QS mediante la integración de la información de los autoinductores y de sistemas de regulación global para responder de forma rápida y apropiada (Bejerano y Xavier, 2007; Lapouge y col., 2008; Timmermans y Van Melderen, 2010).

1.6. Identificación de los sistemas quorum sensing: uso de cepas biosensoras

La primera etapa en el estudio de los sistemas QS dependientes de AHLs consiste en la detección de la producción de las moléculas AHLs en un microorganismo. La estrategia más utilizada consiste en el uso de bacterias bioindicadoras o biosensoras. Los biosensores son cepas mutantes que no producen AHLs pero que contienen un regulador transcripcional de la familia de proteínas LuxR que detecta la presencia de moléculas AHLs exógenas. Suelen tener generalmente el promotor del gen sintasa *luxI* ligado a un gen informador que se regula positivamente [por ejemplo: *lacZ* (actividad β -galactosidasa), *luxCDABE* (luminiscencia), *gfp* (fluorescencia) y *vioABCD* (producción de violaceína)] (Figura 10).

Los biosensores responden de forma muy sensible a las AHLs y no requieren de una instrumentación sofisticada. Cabe destacar que la sensibilidad de cada biosensor depende de la afinidad de la proteína LuxR hacia las AHLs. Las cepas biosensoras se pueden utilizar de diferentes formas (Figura 10): (i) la cepa a estudiar se puede sembrar y poner a crecer en medio sólido junto a la cepa biosensora en forma de una "T" y el cambio fenotípico asociado a la presencia de AHLs exógenas se puede observar como una respuesta en gradiente desde el punto de encuentro de las dos cepas; (ii) las AHLs se pueden extraer a partir de los cultivos bacterianos y se puede llevar a cabo una caracterización parcial mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Schaefer y col., 2000; Shaw y col., 1997). La extracción de AHLs mediante disolventes orgánicos aumenta la sensibilidad de detección de los biosensores. Durante el desarrollo de la cromatografía las AHLs migran con una movilidad característica y resultan en manchas después de su revelado mediante la adición de una sobrecapa que contiene la cepa biosensora (McClellan y col., 1997; Schaefer y col., 2000; Shaw y col., 1997); (iii) varias cepas biosensoras se pueden utilizar para cuantificar las AHLs mediante la medida de la actividad del gen informador. Este tipo de ensayos son interesantes para estudiar la regulación de la síntesis de AHLs y también para identificar las diferencias en los niveles de producción de AHLs y (iv) desde el año 1999 se

empezaron a utilizar las cepas biosensoras para monitorizar las moléculas AHLs *in vivo*. Para ello, se han construido cepas biosensoras con un gen informador no tóxico que se puede detectar su actividad al microscopio de epifluorescencia (Andersen y col., 2001). Este tipo de ensayos nos proporcionan información sobre la identidad química y la concentración de las moléculas señal presentes en el medio de cultivo bacteriano. Para la determinación de la estructura de las AHLs se recurre a la técnica HPLC acoplada con espectrometría de masas (Schaefer y col., 2000).

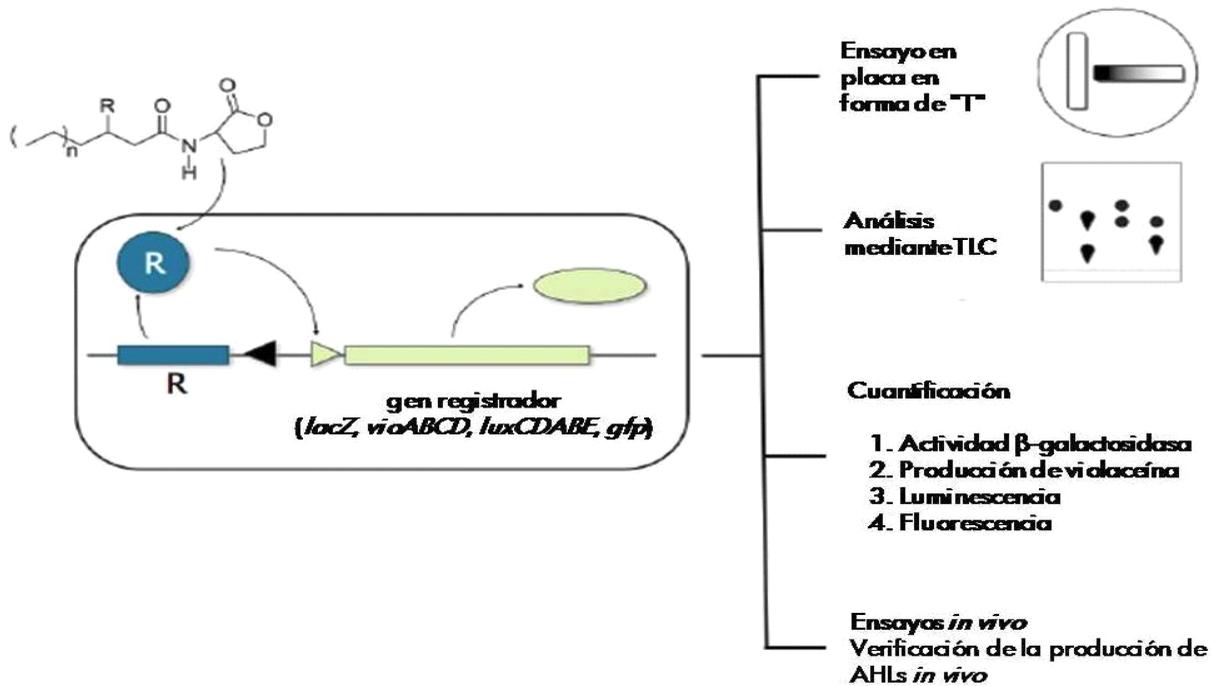


Figura 10. Construcción y uso de una bacteria biosensora. Las moléculas AHLs exógenas interactúan con el regulador transcripcional de la familia LuxR dentro de la bacteria biosensora (no produce AHLs), que resulta en la transcripción del gen informador (Steindler y Venturi, 2007).

Los biosensores *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) y *Chromobacterium violaceum* CV026 son los más utilizados en la detección de la síntesis de AHLs por otras bacterias. La cepa indicadora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Shaw y col., 1997) tiene unido el gen *lacZ* a uno de los genes del operón *tra* (*traG::lacZ*) que es inducible por AHLs. Por su parte, la cepa *C. violaceum* CV026 tiene afectada la capacidad natural de producir un pigmento púrpura violáceo en respuesta a AHLs (McClellan y col., 1997). Ambas cepas biosensoras son incapaces de producir sus propios AHLs, por lo que el mecanismo del sistema QS se activa solamente en respuesta a la presencia de AHLs exógenas. Por consiguiente cuando estas cepas están en contacto con un organismo productor de AHLs se visualiza de forma rápida el color azul que origina la cepa NTL4 en medio adicionado de X-gal debido a la actividad β -galactosidasa o el pigmento púrpura natural producido por la cepa CV026. Estos biosensores han permitido la evaluación de la síntesis de AHLs en numerosos organismos; sin embargo son inactivos (no pueden crecer) en

presencia de una concentración de sales superior al 1% (p/v) y, como es lógico, no pueden detectar las AHLs producidas por los microorganismos halófilos en un ensayo en placa en forma de "T" u otras moléculas autoinductoras que deben existir en la naturaleza. Además no son capaces de detectar una gran variedad de los autoinductores producidos por otros muchos microorganismos. Por ejemplo, estas cepas no detectan moléculas con una cadena hidrocarbonada de más de 12 átomos de carbono. Ante este problema, recientemente se han construido nuevas cepas indicadoras que permiten ampliar el rango de moléculas a identificar. Entre ellas, se incluyen diferentes construcciones plasmídicas (Steindler y Venturi, 2007) y una cepa biosensora, derivada de *Sinorhizobium meliloti* Rm 41, capaz de detectar moléculas señal con larga cadenas hidrocarbonadas, que son sintetizadas por bacterias de géneros no relacionadas filogenéticamente con ella (Llamas y col., 2004).

1.7. Importancia del estudio de los sistemas quorum sensing

En los últimos años distintos estudios están explorando el papel del sistema QS en las comunidades microbianas (Ferluga y Venturi, 2008). Otros estudios se han enfocado en la identificación de posibles mecanismos para interferir los sistemas QS con el fin de controlar la patogenicidad y virulencia de numerosas bacterias patógenas que utilizan las moléculas AHLs para controlar la producción de factores de virulencia. Algunos eucariotas como el alga *Delisea pulchra* producen furanonas halogenadas que actúan como agonistas de AHLs, impiden la interacción de los autoinductores con la proteína LuxR e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos sobre su superficie (Hentzer y col., 2003). Por su parte, el alga *Laminaria digitata* previene la formación de biofilms bacterianos sobre su superficie mediante la producción de haloperoxidasas que generan compuestos con actividad microbicida como el ácido hipocloroso (Borchardt y col., 2001). Las plantas también pueden interferir con las moléculas AHLs mediante mecanismos enzimáticos, aunque dichas actividades aún no ha sido identificadas (González y Keshavan, 2006). En el caso de los procariontes, algunas bacterias producen enzimas que rompen la estructura de las moléculas AHLs. Estos mecanismos son conocidos como quorum quenching (Taga y Bassler, 2003; Defoirdt y col., 2008). Se han identificado dos grandes grupos de enzimas según su actividad: las lactonasas que rompen el anillo lactónico y las acilasas que hidrolizan el enlace amido y desdoblan la molécula en el correspondiente ácido graso y la homoserín lactona (Dong y col., 2007). La producción de lactonasas se ha hallado en numerosas bacterias de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Klebsiella* o *Agrobacterium* (Dong y Zhang, 2005), y recientemente en la especie *Rhodococcus erythropolis* (Uroz y col., 2008). Como bacterias productoras de acilasas se han descrito las especies *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Sio y col., 2006), *Rhodococcus erythropolis* (Uroz y col., 2005), la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC7120 (Romero y col., 2008) y especies de los géneros *Ralstonia* (Lin y col., 2003) y *Streptomyces* (Park y col., 2005).

2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

2.1. Ambientes hipersalinos y clasificación de los microorganismos halófilos

Los hábitats hipersalinos son ambientes extremos distribuidos por todo el planeta (Figura 11). Se consideran aguas hipersalinas aquellas que tienen un contenido en sales superior al agua del mar [aproximadamente el 3,5% (p/v)]; las aguas hipersalinas se clasifican en talasosalinas y atalasosalinas según su composición de sales sea cualitativamente similar a la de los océanos o sea diferente (Rodríguez-Valera, 1988). Los suelos salinos son aquellos que contienen más de un 0,2% (p/v) de sales (Kaurichev, 1980). Entre los hábitats salinos se encuentran los lagos salados, las salinas y otros medios acuáticos, así como los suelos salinos que acompañan estos ambientes, los que tienen otro origen geológico o son consecuencia de la actividad humana (suelos agrícolas salinizados). En España existen numerosas salinas en las provincias con litoral costero, así como otras interiores que se alimentan de manantiales salinos. A modo de ejemplo podemos citar la laguna salada de Fuente de Piedra situada en Antequera (Málaga), que ha sido objeto de numerosos estudios por parte de nuestro grupo de investigación, entre otros ambientes. A partir de este ambiente salino en concreto se aisló *Halomonas anticariensis* FP35^T que es objeto de estudio de este trabajo.

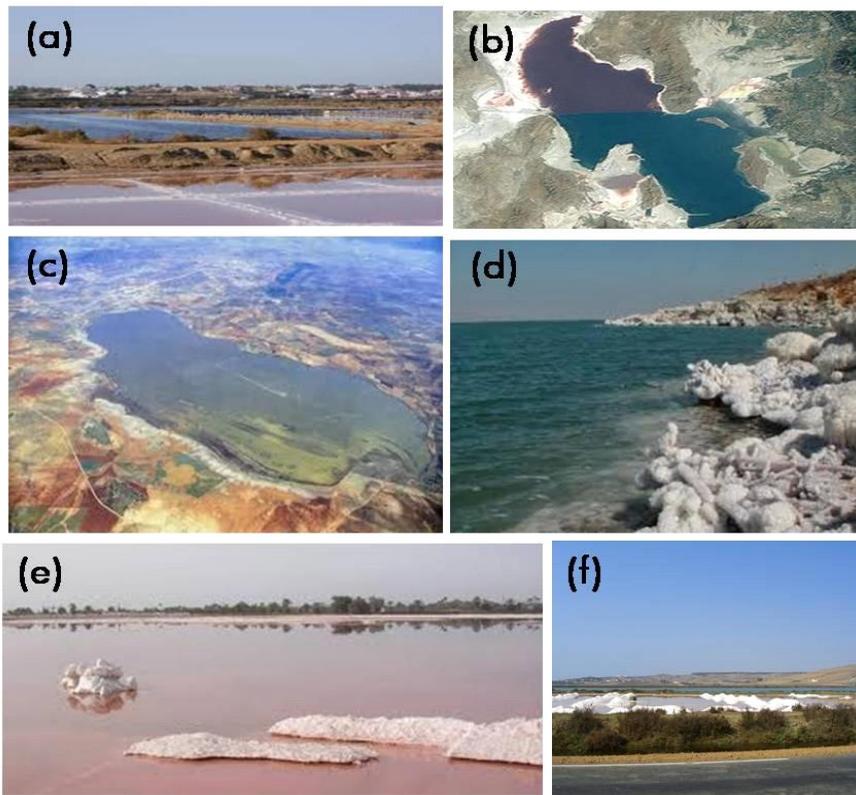


Figura 11. Ejemplos de diversos ambientes hipersalinos: (a) Salinas de Isla Cristina (Huelva). (b) Gran Lago Salado (Utah, EE. UU.). (c) Laguna de Fuente de Piedra (Málaga). (d) Mar Muerto. (e) Lagos del Wadi Natrun (Egipto). (f) Salinas del Lixus (Marruecos).

Los microorganismos que viven en estos ambientes son en su mayoría halófilos que están adaptados no solamente a una composición de iones alta, sino también a otros factores ambientales extremos como pueden ser valores de pH alcalinos o ácidos, baja disponibilidad de oxígeno, altas y bajas temperaturas, presencia de metales pesados y/o diversos compuestos tóxicos, etc. (Oren, 2002a y b; Ventosa y col., 2008).

Las relaciones de los distintos microorganismos con la sal han sido sujetas a muy diversas interpretaciones, de tal modo que se han propuesto varias clasificaciones (Ramos-Cormenzana, 1989; Trüper y Galinski, 1986; Vreeland, 1987). Una de las más aceptadas y utilizadas por la comunidad científica es la establecida por Kushner y Kamekura (1988). Esta clasificación se basa en el crecimiento óptimo de los microorganismos con respecto a la concentración de NaCl y en base a ello se pueden distinguir principalmente tres grupos fisiológicos de microorganismos halófilos. Los halófilos extremos tienen un crecimiento óptimo en medios que contienen del 15-30% (p/v) (2,5-5,2M) NaCl; los halófilos moderados presentan un crecimiento óptimo en medios con 3-15% (p/v) (0,5-2,5M) de NaCl y los halófilos débiles, donde se incluyen los microorganismos marinos que tienen un crecimiento óptimo en medios que contienen del 1-3% (p/v) (0,2-0,5M) de NaCl.

Por otra parte, los microorganismos no halófilos son aquellos que crecen en medios con menos del 1% (p/v) (0,2M) de NaCl. Algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sal y se les denomina halotolerantes. Si toleran una concentración de NaCl superior al 15% (p/v) (2,5M) se denominan microorganismos halotolerantes extremos.

2.2. Diversidad filogenética y metabólica de los microorganismos halófilos

El mundo de los microorganismos halófilos es muy diverso, a pesar de las condiciones extremas de los hábitats hipersalinos. En los tres dominios de la vida, *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya* se han encontrado representantes que se han adaptado a concentraciones de sales incluso próximas a la saturación aunque sin duda los procariontes son los más diversos y los mejor estudiados hasta el momento. (Figura 12).

En términos relativos quizás la mayor representación de estos microorganismos se da en el Dominio *Archaea*, donde muchos microorganismos halófilos se incluyen en el phylum *Euryarchaeota*, orden *Halobacteriales*, familia *Halobacteriaceae* que hoy en día agrupa más de 100 especies clasificadas en una treintena de géneros. La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Grant y col., 2001) incluye una extensa descripción de los mismos. Algunos de sus miembros no solo requieren específicamente cloruro sódico sino que exigen un medio alcalino y se denominan haloalcalófilos.

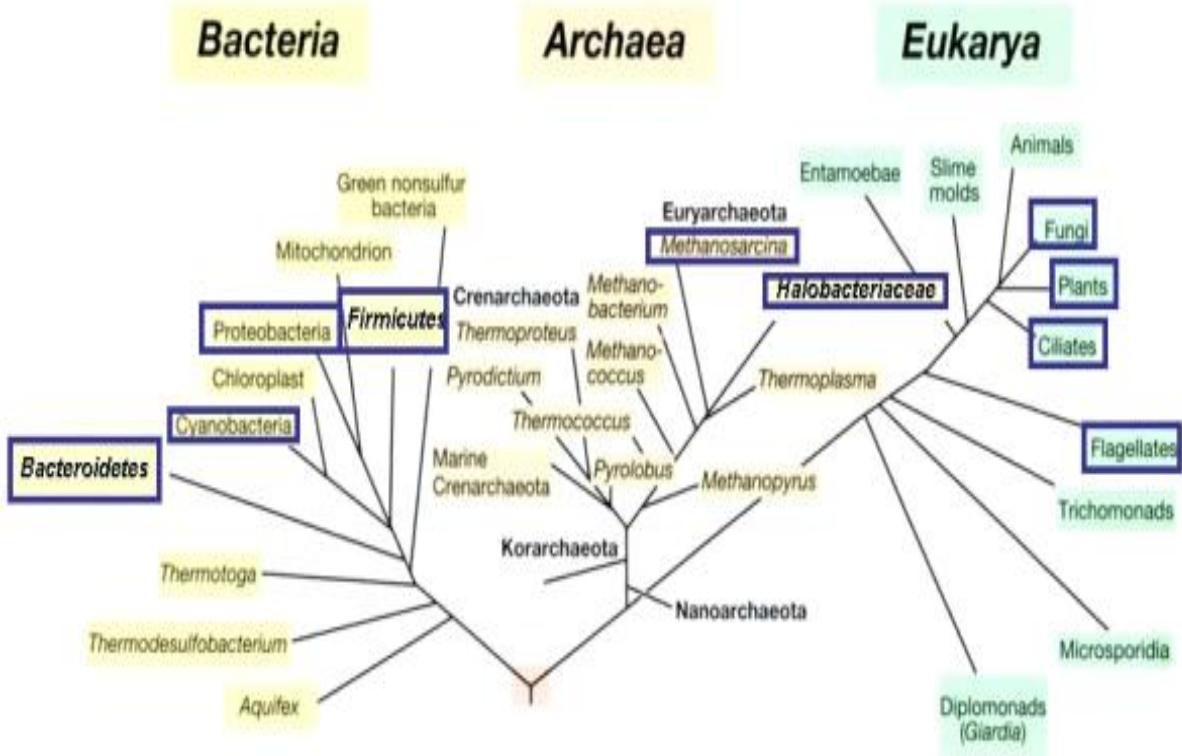


Figura 12. Árbol filogenético de la vida y distribución de algunos de los microorganismos halófilos. Los grupos marcados con cuadros azules contienen al menos un representante halófilo (Oren, 2008).

Entre los géneros más representativos de las haloarqueas tenemos *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronococcus*, y *Natronobacterium*, por nombrar sólo unos pocos representantes. En el dominio *Archaea* se encuentran las arqueas aerobias halófilas extremas también conocidas como haloarqueas que actualmente están incluidas dentro de la clase *Halometabacteria*. Estos microorganismos son los componentes mayoritarios de la biomasa microbiana que se encuentra en los ambientes hipersalinos extremos [con una concentración superior al 20% (p/v) de NaCl] y de ahí que sean considerados como los microorganismos halófilos extremos por excelencia. Asimismo, son los principales responsables de la coloración roja-rosa que poseen estos ambientes debido a los pigmentos carotenoides C₅₀ que se pueden encontrar en grandes cantidades en la membrana de casi todos los miembros de esta familia. También se han descrito arqueas halófilas metanógenas en los medios hipersalinos. Estos microorganismos anaerobios estrictos obtienen energía a través de la producción de metano y juegan un importante papel en los ambientes hipersalinos. Los géneros *Methanohalobium*, *Methanosalsum* y *Methanohalophilus*, incluidos en la familia *Methanosarcinaceae*, dentro del orden *Methanosarcinales* son los únicos que contienen representantes halófilos moderados o extremos (de la Haba y col., 2011; Oren y col., 2009).

En la actualidad, el dominio *Bacteria* esta subdividido en unas 30 phyla de bacterias cultivables (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Las especies de las bacterias halófilas moderadas y extremas se encuadran fundamentalmente en las distintas clases de los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*, aunque también existen algunos representantes en los phyla *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae* y *Tenericutes*. La mayoría son organismos de vida libre, pero también existen posibles patógenos del hombre y de otros animales, endosimbiontes de distintos organismos y formas que viven íntimamente asociadas a las plantas que habitan los suelos salinos. Dentro de los phyla citados existen grupos taxonómicos que incluyen un elevado número de especies halófilas como es el caso de la familia *Halomonadaceae* (clase *Gammaproteobacteria*, orden *Oceanospirillales*) (Arahal y Ventosa, 2006). En la actualidad el género *Halomonas* es el tipo de la familia *Halomonadaceae* y contiene más de 70 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html>), muchas de las cuales han sido descritas por nuestro grupo de investigación (Euzéby, 2012). Un gran número de estas especies han sido analizadas en cuanto a la existencia de sistemas QS (capítulo IV de esta Tesis Doctoral), aunque la bacteria *Halomonas anticariensis* FP35^T ha constituido el objetivo principal de este trabajo.

Algunos microorganismos del dominio *Eukarya* constituyen parte de los ambientes hipersalinos aunque son menos predominantes que los procariontes (arqueas y bacterias). El alga verde *Dunaliella* es el eucariota principal responsable de la producción primaria en ambientes hipersalinos y es considerado como un excelente modelo para el estudio de la adaptación salina de las algas. Algunas cepas de *Dunaliella* pueden acumular grandes cantidades de β -caroteno, lo que tiene gran importancia para sus aplicaciones biotecnológicas (Oren, 2005). Además de este alga se han descrito otros organismos eucariotas, protistas, hongos filamentosos y levaduras (Cantrell y col., 2006; Feazel y col., 2008; Gunde-Cimerman y col., 2005; Pedrós-Alió, 2004; Wu y col., 2009). Cabe mencionar también la presencia de los virus en los ambientes hipersalinos (Porter y col., 2005; Seaman y Day, 2007).

Debido a la amplia diversidad taxonómica de los microorganismos halófilos presentes en los ambientes hipersalinos, existe entre ellos una amplia diversidad metabólica, aunque algunos procesos metabólicos descritos a bajas concentraciones de sales todavía parecen no funcionar a concentraciones de sales por encima de 150g/l. Ejemplo de ello son los procesos de nitrificación autótrofa (oxidación del amonio a nitrito y oxidación de nitrito a nitrato), metanogénesis a partir del hidrogeno y dióxido de carbono o bien a partir del acetato, así como la oxidación aerobia del metano. En la Tabla 4 se describen algunos de los procesos microbianos que ocurren a altas concentraciones de sales y que son procesos conocidos y comunes en el mundo microbiano (Oren, 2011).

Tabla 4. Tipos de metabolismos microbianos que funcionan a altas concentraciones de NaCl encontrados en los microorganismos halófilos.

Proceso	Representante	Limite de concentración de NaCl en cultivo
Fotosíntesis		
Oxigénica	<i>Dunaliella salina</i>	Saturación
Anoxigénica	<i>Halorhodospira halophila</i>	Saturación
Procesos de respiración		
Respiración aerobia	<i>Halobacterium salinarum</i>	Saturación
Desnitrificación	<i>Haloarcula marismortui</i>	250-300g/l
Reducción de sulfato-oxidación completa	<i>Desulfobacter halotolerans</i>	130g/l
Reducción de sulfato-oxidación incompleta	<i>Desulfovibrio retbaense</i>	240g/l
Fermentación		
Fermentación de la L-arginina	<i>Halobacterium salinarum</i>	Saturación
Fermentación de carbohidratos	<i>Halanaerobium</i> spp.	250-300g/l
Metanogénesis y metabolismo homoacetogénico		
Formación de metano a partir de H ₂ + CO ₂	<i>Methanocalculus halotolerans</i>	120g/l
Formación de metano a partir de acetato	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	60g/l
Formación de metano a partir de aminas o metanol	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	250g/l
Formación de acetato a partir de H ₂ + CO ₂	<i>Acetohalobium arabaticum</i>	250g/l
Procesos quimioautótrofos		
Oxidación autotrófica de amonio	<i>Nitrosococcus halophilus</i>	94g/l
Oxidación autotótrofica de sulfuro	<i>Halothiobacillus halophilus</i>	240g/l
Oxidación autotótrofica de metano	<i>Methylobacter modestohalophilus</i>	90g/l

2.3. Adaptación de los microorganismos halófilos al estrés salino

La disponibilidad del agua es un factor determinante en la supervivencia y el crecimiento de cualquier célula viva. La exposición de las células a altas concentraciones de sales hace que éstas pierdan gran cantidad de agua intracelular y esto lleva a su muerte, a menos que desarrollen mecanismos de adaptación que les permitan proliferar en estas condiciones desfavorables. Todos los microorganismos halófilos tienen una habilidad en común: la capacidad de excluir el sodio hacia el medio extracelular mediante bombas de eflujo. Sin embargo las células de los halófilos incrementan la actividad del agua de su citoplasma mediante el uso de distintas estrategias de osmoadaptación:

La primera estrategia consiste en acumular altas concentraciones de iones intracelulares, principalmente K⁺, que compensen el estrés osmótico del medio. Los microorganismos que utilizan este mecanismo de adaptación tienen un citoplasma hipersalino, lo que implica que, tanto las enzimas como todos los componentes celulares, han de adaptarse perfectamente a la presencia de elevadas concentraciones salinas. Para ello, las proteínas producidas por estos microorganismos poseen en su superficie una mayor cantidad de aminoácidos con carácter ácido

para neutralizar las cargas positivas. Por otro lado, las membranas celulares sufren una serie de cambios en su composición lipídica, aumentando su proporción de lípidos aniónicos, tales como fosfatidilglicerol y/o glicolípidos, y disminuyendo la de fosfatidiletanolamina, lo que se traduce en un aumento de moléculas cargadas negativamente. Cabe destacar que este tipo de adaptación, la acumulación de K^+ , presenta el inconveniente, a pesar de su eficacia, de ser muy poco flexible, por lo que los microorganismos que la utilizan poseen un margen relativamente reducido de adaptación a diferentes osmolaridades del medio externo (Galinski y Trüper, 1994; Ventosa y col., 1998). Esta estrategia es utilizada por tres grupos de microorganismos halófilos muy distantes filogenéticamente: las haloarqueas, las bacterias halófilas anaerobias del orden *Halanaerobiales* y el bacteroideto halófilo extremo *Salinibacter ruber*.

Sin embargo, la gran mayoría de las bacterias halófilas utilizan una segunda estrategia basada en la acumulación de "solutos compatibles". Consiste en mantener el balance osmótico mediante la acumulación de moléculas no iónicas que pueden ser sintetizadas *de novo* por la célula o bien ser transportadas al citoplasma desde el medio externo si se encuentran disponibles. Estas moléculas son compuestos orgánicos neutros de baja masa molecular, altamente solubles en agua, que no interfieren con el metabolismo de la célula aunque se acumulen a altas concentraciones (Brown, 1976), de ahí su denominación de "solutos compatibles". Los diferentes solutos compatibles descritos presentan una naturaleza muy variable, como polialcoholes (por ejemplo: glicerol, manitol), α y β -aminácidos y sus derivados (por ejemplo: prolina, α -glutamato, glutamina), diaminoácidos N-acetilados, azúcares (por ejemplo: sacarosa, trehalosa), compuestos de trimetilamonio o aminas cuaternarias y tetrahidropirimidinas (por ejemplo: betaínas, ectoínas) (da Costa y col., 1998; Roberts, 2005). Esta estrategia está muy distribuida y conservada evolutivamente en los tres dominios de la vida (Bohnert, 1995; Roberts, 2000; Roeßler y Müller, 2001).

2.4. Genética de los microorganismos halófilos

La genética de los microorganismos halófilos ha sido poco estudiada en comparación con los numerosos estudios realizados sobre su filogenia, taxonomía, fisiología, y ecología. Sin embargo en estas últimas dos décadas los análisis genéticos de los microorganismos halófilos han progresado gracias a la creación de herramientas genéticas para su manipulación. De hecho, hay ya estudios que han puesto a punto y han descrito procedimientos de extracción de ácidos nucleicos, utilización de vectores de clonación y expresión, mecanismos de intercambio genético, técnicas de mutagenesis, genes informadores y análisis de expresión génica, entre otros, para la realización de experimentos genéticos tanto en arqueas como en bacterias halófilas (Afendra y col., 2004; Argandoña, 2012; Llamas y col., 1999, 2000; Peck y col., 2000; Vargas y Nieto, 2004).

El uso de las herramientas genéticas mencionadas en grupos taxonómicos pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* (*Halomonas*, *Chromohalobacter*) ha permitido ampliar el conocimiento sobre el tamaño del genoma, la presencia de megaplásmidos y caracterizar genes implicados en la adaptación de estos microorganismos a altas concentraciones de sales, entre otros. La Tabla 5 muestra algunos de los genes caracterizados en microorganismos de la familia *Halomonadaceae*.

Tabla 5. Ejemplo de algunos genes caracterizados en especies de la familia *Halomonadaceae*.

Género Cepa	Gen	Función	Referencia
<i>Chromohalobacter</i>			
<i>C. salexigens</i> DSM 3043 ^T	<i>betIBA</i>	Proteína reguladora, betaína aldehído deshidrogenasa y colina deshidrogenasa	Cánovas y col., 2000
	<i>ectABC</i>	Ácido diaminobutírico acetiltransferasa, ácido L-diaminobutírico aminotransferasa y ectoína sintasa	Cánovas y col., 1998
	<i>ectD</i>	Ectoína hidrolasa	Gacía-Esteva y col., 2006
	<i>eupR</i>	Transporte de solutos compatibles	Rodríguez-Moya y col., 2010
<i>Halomonas</i>			
<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T	<i>ectABC</i>	Ácido diaminobutírico acetiltransferasa, ácido L-diaminobutírico aminotransferasa y ectoína sintasa	Göller y col., 1998
	<i>teaABC</i>	Proteína periplásmica de unión a sustrato y subunidades menor y mayor de proteínas transmembrana	Grammann y col., 2002
<i>H. eurihalina</i> F2-7	<i>carAB</i>	Subunidades mayor y menor de las carbamoilfosfato sintetasa	Llamas y col., 2003
<i>H. halodenitrificans</i> IFO 14912 ^T	<i>norCBQ</i>	Óxido nítrico reductasa, subunidad de la citocromo <i>c</i> , subunidad de la citocromo <i>b</i> y NorQ	Sakurai y Sakurai, 1998
<i>H. maura</i> S-31 ^T	<i>epsABCJ</i>	Transporte y ensamblaje del EPS maurano	Arco y col., 2005
	<i>narGHJI</i>	Respiración anaerobia sobre nitratos	Argandoña y col., 2006
<i>H. meridiana</i> DSM 5425 ^T	<i>amyH</i>	α-amilasa	Coronado y col., 2000
<i>H. organivorans</i> G-16.1 ^T	<i>catRBCA</i>	Degradación del catecol	Moreno y col., 2011
	<i>benAB</i>	Catabolismo del benzoato	
<i>H. salina</i> F8-11 ^T	<i>aldH</i>	Aldehído deshidrogenasa	Sripo y col., 2002

En el año 2000 se secuenció por primera vez el genoma de una arquea halófila, *Halobacterium salinarum* NRC-1 (Ng y col., 2000) y un año más tarde el de una bacteria halófila débil, *Bacillus halodurans* (Takami y col., 2001). Sin embargo aún no se dispone de una representación de secuencias de genomas completos de los microorganismos halófilos.

2.5. Biotecnología de los microorganismos halófilos

Los microorganismos halófilos tienen un potencial biotecnológico en muchos campos, favorecido por una serie de ventajas adicionales como son su facilidad de cultivo y mantenimiento en el laboratorio, su capacidad para crecer en un amplio rango de concentraciones salinas y la difícil contaminación de los medios de elevada salinidad, entre otras (Arahal y Ventosa, 2006; Ventosa y col., 1998). Entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos de biorremediación, en la elaboración de productos alimenticios (como la salsa de soja) y fundamentalmente, en la producción de compuestos de interés industrial, como solutos compatibles (que son usados en la industria cosmética y como estabilizadores de enzimas), exopolisacáridos (EPSs), enzimas extracelulares (amilasas, proteasas, lipasas, nucleasas, etc), polihidroxialcanoatos, carotenoides o compuestos antimicrobianos y anticancerígenos (Margesin y Schiner, 2001; Oren, 2010; Quillaguamán y col., 2010; Ventosa y Nieto, 1995; Ventosa y col., 1998; Ventosa y Arahal, 2002; Ventosa y col., 2005, 2008). De hecho, algunos de estos productos se obtienen a nivel industrial como es el caso de la producción de β -caroteno por el alga *Dunaliella*, bacteriorodopsina por *Halobacterium* y ectoína por *Halomonas* (Oren, 2010).

En los últimos años nuestro equipo ha realizado una gran labor investigadora en la descripción de EPSs de interés biotecnológico entre las bacterias halófilas. De esta forma hemos identificado once especies productoras de EPSs dentro de la familia *Halomonadaceae* (Quesada y col., 1990; Bouchotroch y col., 2001; Martínez-Canovas y col., 2004a; 2004b; Martínez-Checa y col., 2005b; González-Domenech y col., 2008a, 2008b, 2009; Llamas y col., 2011; Amjres y col., 2011), tres especies de la familia *Alteromonadaceae* (Martínez-Cánovas y col., 2004c; Martínez-Checa y col., 2005c), y dos especies de los nuevos géneros *Salipiger* y *Palleronia* (Martínez-Cánovas y col., 2004d; Martínez-Checa y col., 2005d). Entre los polímeros de estos microorganismos destacan los siguientes: (i) El maurano, producido por *Halomonas maura*, que es un EPS de propiedades semejantes a las del xantano; es decir, produce soluciones de alta viscosidad (Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003; Quesada y col., 2004); (ii) los exopolisacáridos de las cepas de *Halomonas eurihalina*, que son capaces de gelificar a pH ácido y tienen capacidad emulsionante (Quesada y col., 1993; Calvo y col., 1995; Béjar y col., 1996, 1998; Calvo y col., 1998; Quesada y col., 2004); (iii) los EPSs producidos por *Halomonas ventosae*, *Halomonas anticariensis*, *Idiomarina fontislapidosi*, *Idiomarina ramblicola* y *Alteromonas hispanica*, que son excelentes emulgentes (Mata y col., 2006; Mata y col., 2008); (iv) el exopolisacárido de *Salipiger mucescens*, que contiene una elevada proporción de fucosa, un monosacárido de gran interés industrial en cosmética y como probiótico (Llamas y col., 2010); (v) El EPS de la cepa HK30 de *Halomonas stenophila* que presenta una elevada actividad floculante (Amjres y col. 2012) y (vi) el polímero B100 de *Halomonas stenophila*, que induce selectivamente la apoptosis en células T de leucemia humana (Ruiz-Ruiz y col., 2011).

3. QUORUM SENSING EN EL GÉNERO *HALOMONAS*

El género *Halomonas* forma parte de la clase *Gammaproteobacteria* e incluye más de 70 especies de bacterias Gram negativas halófilas moderadas que presentan un óptimo de crecimiento en medios con una concentración salina comprendida entre el 0,5 y 2,5M de NaCl (Arahal y col., 2007). Estas bacterias se han aislado de lagos, salinas, suelos salinos, agua de mar, pinturas murales, alimentos en salazón, entre otros ambientes, constituyendo así uno de los grupos más abundantes de microorganismos halófilos cultivables. Durante la última década, el interés por las especies de *Halomonas* se ha centrado en su capacidad de producir exoenzimas, exopolisacáridos y otros productos valiosos desde el punto de vista biotecnológico (Mellado y col., 2004; Oren, 2010; Quesada y col., 2004; Ventosa, 2004).

En el año 2004 nuestro grupo de investigación inició un estudio encaminado a estudiar la existencia de sistemas QS en el género *Halomonas*. Para ello, primeramente se procedió a la detección de producción de AHLs en varias cepas pertenecientes a las especies productoras de exopolisacáridos *Halomonas eurihalina*, *H. maura*, *H. ventosae* y *H. anticariensis*. En todas ellas se describió por primera vez la presencia de moléculas señal del tipo AHLs mediante el uso de los biosensores *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) y *Chromobacterium violaceum* CV026. Entre ellas, se eligió *Halomonas anticariensis* FP35^T para estudios posteriores porque producía mayor cantidad de moléculas señal en comparación con las demás cepas de *Halomonas* ensayadas. La producción de estas moléculas señal es dependiente de la densidad celular, obteniéndose un máximo en su síntesis cuando se alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Llamas y col., 2005).

La identificación de la estructura química de las moléculas señal sintetizadas por la especie *H. anticariensis* FP35^T se llevó a cabo mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS), así como espectrometría ESI MS/MS. Los autoinductores caracterizados en esta bacteria son del tipo *N*-acil homoserín lactona: *N*-butanoil homoserín lactona (C₄-HSL), *N*-hexanoil homoserín lactona (C₆-HSL), *N*-octanoil homoserín lactona (C₈-HSL) y *N*-dodecanoil homoserín lactona (C₁₂-HSL) (Figura 13) (Llamas y col., 2005).

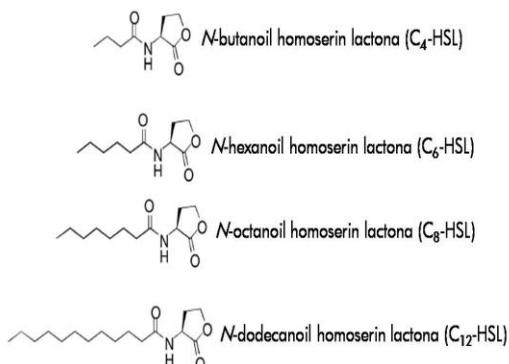


Figura 13. AHLs producidas por *Halomonas anticariensis* FP35^T.

H. anticariensis FP35^T (Martínez-Cánovas y col., 2004a), es una *Gammaproteobacteria* perteneciente a la familia *Halomonadaceae*, aislada de suelos salinos de la Laguna de Fuente de Piedra, situada en Antequera (Málaga). Es un bacilo Gram negativo, móvil, no formador de endosporas, que mide 3,00-3,50 x 0,75-1,00 μ m (Figura 14).

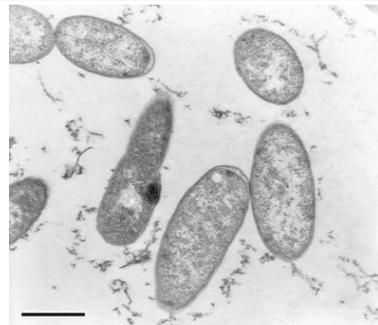


Figura 14. Microfotografía electrónica de *H. anticariensis* FP35^T.



H. anticariensis FP35^T es una bacteria halófila moderada capaz de crecer en medio complejo MY desde 0,5% (p/v) hasta 15% (p/v) de NaCl y presenta un crecimiento óptimo a una concentración de 7,5% (p/v) de NaCl. Cuando se cultiva en medio complejo crece formando colonias de color crema, circulares y convexas (Figura 15). Crece en un margen de pH de 6 a 9 y entre 20°C y 45°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 32°C.

Figura 15. Fotografía del crecimiento de *H. anticariensis* FP35^T en medio sólido.

Las características bioquímicas más importantes de *H. anticariensis* son las siguientes: Catalasa y oxidasa positivo. No produce ácidos a partir de azúcares. No produce indol y las pruebas rojo de metilo y Voges-Proskauer son negativas. No produce H₂S a partir de cisteína. No hidroliza almidón, caseína, gelatina, Tween 80, esculina, tirosina y lecitina pero es capaz de hidrolizar ADN, urea y Tween 20.

Posiblemente, la característica más relevante de *H. anticariensis* es que sus cepas son productoras de exopolisacáridos con cualidades interesantes para su utilización en la industria (Mata y col., 2006). Esta propiedad puede deducirse fácilmente por el aspecto mucoso de las colonias que origina cuando crece en medio sólido (Figura 15).

La cepa FP35^T en condiciones nutricionales óptimas produce 29,65mg de EPS por 100ml de cultivo (43,6mg de EPS por g de peso seco celular). La masa molecular del EPS es de aproximadamente 20kDa y está compuesto mayoritariamente por glucosa, manosa y ácido galactorúnic. El EPS origina soluciones de baja viscosidad que presentan un carácter pseudoplástico. Además el polímero tiene la capacidad de captar metales pesados y tiene en su composición una considerable cantidad de grupos sulfato, que es una característica inusual en los EPS microbianos.

Esta cepa tiene un contenido en G+C de un 61,4 moles%.

OBJETIVOS

En los últimos años el estudio de los sistemas de regulación de genes dependientes de la densidad celular en los microorganismos ha suscitado un gran interés por parte de la comunidad científica.

Desde el año 2004 nuestro grupo de investigación "Exopolisacáridos Microbianos" [BIO 188, (<http://www.ugr.es/~eps/es/index.html>)] ha creado una nueva línea de investigación dedicada a los estudios de quorum sensing y quorum quenching en especies de bacterias halófilas. En consecuencia, se ha descrito por primera vez la producción de moléculas señal de los sistemas quorum sensing en varias especies productoras de exopolisacáridos del género *Halomonas*. En base a este hallazgo, en la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo general el estudiar los mecanismos de la comunicación intercelular en este grupo de bacterias halófilas, particularmente en la bacteria *Halomonas anticariensis* FP35^T y determinar su posible papel en la adaptación al medio ambiente. Para dar cumplimiento a este objetivo se abordaron los objetivos específicos siguientes:

- I. Identificar y caracterizar los genes implicados en el sistema quorum sensing mediado por las moléculas señal AHLs en *H. anticariensis* FP35^T.
- II. Caracterizar el sistema regulador de dos componentes en *H. anticariensis* FP35^T y dilucidar la interrelación que existe entre dicho sistema y el sistema quorum sensing.
- III. Estudiar los fenotipos regulados por los mecanismos de comunicación intercelular en *H. anticariensis* FP35^T y su posible papel en la adaptación al medioambiente.
- IV. Estudiar los sistemas quorum sensing dependientes de moléculas AHLs en una colección de bacterias halófilas pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En la Tabla 6 se relacionan las cepas bacterianas de colección utilizadas en este trabajo junto con sus genotipos y características más relevantes.

Tabla 6. Cepas bacterianas de colección.

Cepas bacterianas	Características relevantes	Referencia
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5a	F ⁻ Φ80d lacZΔM15 Δ(lacZY-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁻) supE44 λ thi-1 girA96 relA1	Woodcock y col., 1989
<i>E. coli</i> HB101	supE44, hsdS20 (rb- mb-), recA13, ara -14, leuB6, pro A2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm ^R), xyl-5, mtf-1	Lacks y Greenberg, 1977
<i>E. coli</i> S17-1 λ-pir	recA, thi, pro, hsdR-M+(RP4: 2-Tc::Mu- Km::Tn7) λpir (Tp ^R , Sm ^R)	Miller y Mekalanos, 1988
<i>E. coli</i> XL1-Blue	supE44, hsdR17, recA1 ggyrA46 thi relA1 lac- F [(proAB+ lacq lacZΔM15 Tn 10 (Tc ^R)]	Bullock y col., 1987
Cepas biosensoras		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	NT1 que contiene una fusión transcripcional traG::lacZ, Gm ^R	Shaw y col., 1997
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	CV017 que contiene cvil::Tn5xylE, Km ^R	McClellan y col., 1997
Cepas bacterianas hálofilas		
<i>Carnimonas nigrificans</i> CTCBS1 ^T		Garriga y col., 1998
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM3043 ^T		Arahal y col., 2001
<i>Cobetia marina</i> DSM4741 ^T		Arahal y col., 2002
<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 ^T		Yoon y col., 2002
<i>H. almeriensis</i> M8 ^T		Martínez-Checa y col., 2005a
<i>H. anticariensis</i> FP35 ^T		Martínez-Cánovas y col., 2004a
<i>H. aquamarina</i> DSM 30161 ^T		Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. campaniensis</i> 5AG ^T		Romano y col., 2005

<i>H. cerina</i> SP4 ^T	González-Domenech y col., 2008a
<i>H. denitrificans</i> M29 ^T	Kim y col., 2007
<i>H. desiderata</i> FB2 ^T	Berendes y col., 1997
<i>H. elongata</i> ATCC 33173 ^T	Vreeland y col., 1980
<i>H. eurihalina</i> ATCC 49336 ^T	Mellado y col., 1995
<i>H. fontilapidosi</i> 5CR ^T	González-Domenech y col., 2009
<i>H. gudaonensis</i> SL014B-69 ^T	Wang y col., 2007b
<i>H. halmophila</i> ATCC 19717 ^T	Franzmann y col., 1988
<i>H. halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. halodurans</i> DSM 5160 ^T	Hebert y Vreeland, 1987
<i>H. koreensis</i> SS20 ^T	Lim y col., 2004
<i>H. magadiensis</i> 21 MI ^T	Duckworth y col., 2000
<i>H. maura</i> S-31 ^T	Bouchotroch y col., 2001
<i>H. meridiana</i> DSM 5425 ^T	James y col., 1990
<i>H. mongoliensis</i> Z-7009 ^T	Boltyanskaya y col., 2007
<i>H. nitroreducens</i> 11S ^T	González-Domenech y col., 2008b
<i>H. organivorans</i> G-16.1 ^T	García y col., 2004
<i>H. pacifica</i> DSM 4742 ^T	Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. pantelleriensis</i> AAP ^T	Romano y col., 1997
<i>H. ramblicola</i> RS-16 ^T	Luque y col., 2012
<i>H. rifensis</i> HK31 ^T	Amjres y col., 2011
<i>H. saccharevitans</i> AJ275 ^T	Xu y col., 2007
<i>H. salina</i> F8-11 ^T	Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. shengliensis</i> SL014B-85 ^T	Wang y col., 2007a
<i>H. stenophila</i> N12 ^T	Llamas y col., 2011
<i>H. subglaciescola</i> DSM 4683 ^T	Franzmann y col., 1987
<i>H. variabilis</i> DSM 3051 ^T	Dobson y Franzmann, 1996
<i>H. ventosae</i> AI12 ^T	Martínez-Cánovas y col., 2004b
<i>Halotalea alkalilenta</i> AW-7 ^T	Ntougias y col., 2007
<i>Kushneria avicenniae</i> MW2a ^T	Sánchez-Porro y col., 2009
<i>Kushneria indalinina</i> CG2.1 ^T	Sánchez-Porro y col., 2009

<i>Kushneria marisflavi</i> SW3a ^T	Sánchez-Porro y col., 2009
<i>Modicisalibacter tunisiensis</i> LIT2 ^T	Ben Ali Gam y col., 2007
<i>Salinicola halophilus</i> CG4.1 ^T	de la Haba y col., 2010
<i>Salinicola salarius</i> M27 ^T	de la Haba y col., 2010

Las bacterias halófilas se cultivaron en tres medios de cultivo, los medios complejos MY y SWYE y el medio mínimo MM. A estos medios se les adicionó una solución stock de sales concentrada al 30% (p/v), denominada SW30% (SW deriva de las iniciales en inglés de "Sea Water"), en la proporción adecuada para obtener diferentes concentraciones (Rodríguez-Valera, 1981). La temperatura habitual de crecimiento para todas las cepas halófilas fue de 32°C.

Las cepas de *E. coli* y las cepas biosensoras *Agrobacterium tumefaciens* y *Chromobacterium violaceum* se sembraron en el medio complejo Luria-Bertani (LB) adicionado de los antimicrobianos apropiados y se incubaron a 37°C y 32°C, respectivamente. En algunos casos la bacteria biosensora *Agrobacterium tumefaciens* fue cultivada en medio MGM o medio AB adicionados de los antimicrobianos apropiados y se incubó a 32°C.

La conservación de las cepas bacterianas a corto plazo se realizó en medio sólido suplementado con los antibióticos adecuados, y fueron mantenidas a 4°C. A largo plazo, se hizo por congelación a -80°C de cultivos líquidos conteniendo glicerol a una concentración final del 20% (v/v).

La composición y preparación de todos los medios de cultivos, así como la solución stock de sales utilizados en este trabajo se describen en el apartado Anexos. Cuando fue necesario, a los medios de cultivo se les adicionaron diferentes compuestos antimicrobianos. Las concentraciones de almacenamiento, los disolventes utilizados para la preparación de las soluciones de antimicrobianos y las concentraciones finales de uso de los mismos se describen en el apartado Anexos.

1.2. Técnicas básicas de biología molecular

Las soluciones y los reactivos utilizados se describen en el apartado Anexos.

1.2.1. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación. Las muestras de ADN plasmídico se almacenaron a -20°C.

Protocolo

1. Recuperación y lisis de las células: Centrifugue 1,5ml de cultivo bacteriano crecido durante una noche (10^9 UFC/ml) a 13.000 r.p.m durante 2 minutos. Resuspenda las células en 200 μ l de la solución de suspensión y agite en el vórtex. Después, añada 200 μ l de la solución de lisis y mezcle suavemente.
 2. Preparación del lisado: Añada 350 μ l de la solución de neutralización, mezcle y centrifugue a 13.000 r.p.m durante 10 minutos.
 3. Preparación de la columna: Añada 500 μ l de la solución correspondiente a la columna y centrifugue a 13.000 r.p.m durante 1 minuto. Deseche el líquido eluido.
 4. Unión del plásmido a la columna: Transfiera el lisado a la columna y centrifugue a 13.000 r.p.m durante 1 minuto. Deseche el líquido eluido.
 5. Lavado de la columna: Añada 750 μ l de la solución de lavado a la columna y centrifugue a 13.000 r.p.m durante 1 minuto. Deseche el líquido eluido. Centrifugue de nuevo a 13.000 r.p.m durante 1 minuto para secar la columna.
 6. Elución del ADN plásmidico: Transfiera la columna a un tubo nuevo, añada 50 μ l de agua bidestilada y centrifugue a 13.000 r.p.m durante 1 minuto.
-

1.2.2. Extracción de ADN genómico

La obtención de ADN genómico se llevó a cabo según el método de Marmur (Marmur, 1961) modificado por Martín-Platero y colaboradores (2007) que se detalla a continuación. Las muestras de ADN genómico se almacenaron a -20°C .

Protocolo

1. Centrifugue 1,5ml de cultivo bacteriano crecido durante una noche (10^9 UFC/ml) a 13.000 r.p.m durante 2 minutos.
 2. Resuspenda las células en 100 μ l de la solución 1. Después añada 0,1g de lisozima (Sigma) y 6 μ l de ARNasa (10mg/ml). Incube a 37°C durante 30 minutos.
 3. Lise las células con 600 μ l de la solución 2. Mezcle por inversión suave. La solución debe quedar transparente. Deje a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
 4. Incube a 80°C durante 5-10 minutos y deje enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 5. Añada 6 μ l de proteinasa K (20mg/ml). Mezcle e incube a 37°C durante 30-45 minutos.
 6. Añada 200 μ l de la solución 3. Agite con vórtex y mantenga en hielo durante 5-10 minutos.
 7. Centrifugue a 13.000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C . Debe quedar un sedimento compacto.
 8. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo y luego añada 600 μ l de isopropanol. Mezcle bien por inversión (10-12 veces) hasta que se vea el precipitado de ADN.
 9. Centrifugue a 13.000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C .
 10. Lave el sedimento 2 veces con 500 μ l de etanol 70° frío (-20°C) mediante centrifugación a 13.000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C .
 11. Deje secar el sedimento durante 10 minutos y resuspenda en 50-100 μ l de agua bidestilada.
-

1.2.3 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó según las recomendaciones del fabricante del kit “Nucleo Spin® RNA II” (Macherey-Nagel) que se detallan a continuación. Las muestras de ARN se sometieron posteriormente a un tratamiento con ADNasa I con el fin de eliminar la contaminación residual de ADN genómico. Para ello se utilizó el kit Turbo DNA-free™ (Ambion). Las muestras se repartieron en alícuotas de 5µl y se congelaron a -80°C para su uso posterior en experiencias de RT-PCR o RT-PCR cuantitativa.

Protocolo

1. Homogenización de la muestra: Resuspenda el sedimento bacteriano de células en tampón TE y 0,2mg de lisozima. Agite mediante vórtex vigorosamente. Incube a 37°C durante 10 minutos.
2. Lisis de las células: Añada 350µl del buffer RA1 y 3,5µl β-mercaptoetanol a las células resuspendidas y agite mediante vórtex vigorosamente.
3. Filtración del lisado: Reduzca la viscosidad y limpie el lisado por filtración a través de una columna. Coloque la columna de filtración (color violeta) en un tubo de recolección, aplique el lisado y centrifugue 1 minuto a 10.000 r.p.m. Transfiera el filtrado a un nuevo tubo de centrifuga libre de ARNasa.
4. Ajuste de las condiciones de unión del ARN: Añada 350µl de etanol 70° al filtrado resultante del paso anterior y mezcle por vórtex o pipeteo. Observe un precipitado que no afectará al proceso y cargue todo en la columna.
5. Unión del ARN: Tome una columna de unión a ARN (color azul) y un tubo de recolección y añada el lisado. Centrifugue a 9.000 r.p.m durante 30 segundos. Coloque la columna en un nuevo tubo de recolección.
6. Desalado de la membrana del gel de sílice: Añada 350µl de tampón de desalado de membrana (MDB) y centrifugue a máxima velocidad 10.000 r.p.m durante 1 minuto para secar la membrana. La eliminación de las sales producirá una digestión de la ADNasa I mucho más efectiva. Evite el contacto del final de la columna con el líquido a desechar.
7. Digestión del ADN: Prepare la mezcla de reacción de la ADNasa en un microtubo estéril. Para cada extracción, añada 10µl de ADNasa I reconstituida y 90µl de tampón de reacción ADNasa I. Mezcle y, posteriormente, aplique 95µl de la mezcla de la reacción de la ADNasa I directamente en el centro de la membrana del gel de sílice de la columna. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Lavado y secado de la membrana del gel de sílice:
Primer lavado: Añada 200µl del tampón RA2 a la columna. Centrifugue a 10.000 r.p.m durante 1 minuto. Coloque la columna en un nuevo tubo de recolección. Este tampón inactivará la ADNasa I.
Segundo lavado: Añada 600µl del tampón RA3 a la columna. Centrifugue a 10.000 r.p.m durante 1 minuto. Deseche el líquido y coloque de nuevo la columna en el tubo de recolección.
Tercer lavado: Añada 250µl del tampón RA3 a la columna. Centrifugue a 10.000 r.p.m durante 2 minutos para secar completamente la membrana. Coloque la columna en un microtubo de 1,5ml. Si por alguna razón el líquido toca la columna después de la centrifugación repita el proceso.
9. Elución del ARN: Eluya el ARN en 45µl de agua libre de ARNasas (suministrada) y centrifugue a 10.000 r.p.m durante 1 minuto. Inmediatamente después, ponga el ARN eluido en hielo y guárdelo a -80°C para evitar su degradación.

1.2.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN

Para determinar la concentración de ADN o ARN se utilizó el método de cuantificación por fluorescencia del bromuro de etidio en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001), mediante la comparación visual de la intensidad luminosa de las bandas.

Para mayor precisión, la concentración de las muestras de ADN o ARN se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000c (Thermo scientific), adoptando las recomendaciones del manual de Sambrook y Russell (2001). La pureza de la muestras viene dada por la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . En general, se acepta que un ADN o ARN es puro cuando dichos cocientes son $\sim 1,8$ y $\sim 2,0$ respectivamente (Kalb y Bernlohr, 1977). Un valor de estos cocientes por debajo de 1,8 fue indicativo de contaminación por proteínas y/o polisacáridos.

1.2.5. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

La separación tanto de plásmidos, como de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Ecogen) cuya concentración osciló entre 0,7 y 2% (p/v), preparados en tampón TBE 1x. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10V/cm.

Las muestras de ARN se separaron y visualizaron en geles horizontales de agarosa al 0,8-1% (p/v) preparados en tampón TAE 1x. Para eliminar posibles contaminaciones de ARNasas se realizaron los siguientes tratamientos: todo el material de electroforesis se lavó previamente con etanol absoluto y se enjuagó con H₂O DEPC; el tampón TAE 1x se preparó por dilución del 50 veces concentrado en H₂O DEPC; todo el material de vidrio empleado se esterilizó en horno Pasteur durante 4 horas para eliminar las posibles ARNasas.

Para visualizar el ADN o ARN, los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos. El ADN o ARN se visualizó tras la exposición del gel a la luz ultravioleta (254nm). El tamaño de las moléculas de ácidos nucleicos se determinó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando patrones de masas moleculares: HyperLadder™ I y IV (Bioline). Las imágenes se recogieron mediante un transiluminador (Bio-Rad) con una video-cámara empleando el programa Gel Doc 2000 (Quantity one) de Bio-Rad.

1.2.6. Purificación de ADN de soluciones y geles de agarosa

La purificación y concentración de ADN a partir de productos de PCR, digestiones con enzimas de restricción, soluciones y bandas cortadas de geles de agarosa se realizó utilizando el kit "illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (GE Healthcare).

1.2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas, fijadas por el fabricante para cada enzima (Roche, Promega y New England Biolabs). Cuando se realizaron digestiones con más de una enzima se utilizó un tampón compatible a la concentración adecuada.

1.2.8. Desfosforilación y purificación del vector de clonación

La desfosforilación de los extremos 5' del ADN del vector de clonación tiene como objetivo impedir la religación del mismo y favorecer su ligación con el inserto. El vector, previamente digerido con el enzima de restricción correspondiente, se trató con el enzima fosfatasa alcalina de intestino de becerro (Roche) para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5'. La reacción se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y se incubó a 37°C durante una hora. Posteriormente se inactivó la fosfatasa alcalina mediante un tratamiento de 15 minutos a 65°C.

Para eliminar los restos de proteínas y de sales después de la digestión y desfosforilación del ADN del vector, la muestra se diluyó hasta 200µl con tampón TE, se le añadió un volumen de fenol: cloroformo (1:1), y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 4 minutos a 4°C, transfiriéndose la fase acuosa a un nuevo tubo. El ADN se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y tres volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y se dejó a -80°C durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 13.000 r.p.m, se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1ml de etanol 70°. Finalmente el ADN precipitado se dejó secar a 37°C y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

1.2.9. Reacción de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación, los fragmentos de restricción de ADN se mezclaron con el correspondiente vector previamente linearizado y desfosforilado, en relaciones molares vector/inserto variables dependiendo del tamaño del fragmento a clonar. La reacción se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante de la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en un volumen final de 10µl. Para fragmentos romos la reacción de ligación se incubó toda la noche a una temperatura entre 15 y 20°C. En el caso de ligaciones de fragmentos cohesivos la reacción se incubó durante 3 horas a 22°C o toda la noche a 4°C. Esta mezcla se utilizó directamente para la transformación.

1.2.10. Amplificación de ADN

a) Amplificación de ADN mediante PCR convencional

Este método se utilizó con diferentes fines: la obtención de fragmentos de ADN para su posterior clonación, la comprobación de clones, y experiencias de RT-PCR. La reacción de PCR contenía:

ADN molde	20-100ng (1µl)
Cebador directo (10µM)	4µM (2µl)
Cebador reverso (10µM)	4µM (2µl)
dNTPs (10mM)	0,2mM (1µl)
Tampón (10X)	1X (5µl)
MgCl ₂ (25mM)	2mM (4µl)
Taq-ADN polimerasa	5U (0,5µl)
Agua bidestilada	c.s.p. 50µl

Los parámetros de la reacción de PCR se eligieron en función del tamaño de los fragmentos de ADN a amplificar, temperatura de hibridación de los cebadores y tiempo de elongación. En general, tras una desnaturalización previa a 95 ó 98°C durante 5 minutos, se aplicaron 30 ciclos constituidos por 3 etapas: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos; hibridación de los cebadores a 55-65°C durante 30 segundos; extensión a 72°C durante 1 minuto por cada kb a amplificar; y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Al concluir la reacción, el tamaño y la calidad de los productos se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados y utilizados en este trabajo, así como su función se describen en el Material Suplementario de cada capítulo. En los casos en los que se quería introducir un punto de corte para una determinada enzima de restricción, se añadieron unas “coletillas” al principio de cada cebador para dar lugar a la la secuencia de reconocimiento de dicha enzima.

b) Amplificación de ADN mediante PCR inversa

La amplificación por PCR convencional tiene una limitación porque requiere el uso de dos cebadores que flanqueen y definan la región que será amplificada y por ello, no es posible la amplificación de secuencias desconocidas. Sin embargo, la estrategia denominada PCR inversa (Ochman y col., 1988) permite soslayar esta limitación y amplificar secuencias desconocidas de ADN que estén próximas a otra conocida, que actúa como cebador. Esta técnica se realizó en varias etapas (Figura 16):

1. En primer lugar se diseñó una sonda de aproximadamente 200pb en el extremo de la secuencia conocida próxima a la secuencia que queríamos amplificar. Posteriormente dicha sonda se amplificó y marcó con digoxigenina mediante PCR.
2. A continuación se realizaron digestiones del ADN genómico con enzimas de restricción que no presentaban sitios de corte en la región que constituía la sonda, pero sí en una zona cercana. Los fragmentos generados se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de nylon mediante Southern blot.

3. Seguidamente se procedió a la hibridación con la sonda marcada y al revelado de la membrana. Se seleccionaron aquellas enzimas que generaron fragmentos de un tamaño adecuado para su posterior amplificación y clonaje (1-5kb).

4. Una vez seleccionada la enzima de restricción, la reacción se dializó en agua bidestilada estéril durante 15 minutos con filtros de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,025 μ m y 13mm de diámetro (Millipore). Seguidamente se realizaron diversas diluciones de la mezcla de fragmentos de restricción (1:10; 1:20; 1:40; 1:50; 1:100) y se llevaron a cabo reacciones de religación utilizando 4 μ l de cada una de las diluciones en un total de 10 μ l. De esta forma se realizó el ligado intramolecular de los fragmentos de restricción para formar moléculas circulares.

5. Antes de realizar la reacción de PCR, el ADN religado se dializó nuevamente durante 15 minutos en agua bidestilada estéril con filtros de nitrocelulosa (Millipore).

6. A continuación, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como ADN molde la mezcla de fragmentos religados. Los cebadores utilizados se diseñaron en sentido divergente, es decir, a partir de la región de secuencia conocida pero orientados hacia el exterior de la misma, tal y como se muestra en la Figura 16. La longitud de cada cebador fue de 25 a 30pb y con un alto contenido en G+C para que la T_m fuera superior a 72°C. Las secuencias de los cebadores se describen en el Material Suplementario de cada capítulo. Se utilizaron ADN polimerasas de alta fidelidad con el fin de que se cometieran los menos errores posibles (Taq ADN polimerasa Pfu Turbo[®], Stratagene). Los parámetros de los ciclos de la reacción de PCR fueron optimizados en cuanto a la temperatura de hibridación de los cebadores y tiempo de elongación dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar. En general, tras un primer calentamiento a 98°C durante 2 minutos, se aplicaron 35 ciclos constituidos por tres etapas: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 72°C durante 30 segundos; y extensión a 72°C durante 1 minuto por kilobase a amplificar. Por último, un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa. En esta reacción de PCR, la ADN polimerasa amplificó específicamente un fragmento lineal con origen y final en la zona conocida.

7. Por último, se procedió a clonar el fragmento amplificado en un vector. Cuando se produjo una reacción de PCR inespecífica en la que aparecía una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños, se extrajo del gel de agarosa el fragmento del tamaño esperado. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector comercial pGEM[®]-T (Tabla 7).

8. Una vez clonado, el fragmento se secuenció utilizando los cebadores universales correspondientes al vector de clonación empleado y de diseño (véase la secuencia de los cebadores en el apartado Material Suplementario de cada capítulo).

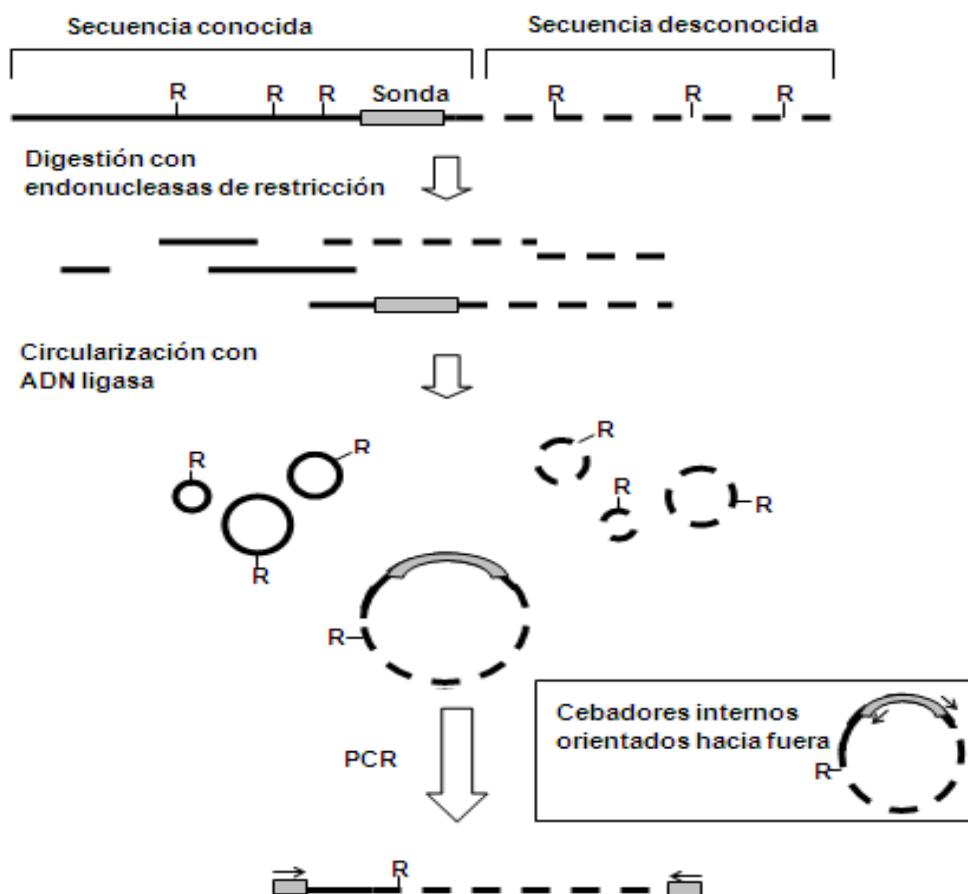


Figura 16. Esquema de la estrategia seguida para la amplificación de secuencias desconocidas mediante PCR inversa.

1.2.11. Clonación de ADN

Para la clonación de productos de PCR, el vector de elección fue pGEM-T, componente del kit pGEM[®]-T Vector System (Promega).

En la Tabla 7 se describen los plásmidos utilizados en este trabajo. En el Material Suplementario de cada capítulo se describen los plásmidos recombinantes que hemos construido en este trabajo.

Tabla 7. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente o Referencia
pGEM [®] -T	Ap ^R , vector de clonación de productos de PCR	Promega
pUC19	Ap ^R , <i>oriColE1</i> , <i>rop</i> , MCS, complementación α	Vieira y Messing, 1982
pPCR-Script Amp SK(+)	Ap ^R , <i>oriColE1</i> , <i>rop</i> , MCS, complementación α	Stratagene

pUT mini-Tn5 Km2	Ap ^R , Km ^R , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i>	De Lorenzo y col., 1990
pJQ200-KS	Gm ^R , <i>oriV</i> , <i>sacB</i> , <i>mob⁺</i> , complementación α	Quandt y Hynes, 1993
pVIK112	Km ^R , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , sin promotor, <i>lacZY</i>	Kalogeraki y Winans, 1997
pMP220	Tc ^R , vector desprovisto de promotor, <i>IncP</i> , <i>lacZ</i>	Spaink y col., 1987
pJN105	Gm ^R , vector de expresión, pBBR1MCS5 que contiene el cassette <i>araC-P_{BAD}a</i>	Newman y Fuqua, 1999
pMS402-EOG	Gm ^R , vector desprovisto de promotor y contiene el gen registrador <i>lux</i>	Duan y col., 2003

1.2.12. Transformación y conjugación bacteriana

a) Transformación por electroporación

La preparación de células competentes de las cepas XL1-Blue, DH5 α y S17-1 λ *pir* de *Escherichia coli* para electroporación se realizó siguiendo el método de Hanahan (1983) (véase el apartado de Anexos). La transformación de las células competentes con ADN plasmídico se llevó a cabo según el método de electroporación siguiente descrito en el Manual de Sambrook y Russell (2001).

Protocolo

1. Descongele lentamente en hielo un vial con una alícuota de 40 μ l de células competentes.
2. Añada el ADN a transformar a las células competentes, mezcle e incube 1 minuto en hielo.
3. Transfiera la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2cm preenfriada en hielo.
4. Coloque la cubeta (modelo BXT^M) con la mezcla en el electroporador (Bio-Rad) y de un pulso de choque eléctrico (2.5kV, 5 milisegundos).
5. Suspenda la mezcla en 450 μ l de medio SOB e incube a 37°C durante una hora en agitación a 225 r.p.m.
6. Siembre 50 ó 100 μ l de la mezcla en placas con medio LB suplementado con los antimicrobianos adecuados y, en su caso, con IPTG y X-gal.
7. Incube las placas a 37°C durante 12-16 horas.

b) Transformación por choque térmico

La preparación de células competentes de las cepas XL1-Blue, DH5 α y S17-1 λ *pir* de *Escherichia coli* con CaCl₂ (véase el apartado Anexos) y su posterior transformación mediante choque térmico con ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo siguiente descrito en el manual de Sambrook y Russell (2001).

Protocolo

1. Descongele lentamente en hielo un vial con una alícuota de 40 μ l de células competentes.
 2. Añada el ADN a transformar, generalmente 10 μ l, e incube en hielo durante 30 minutos.
 3. Someta la mezcla de células y ADN a un choque térmico de 45 segundos a 42°C, y seguidamente 2 minutos en hielo.
 4. Añada 450 μ l de medio SOB e incube a 37°C durante una hora en agitación a 225 r.p.m.
 5. Siembre 50 ó 100 μ l de la mezcla en placas con medio LB suplementado con los antimicrobianos adecuados y, en su caso, con IPTG y X-gal.
 6. Incube a 37°C durante 12-16 horas.
-

c) Conjugación

Las diferentes construcciones plásmidicas utilizadas en este trabajo han sido transferidas desde cepas de *E.coli* S17 λ pir a las cepas de *Halomonas* mediante conjugación biparental siguiendo el siguiente protocolo.

Protocolo

1. Parta de cultivos de 24h de las bacterias donadora y receptora en un medio de cultivo líquido con los antibióticos adecuados. Tanto los medios como las condiciones de incubación deben ser las óptimas para cada cepa.
 2. Centrifugue los cultivos bacterianos durante 2 minutos a 13.000 r.p.m y lave dos veces con el medio correspondiente para eliminar los restos de antimicrobianos y sales.
 3. Resuspenda las células bacterianas en 100 μ l del medio de cultivo correspondiente.
 4. Mezcle las suspensiones bacterianas en proporciones 1:1 ó 1:2 (donador:receptor). Las distintas proporciones se deben a la diferencia de tiempo de generación de cada bacteria.
 5. Deposite la mezcla sobre un filtro Millipore estéril de 0,22 μ m de diámetro de poro, colocado sobre una placa Petri con medio sólido. Incube la placa a 32°C durante 16 horas.
 6. Resuspenda la mezcla de conjugación en 0,85ml de solución salina estéril.
 7. Realice diluciones seriadas de la mezcla de conjugación y siembre 100 μ l en los medios selectivos correspondientes, adicionados con los antibióticos apropiados. Siembre el donador y el receptor en paralelo en los mismos medios selectivos como control. Añada una solución estéril de glicerol al 20% (v/v) a la mezcla de conjugación remanente y conserve a -20°C.
 8. Incube las placas a 32°C durante 3-5 días.
-

1.2.13. Hibridación ADN-ADN

a) Transferencia de ADN a un soporte sólido por capilaridad

Una vez separadas las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa, se depurizaron por inmersión del gel en una solución HCl 0,25M, produciendo roturas en el ADN que facilitaron su posterior transferencia. A continuación se desnaturalizaron en una solución de NaOH 0,5M y NaCl 1M y se neutralizaron con Tris-HCl 1M pH=8 y NaCl 0,5M, tal y como se describe en el manual de Sambrook y Russell (2001). Seguidamente el ADN se transfirió durante

16 horas a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N, Amersham, 0,45 μ m de diámetro de poro), siguiendo la técnica de Southern (1975) y utilizando SSC 20x (cloruro sódico, 3M; citrato sódico, 0,3M) como solución de transferencia. La membrana se lavó posteriormente con SSC 2x durante 5 minutos y el ADN se fijó utilizando el horno de luz UV 2x 1.200J (UV Cross-linking, Stratagene) durante 3 minutos.

b) Preparación de sondas y marcaje

El marcaje con digoxigenina de la sonda de ADN y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando bien el sistema comercial "DIG DNA Labeling and detection kit" (Boehringer-Mannheim) o por PCR según requería el experimento.

Marcaje de ADN lineal. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit mencionado anteriormente. Las sondas de ADN se marcaron con DIG-11-dUTP mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos.

Marcaje de sondas por PCR. Las sondas empleadas en las hibridaciones ADN-ADN se marcaron por PCR utilizando DIG-11-dUTP, que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq polimerasa reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La reacción de PCR contenía: ADN molde, 0,5-1 μ g; cebadores, 20pmoles; tampón (con MgCl₂) Taq-ADN polimerasa (1x); dNTPs-DIG, cada uno 0,2mM (la proporción dTTP:DIG-11-dUTP utilizada fue de 9:1); Taq-ADN polimerasa, 1-5 unidades; H₂O bidestilada hasta 50 μ l. Los cebadores utilizados se describen en el apartado del Material Suplementario de cada capítulo. Los parámetros tiempo y temperatura se optimizaron según requería el experimento.

c) Prehibridación e hibridación

Las membranas que contenían el ADN se colocaron en un tubo para el horno de hibridación Techne hybridiser HB-1D (Cambridge) y se dejaron prehibridar durante 4 horas con el líquido de hibridación DIG EASY HIB (Boehringer-Mannheim) en una proporción de 20ml/cm² y a una temperatura de hibridación de 42°C. Tras el tiempo de prehibridación, se retiró la solución y se añadieron 100-200ng de sonda marcada, previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 99°C, a un volumen de 2,5 ml/100cm² de líquido de hibridación. La hibridación se mantuvo durante 16 horas bajo las mismas condiciones de la prehibridación. Posteriormente se realizaron los lavados de la membrana en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de SDS al 0,1% (p/v) en SSC 2x; y dos lavados de 5 minutos a 68°C en una solución de SDS al 0,1% (p/v) en SSC 0,5x.

d) Reacción inmunológica de detección de híbridos ADN-ADN

Para el revelado de la membrana se siguió el protocolo descrito en el kit utilizado para la hibridación (DIG EASY HIB, Boehringer-Mannheim). Se basa en una reacción de inmunoensayo altamente específica mediante contacto de la membrana con una solución de anticuerpo que lleva unido una fosfatasa alcalina (antidigoxigenina-fosfatasa alcalina conjugada). Tras varios lavados para eliminar el anticuerpo que no se encontraba unido, se añadió una solución con sustratos cromogénicos, nitroblue tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato (X-fosfato). Se dejó en oscuridad y se observó un precipitado color azul sobre el filtro en las bandas donde existía homología ADN-ADN.

1.2.14. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN

a) Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en el servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (CSIC, Granada), utilizando un secuenciador automático de Applied Biosystems modelo 373 STRECHT. El método de secuenciación fue el comercializado por Perking Elmer, ABI PRISM™ "Byg Dye Terminators", que utiliza en la reacción de extensión la enzima AmpliTaq ADN polimerasa y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como iniciadores en la secuenciación fueron cebadores universales comerciales (R40, Sp6, T3 y T7) y otros internos de diseño que se describen en el apartado de Material Suplementario de cada capítulo.

b) Análisis de las secuencias de ADN

Para el análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidos (identificación de marcos abiertos de lectura, sitios de restricción, uso de codones, composición de aminoácidos, perfil de hidrofobicidad, etc.) se utilizó el programa DNASTAR.

Para el diseño de cebadores se utilizó el programa Primer3 (Whithead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA) (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

La comparación de nuevas secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las distintas bases de datos (EMBL, GenBank, DDJB y UniProt), se realizó con la ayuda del programa BLAST (Altschul y col., 1997) del servidor de Internet del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los alineamientos de estas secuencias se realizaron con el programa CLUSTALW2 que se encuentra en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Para la predicción de regiones promotoras se utilizó el programa BPROM [Softberry, Mt. Kisco, NY, USA (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>)].

Los dominios conservados de las proteínas se analizaron con el programa SMART (<http://http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic y col., 2006).

El programa MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) se empleó para la predicción de estructuras secundarias en el ARN, y así determinar los posibles terminadores transcripcionales.

Para el análisis filogenético se utilizó el programa MEGA versión 4.0.2 (Tamura y col., 2007).

1.3. Ensayos de expresión génica mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa

1.3.1. Retrotranscripción-PCR (RT-PCR)

Mediante RT-PCR se puede determinar la presencia o ausencia de ARNm en una muestra. Se trata de una técnica semicuantitativa que determina la expresión de un gen. En nuestro caso se empleó con dos objetivos: uno, para dilucidar si un conjunto de genes formaban o no parte de una única unidad transcripcional, es decir, si constituían un operón; y dos, para determinar la expresión de un gen en concreto.

Con las muestras de ARN libres de ADN genómico se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con el producto comercial “SuperScript III one-step RT-PCR System” (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En un paso, el ADNc fue sintetizado a 55°C durante 30 minutos a partir de una concentración de 0,05-0,5µg del ARN total en un volumen final de 50µl y seguidamente mediante PCR se amplificaron los diferentes amplicones utilizando los cebadores específicos en cada caso (véase el apartado de Material Suplementario de cada capítulo). La reacción de PCR consistió en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguida de una etapa de 35 ciclos de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Como etapa final, una extensión a 68°C durante 7 minutos. La temperatura de hibridación de los cebadores y el tiempo de extensión variaron según el tipo de experimento realizado. En todos los ensayos de RT-PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos de RT-PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

1.3.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR cuantitativa)

La PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o ARNm de una muestra.

Para cuantificar la expresión relativa de los genes objeto de estudio se combinó la PCR a tiempo real con una reacción de retrotranscripción. Para ello, se extrajo el ARN total a partir de cultivos bacterianos crecidos a diferentes etapas de crecimiento, al principio de las fases exponencial y estacionaria, siguiendo la metodología descrita anteriormente (apartado 1.2.3). Las preparaciones de ARN (1µg) se trataron con ADNasa libre de ARNasa (Ambion), y

posteriormente el ADNc fue sintetizado con el kit “iScript™ cDNA synthesis” (Bio-Rad), utilizando los oligonucleótidos hexámeros aleatorios incluidos en el kit.

Para la PCR cuantitativa se diseñaron oligonucleótidos internos específicos de cada gen (véase el apartado de Material Suplementario de cada capítulo) y posteriormente se realizaron los ensayos de PCR cuantitativa en un sistema detector iCycler iQ (Bio-Rad). Todas las reacciones se realizaron en triplicado para obtener los valores de desviación estándar.

Protocolo

1. Cada reacción contenía la mezcla siguiente:

ADNc o una dilución del ADNc	
(1:10.000 para la amplificación del gen 16S)	1 μ l
Cebador directo (10 μ M)	0,2 μ l
Cebador reverso (10 μ M)	0,2 μ l
2x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)	10 μ l
Agua libre de nucleasas	c.s.p 20 μ l

2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

95°C durante 3 minutos (desnaturalización)

40 ciclos de:

95°C durante 10 segundos (desnaturalización)

62°C durante 30 segundos (hibridación)

72°C durante 30 segundos (extensión)

3. Al final de los ciclos de la PCR cuantitativa a tiempo real se generó una curva de fusión para comprobar la uniformidad del producto generado.
-

Para cada uno de los genes, el análisis de las curvas de fusión mostró un pico limpio sin productos inespecíficos ni artefactos. Las curvas de calibrado fueron obtenidas de plásmidos recombinantes que contenían fragmentos del gen de interés. La expresión relativa de cada gen se analizó mediante el programa REST-MCS (Pfaffl y col., 2002) utilizando el gen ARN 16S para la normalización.

1.4. Determinación de la actividad promotora

La determinación de la actividad promotora se llevó a cabo mediante los ensayos de la actividad β -galactosidasa según el método descrito por Miller y colaboradores (1972) y que se detalla a continuación. Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β -galactosidasa, es hidrolizado en galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su concentración puede determinarse espectrofotométricamente.

Protocolo

1. Prepare un inóculo de la bacteria a estudiar en condiciones óptimas.
2. Haga un subcultivo, en una proporción de 1:100, en medio de cultivo fresco e incúbelo hasta alcanzar la densidad óptica indicada para la medida.

Preparación de las células

3. Ponga el subcultivo en hielo durante 20 minutos.
4. Centrifugue un volumen de células a 13.000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C y descarte el sobrenadante.
5. Resuspenda las células en el mismo volumen del tampón Z preenfriado.
6. Mida la D.O._{600nm} utilizando como blanco el tampón Z.
7. Mezcle 0,1ml de células con 0,9ml de tampón Z con β-mercaptoetanol.
8. Añada 20μl de cloroformo y una gota de SDS al 0,1% (p/v). Agite vigorosamente en vórtex.
9. Ponga los tubos a 28°C durante 5 minutos en un baño maria.

Ensayo

10. Añada 200μl de la solución ONPG (4mg/ml) a cada tubo, agite bien y vuelva a incubar a 28°C. Espere que aparezca el color amarillo debido a la reacción (mínimo 30 minutos). Apunte el tiempo transcurrido.
11. Pare la reacción añadiendo 0,5ml de la solución Na₂CO₃ 1M.
12. Centrifugue las células durante 15 minutos a 13.000 r.p.m y transfiera el sobrenadante a una cubeta y mida la absorbancia a una longitud de onda de 420nm.
13. Calcule la actividad β-galactosidasa en Unidades de Miller de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = [\text{Absorbancia}_{420\text{nm}} / (t \times v \times \text{D.O.}_{600\text{nm}})] * 1.000$$

t representa el tiempo de la reacción en minutos.

v representa el volumen en ml de la suspensión de células en tampón Z.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en cada caso se calculó la desviación estándar.

1.5. Construcción de una librería genómica de promotores

Para determinar los genes regulados por el sistema quorum sensing en *H. anticariensis* FP35^T se construyó una librería genómica de promotores en el vector pMS402 (véase Tabla 7). Una característica importante de este vector es el gen informador *luxCDABE* que no requiere la adición de sustratos ni conlleva tratamientos posteriores para producir luz a partir de un promotor activo (Meighen y Szittner, 1992). Al ser un vector desprovisto de promotor garantiza que las cepas que contienen este vector no sean luminiscentes.

Para llevar a cabo la construcción de la librería aleatoria de promotores, se extrajo el ADN genómico de la cepa FP35^T, que fue digerido con la enzima de restricción *Sau3A*I. Los pequeños fragmentos de ADN obtenidos (aproximadamente entre 200pb-3.000pb) fueron clonados

corriente arriba del plásmido pMS402 que previamente fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI y tratado con fosfatasa alcalina. Se ensayaron diferentes reacciones de ligación. Las moléculas recombinantes obtenidas fueron transformadas en la cepa S17 λ pir de *E. coli* mediante electroporación, obteniéndose una librería aleatoria de promotores en *E. coli* (LAP-*Ec*). Para determinar el nivel de representación de la librería se llevó a cabo un análisis preliminar de insertos de los transformantes mediante PCR de las colonias, empleando cebadores que flanquean la zona de inserción de los fragmentos (los cebadores se describen en el apartado de Material Suplementario de cada capítulo).

La librería LAP-*Ec* fue transferida mediante conjugación en masa a una cepa FP35 de *H. anticariensis* deficiente en la producción de moléculas señal AHLs según hemos descrito anteriormente en el apartado 1.2.12c. Los transconjugantes obtenidos fueron inoculados en el medio de la conjugación con los antimicrobianos apropiados obteniéndose así una librería aleatoria de promotores en *H. anticariensis* (LAP-*Ha*).

El chequeo de la LAP-*Ha* en busca de genes regulados por quorum sensing se llevó a cabo en medio no suplementado con AHLs y en medio suplementado con AHLs. Para ello, los transconjugantes de la LAP-*Ha* fueron inoculados en placas microtiter de 96 pocillos con medio SWYE al 2% (p/v) de sales adicionado con kanamicina (50 μ g/ml) y gentamicina (50 μ g/ml) y se incubaron a 30°C durante una noche. A partir de los cultivos obtenidos se inocularon placas microtiter con medio de cultivo sin y con una mezcla de AHLs (C_{4r}, C_{6r}, C₈ y C₁₂-HSL) a una concentración final de 1 μ M. Las placas se incubaron a 30°C. Tras 24 horas de incubación, se midió la D.O._{600nm} y la luminiscencia en el luminómetro 2104 EnVision® (PerkinElmer) en placas microtiter negras de 96 pocillos con el fondo transparente. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a la densidad óptica. Finalmente, los clones que mostraron una diferencia de expresión por encima de 1,5 veces fueron elegidos para un segundo chequeo.

2. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE MOLÉCULAS AHLs

2.1. Extracción y concentración de las AHLs

La extracción de moléculas señal AHLs se llevó a cabo según el siguiente método descrito en estudios previos (Llamas y col., 2004; 2005; Marketon y González, 2002).

Protocolo

1. Inocule 10ml de medio de cultivo MY líquido con la cepa a estudiar e incúbela en condiciones óptimas hasta alcanzar la fase estacionaria.
2. Mezcle un volumen del cultivo bacteriano con un volumen de diclorometano. Agite vigorosamente y después centrifugue a 4.000 r.p.m durante 10 minutos.
3. Recoja la fase orgánica.
4. Haga una segunda extracción con un volumen de diclorometano (repita los pasos 2 y 3).

5. Combine las dos extracciones y evapore la fase orgánica mediante rotaevaporador.
6. Resuspenda el sedimento en 20 μ l de una mezcla metanol:agua (7:3, v/v).
7. Conserve las muestras a -20°C.

2.2. Detección y caracterización de las AHLs

Tras la extracción de las AHLs se procedió a la detección y caracterización de las mismas mediante ensayos en placa y cromatografía en capa fina (TLC) utilizando los microorganismos biosensores que se describen en la Tabla 8. Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas biosensoras vienen detallados en el apartado Anexos.

Tabla 8. Características de las cepas biosensoras utilizadas en este trabajo.

Cepa biosensora	Rango de detección de AHLs	Sistema informador	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	3-oxo-C₈-HSL* Todas las 3-oxo-HSLs C ₆ -HSL C ₈ -HSL C ₁₀ -HSL C ₁₂ -HSL C ₁₄ -HSL C ₆ -3-OH-HSL C ₈ -3-OH-HSL C ₁₀ -3-OH-HSL	β -galactosidasa	(Shaw y col., 1997; Farrand y col., 2002)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	C ₄ -HSL C₆-HSL* C ₈ -HSL 3-oxo-C ₆ -HSL 3-oxo-C ₈ -HSL	Pigmento violaceína	(McClellan y col., 1997)

* Las cepas biosensoras responden preferiblemente a las AHLs en negrita (Steindler y Venturi, 2007).

2.2.1. Detección de las AHLs mediante ensayo en placa

En este ensayo se impregnaron discos de papel de filtro con los extractos de AHLs. Tal y como se describe a continuación.

Protocolo

1. Cultive las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 o *A. tumefaciens* NTL4 en medio LB líquido adicionado de los antibióticos adecuados a 30°C durante una noche.
2. Diluya los cultivos de las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 o *A. tumefaciens* NTL4 1:100 en medio fresco y viértalos en placas Petri con medio LB/MC o AB/X-gal, respectivamente.
3. Deje secar la sobrecapa y coloque discos de papel whatman de 5mm de diámetro en la superficie de los medios de cultivo.
4. Deposite en los discos los extractos de AHLs de las muestras que se quieran ensayar.
5. Incube las placas a 30°C durante una noche y examine la aparición de un color.

2.2.2. Análisis de las AHLs mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La caracterización de las AHLs se llevó a cabo siguiendo la metodología siguiente descrita por Shaw y colaboradores (1997).

Protocolo

Separación de las AHLs

1. Lave la cubeta cromatográfica con agua destilada y séquela bien.
2. Equilibre la cubeta con 100ml de una mezcla metanol:agua (7:3, v/v).
3. Trace una línea con un lápiz a un 1cm por debajo del borde inferior de la placa del gel de sílice RP-C₁₈ TLC (Whatman).
4. Deposite sobre la línea 5µl de los extractos y déjelas secar.
5. Introduzca la placa TLC en la cubeta cromatográfica y cierre bien la tapadera con vaselina.
6. Permita el desarrollo de la cromatografía hasta que el frente quede a 1cm de la parte superior de la placa.
7. Deje secar la placa y revele con las cepas biosensoras.

Revelado con las cepas bioindicadoras

8. Haga un subcultivo de las cepas biosensoras sembradas el día anterior:
 - Inocule 25ml de medio LB con 250µl de cultivo de *C. violaceum* CV026 e incube a 30°C durante 4-6h.
 - Inocule 25ml de medio MGM con 250µl de cultivo de *A. tumefaciens* NTL4 e incube a 30°C durante 6-8h
 9. Adicione sobre la placa de cromatografía una sobrecapa de bacteria indicadora compuesta por:
 - C. violaceum* CV026:
 - 10ml de agar 0,7% (p/v)
 - 10ml de cultivo de *C. violaceum* CV026
 - A. tumefaciens* NTL4:
 - 10ml de medio MGM
 - 10ml de cultivo de *A. tumefaciens* NTL4
 - 10ml de agar al 1,5% (p/v)
 - 120µl X-gal (20mg/ml stock)
 10. Incube la placa TLC a 30°C durante una noche.
-

Como controles se emplearon las AHLs sintéticas siguientes: [*N*-(β-Ketocaproil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C₆-HL)] (Sigma), [*N*-butiril-DL-homoserín lactona (C₄-HL)] (Fluka), [*N*-hexanoil-DL-homoserín lactona (C₆-HL)] (Fluka), [*N*-octanoil-DL-homoserín lactona (C₈-HL)] (Fluka), [*N*-decanoil-DL-homoserín lactona (C₁₀-HL)] (Sigma) y [*N*-dodecanoil- DL-homoserín lactona (C₁₂-HL)] (Fluka).

2.3. Cuantificación de las AHLs

La cuantificación de las AHLs se llevó a cabo mediante ensayos de la actividad β -galactosidasa utilizando el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en cada caso se calculó la desviación estándar tal y como se detalla a continuación.

Protocolo

1. Prepare un inóculo de la bacteria biosensora *A. tumefaciens* NTL4 en medio MGM crecido a 32°C en agitación toda la noche.
 2. Haga un subcultivo, en una proporción de 1:100, en medio MGM fresco que contenga los extractos AHLs a analizar e incube a 32°C con agitación hasta alcanzar la densidad óptica indicada para la medida.
 3. Siga los pasos de preparación de células y ensayo β -galactosidasa descritos anteriormente en el protocolo del apartado 1.4.
-

3. CONSTRUCCIÓN Y COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES

Todos los mutantes y cepas complementadas obtenidos en este trabajo fueron confirmados por PCR y secuenciación.

3.1. Mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5Km2 en *Halomonas anticariensis*

Con el objetivo de obtener mutantes deficientes en la síntesis de moléculas señal (AHLs) de la cepa FP35^T de *H. anticariensis*, se llevaron a cabo experiencias de mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5Km2. La transferencia del transposón mini-Tn5Km2 se hizo vía conjugación biparental, siguiendo la técnica de Herrero y colaboradores (1990), adaptada para trabajar con microorganismos halófilos productores de exopolisacárido (Llamas y col., 2000).

La bacteria donadora del transposón fue la cepa S-17-1 λ_{pir} de *E. coli* portadora de un minitransposón con marcador de resistencia a kanamicina (mini-Tn5Km2), vehiculizado en el plásmido suicida pUTmini-Tn5Km2. Como cepa receptora se empleó un mutante espontáneo resistente a rifampicina de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* (FP35-R). Se partió de cultivos en fase logarítmica del donador y del receptor, crecidos a sus temperaturas óptimas. Se centrifugaron alícuotas de 1,5ml de los cultivos a 13.000 r.p.m y los sedimentos se lavaron dos veces con el medio de cultivo de conjugación para eliminar restos de sales (procedentes del medio del receptor) y antimicrobianos de ambos medios.

A continuación, las células se resuspendieron en 100 μ l de medio SWYE al 2% (p/v) de sales, se mezclaron en proporción donador/receptor 1:1 o 1:2 y se depositaron en un filtro de 0,22 μ m estéril, dispuesto sobre el medio sólido de conjugación SWYE al 2% (p/v) de sales. El resto de la solución se utilizó para sembrar controles positivos y negativos (en los medios propios del receptor y del donador, y en el medio de selección de transconjugantes). Todas las placas se

incubaron a 32°C durante 16-24 horas. Seguidamente el filtro se resuspendió en 0,8ml de solución de sales al 2% (p/v). Se utilizaron 100µl para hacer diluciones seriadas y se sembraron 100µl de cada dilución en las placas de medio del receptor para determinar el número de supervivientes tras la conjugación. El resto se sembró en placas con el medio de selección [SWYE al 2% (p/v) de sales adicionado de rifampicina y kanamicina]. Tras la incubación durante 3 días a 32°C, se seleccionaron todas las colonias capaces de crecer en las placas de medio de selección. Posteriormente, mediante sucesivas resiembras en medio sin selección (líquido y sólido), se pudo comprobar la estabilidad del transposón mini-Tn5 en *H. anticariensis*.

El rastreo de los transconjugantes para seleccionar aquellos deficientes en la producción de AHLs se llevó a cabo mediante bioensayos en placa utilizando *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como cepas bioindicadoras. Con la ayuda de palillos estériles, los transconjugantes se inocularon en los medios de cultivo sólido LB/MC o AB/X-gal en los que se habían sembrado previamente las cepas bioindicadoras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4, respectivamente utilizando un bastoncillo estéril. Tras la incubación a 32°C durante 24 horas, se examinó la formación de un halo violeta alrededor del crecimiento de los transconjugantes en el caso de *C. violaceum* CV026 y un halo azul en el de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Los posibles candidatos correspondían a aquellos que presentaban una menor respuesta que la cepa silvestre frente a los biosensores ensayados.

3.2. Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga

Para la construcción de mutantes de *H. anticariensis* por reemplazamiento alélico, se utilizó el plásmido pJQ200-KS (véase Tabla 7) en el que se clonó una copia del gen a mutar interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina. Flanqueando la inserción, por cada lado en la construcción plasmídica, se extendió una secuencia de ADN de *H. anticariensis* de 1kb al menos. El plásmido se transfirió desde *E. coli* S17-1 λ pir a un mutante espontáneo resistente a rifampicina de *H. anticariensis* mediante conjugación biparental. Para la selección de los transconjugantes se utilizó el medio SWYE 2% (p/v) adicionado de rifampicina, kanamicina y un 5% (p/v) de sacarosa que favoreció un proceso de doble recombinación homóloga. El plásmido pJQ200-KS porta el gen *sacB* que codifica para una levanosacarasa responsable de la síntesis de levano a partir de sacarosa. En bacterias Gram-negativas, el levano se acumula en el periplasma produciendo muerte celular. Por ello, la adición de sacarosa al medio de selección de transconjugantes favorece el proceso de doble recombinación homóloga.

Se seleccionaron aquellos transconjugantes que habían incorporado el gen interrumpido por el casete de kanamicina. A continuación, se eliminaron aquellos que eran capaces de crecer en gentamicina (denominados merodiploides o cointegrados), es decir, se excluyeron aquellas colonias surgidas como consecuencia de la integración del plásmido en el cromosoma del

huésped, por recombinación homóloga simple. De esta manera se eligieron aquellos clones resistentes a rifampicina y kanamicina que toleraban un 5% (p/v) de sacarosa, pero que se mostraban sensibles a gentamicina, lo cual indicaba que el vector había sido eliminado del cromosoma de *H. anticariensis* por un proceso de doble recombinación homóloga. La comprobación de los clones se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores apropiados.

3.3. Obtención de mutantes por recombinación homóloga simple

Para la construcción de mutantes por recombinación homóloga simple se utilizó el plásmido suicida pVIK112 (véase Tabla 7). Para ello, se amplificó por PCR un fragmento interno del gen que se quería mutar, empleando los cebadores correspondientes. El producto de PCR obtenido fue digerido con enzimas de restricción y clonado en el vector pVIK112 previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante fue transferido a una cepa resistente a rifampicina de *H. anticariensis* mediante conjugación biparental, donde actuó como vector suicida, puesto que *H. anticariensis* no posee el gen *pir*. Ello facilitó que el plásmido recombinante se incorporara al cromosoma de la cepa receptora mediante recombinación homóloga simple tipo Campbell (Kalogeraki y Winans, 1997). De esta forma, la integración completa del plásmido dio lugar a la interrupción del gen objeto de estudio y simultáneamente dicha integración creó una fusión transcripcional del gen en cuestión al gen informador *lacZ* (Figura 17).

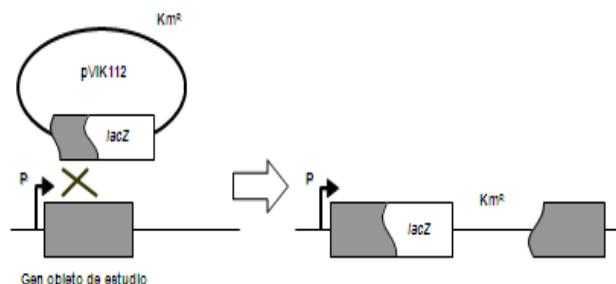


Figura 17. Estrategia utilizada para la construcción de los mutantes por recombinación homóloga simple.

3.4. Complementación de los mutantes

Los mutantes creados por mutagénesis insercional y recombinación homóloga simple o doble fueron complementados *in trans* mediante la transferencia de plásmidos por conjugación que contenían los genes y su región promotora correspondiente.

En primer lugar, se amplificó mediante PCR cada uno de los genes cuya función se quería complementar junto con su región promotora. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que se describen en el apartado de Material Suplementario de cada capítulo, a los cuales se incorporaron puntos de corte para enzimas de restricción. Los fragmentos amplificados fueron

digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y clonados en el vector de expresión pJN105 (véase Tabla 7), previamente digerido con las mismas enzimas. El vector pJN105 porta el casete *araC-P_{BAD}* que es inducible en presencia de arabinosa. A continuación, los plásmidos obtenidos fueron transferidos mediante electroporación a cepas de *E. coli* S17 *λpir* para su posterior movilización a las cepas mutantes de *Halomonas* mediante conjugación biparental.

4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES

4.1. Pruebas fenotípicas

Las pruebas fenotípicas se realizaron a los distintos mutantes de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* obtenidos en este trabajo. Como control se utilizó la cepa silvestre.

4.1.1. Crecimiento a distintas concentraciones de sal

Se utilizó el medio MY a las concentraciones de sales totales de 0,5; 3; 5; 7,5, 12,5 y 15% (p/v). Las placas se inocularon con 20μl de un cultivo de 18 horas de cada bacteria. Se incubaron a 32°C durante 7 días, realizándose lecturas periódicas a las 24 horas, 2, 5 y 7 días.

4.1.2. Movilidad

Para determinar la movilidad se utilizó un ensayo en placa en medio semi-sólido. Para ello, se preparó el medio Koser al 5% (p/v) de sales cuya composición se detalla en el apartado Anexos, adicionado de 0,5% (p/v) de casamino ácidos, 0,2% (p/v) de glucosa y 0,3% (p/v) de Bacto Agar (Difco). Los cultivos de los microorganismos a ensayar fueron ajustados a una D.O._{600nm} de ~ 0,2 y un volumen de 2μl del cultivo bacteriano fue inoculado en la superficie del medio de cultivo. Tras una incubación a 32°C durante 48 horas, las placas fueron fotografiadas y se midió el diámetro del crecimiento bacteriano.

4.1.3. Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se sembraron a partir de un inóculo de 18 horas en medio SWYE líquido al 2% (p/v) de sales con los correspondientes antibióticos.

a) Hidrólisis de Tween 20 (Sierra, 1957).

El Tween 20 (Sigma) se esterilizó por separado en horno Pasteur (140°C durante 90 minutos) y se añadió al medio sólido MY al 7,5% (p/v) de sales, previamente esterilizado en autoclave, hasta una concentración final del 1% (v/v). Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 32°C durante 15 días. En los casos positivos se observó la aparición de un halo opaco alrededor del crecimiento bacteriano debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido liberado.

b) Hidrólisis de la esculina

Se siguió la metodología descrita en el Manual de Cowan y Steel's (1993). Al medio MY al 7,5% (p/v) sólido se le añadió esculina al 0,1% (p/v) y citrato férrico al 0,05% (p/v). Los

microorganismos, una vez inoculados, fueron incubados a 32°C. Durante 7 días se examinaron las placas diariamente para observar un ennegrecimiento sobre y alrededor del crecimiento bacteriano, lo que indica la hidrólisis de la esculina y formación de esculetina que, con el Fe³⁺ del medio, da un complejo fenólico de color negro (Koneman y col., 1999).

c) Hidrólisis de la tirosina y formación de pigmento

Se realizó según el método de Gordon y Smith (1953). Al medio MY al 7,5% (p/v) sólido se le añadió tirosina al 0,5% (p/v); se mezcló bien y se esterilizó a 112°C durante 30 minutos; se distribuyó en placas Petri asegurando que la tirosina se distribuía uniformemente, puesto que es una sustancia insoluble. Las placas inoculadas se incubaron a 32°C. Durante un periodo de 7 días se observó la hidrólisis de este compuesto por la disolución de los cristales debajo y alrededor del crecimiento bacteriano. Se observó también la aparición de color sobre y alrededor de la extensión, lo que indica la formación de pigmento.

d) Hidrólisis de la gelatina

Se siguió el método de Frazier (1926), modificado en placa, utilizándose el medio MY al 7,5% (p/v) sólido al cual se añadió gelatina al 1% (p/v) (Sneath y Collins, 1974). Se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 112°C. Se inocularon los microorganismos y se incubaron a 32°C durante 7 días. Al cabo de este tiempo se inundó la placa con el reactivo de Frazier. Una zona de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano indicó que la gelatina estaba hidrolizada en la zona próxima al crecimiento.

e) Hidrólisis de almidón

Se utilizó el medio MY al 7,5% (p/v) sólido al que se le suprimió la glucosa, adicionándole en su defecto almidón al 1% (p/v) (Cowan y Steel, 1993). Se esterilizó a 112°C durante 30 minutos. Se inocularon las placas y se incubaron a 32°C durante 7 días. La lectura se realizó inundando la placa con lugol. Esta solución reacciona con el almidón del medio originándose un precipitado de un color violeta oscuro. La prueba se considera positiva cuando aparece un halo sin teñir alrededor de la extensión del crecimiento bacteriano, lo que indica la producción de amilasa.

f) Hidrólisis de la caseína

Se siguió el método de Hastings (1903, 1904). A 500 ml de leche desnatada se le añadió el mismo volumen del medio MY al 7,5% (p/v) sólido y elaborado a doble concentración en todos sus componentes; tanto la leche como el medio deben estar previamente estériles y enfriados a unos 55-60°C. Posteriormente, la mezcla resultante se repartió en placas. Después de inocular los microorganismos, las placas se incubaron a 32°C durante 7 días. En la lectura se observaron halos de aclaramiento alrededor de la extensión del microorganismo, cuando la prueba era positiva. Para los casos dudosos, se utilizó el reactivo de Frazier (Frazier, 1926); si la zona de

aclaramiento decrecía tras la adición del mismo, era indicativo de que la caseína no había sido digerida totalmente (Cowan y Steel, 1993).

g) Producción de lecitinasa

De acuerdo con la metodología de Larpent y Larpent-Gourgand (1957), se preparó por un lado, una emulsión estéril de yema de huevo recogiénola asépticamente en 250 ml de solución salina estéril. De otra parte, se preparó el medio MY al 7,5% (p/v) sólido, se esterilizó y una vez que se enfrió a 45-50°C, se adicionaron, en condiciones también asépticas, 10 ml de la emulsión de yema estéril por cada 90 ml de medio MY. Se distribuyó en placas Petri. Tras la incubación a 32°C durante una semana, se observó en los casos positivos la opalescencia en el medio, alrededor de las colonias y zonas de crecimiento. Cuando la actividad lecitinasa se acompañaba de propiedades lipolíticas, se formaba una capa superficial de coloración perlada sobre la masa bacteriana.

h) Producción de ADNasa

Se disolvieron 42g del medio deshidratado DNasa Agar (ADSA®), en un litro de solución de sales al 7,0% (p/v) y se esterilizó durante 30 minutos a 112°C. Los microorganismos se incubaron durante una semana a 32°C. Para la lectura se vertió HCl 1N (Panreac®) sobre la placa, el cual precipita el ADN, oscureciendo ligeramente el medio. El resultado se considera positivo cuando se observa un halo más claro alrededor del crecimiento bacteriano indicativo de la hidrólisis del ADN (Jeffries y col., 1957).

i) Producción de fosfatasa (Baird-Parker, 1963)

Al medio sólido MY 7,5% (p/v) de sales, previamente esterilizado, se añadió una solución acuosa de difosfato de fenoltaleína al 1% (p/v) (Sigma), esterilizada por filtración, hasta una concentración final del 0,01% (p/v) y se repartió en placas. Las placas una vez inoculadas se incubaron durante 5 días a 32°C. Para la lectura se adicionó sobre la placa una solución de amoniaco concentrado. La aparición de un color rosa sobre y alrededor del crecimiento bacteriano indica la liberación de fenoltaleína y el viraje en medio alcalino.

4.1.4. Microarray fenotípico

Para determinar la función de los genes regulados por el sistema quorum sensing se utilizó la tecnología del microarray fenotípico (Phenotype MicroArray™, PM) desarrollada por Biolog, según las indicaciones del fabricante. Esta tecnología utiliza la reducción de tetrazolio como sistema informador de un metabolismo activo (Bochner y col., 2001). El sistema se basa en la capacidad de los microorganismos para oxidar diferentes compuestos lo que da lugar a la aparición de un color púrpura (Bochner, 1989a, b). Se trata de veinte placas microtiter de 96 pocillos (PM01-PM20) que contienen diferentes medios de cultivo desecados en el fondo de cada pocillo. Se ensayaron ~2000 diferentes variables, que incluyeron fuentes de carbono, nitrógeno,

fosfato, sulfato, varias concentraciones de iones y osmolitos, una variedad de antibióticos, antimetabolitos, metales pesados y otros inhibidores, y pH según la metodología descrita por Viti y colaboradores (2009). En la Figura 18 se muestran las etapas seguidas para llevar a cabo el experimento.

Los microorganismos a ensayar fueron sembrados en el medio BUG™ agar (Biolog) al 2% (p/v) de NaCl e incubados a 32°C durante una noche. Las colonias obtenidas se suspendieron en 16ml del fluido de inoculación IF-0a (1x) al 2% (v/v) de NaCl con la ayuda de un bastoncillo estéril. La densidad celular fue ajustada a un 85% de transmitancia (T) en un turbidímetro Biolog. Parte de la suspensión bacteriana obtenida (15ml) fue adicionada a 75ml de fluido de inoculación IF-0a (1x) a 2% (v/v) de NaCl (una dilución 1:5) que contiene 1% (p/v) de tetrazolio. Se utilizaron 22ml de esta mezcla para inocular (100µl en cada pocillo) las placas PM01-02. A los 68ml restantes se les adicionó 680µl de una solución de glucosa (100X) y con esta mezcla se inocularon (100µl en cada pocillo) las placas PM03-08. Por otra parte, la suspensión bacteriana obtenida inicialmente (600µl) fue diluida 1:200 en 120ml de fluido de inoculación IF-10a (1x) al 2% (v/v) de NaCl adicionado de 1% (p/v) de tetrazolio y con esta mezcla se inocularon (100µl en cada pocillo) las placas PM09-20.

Tras inocular todas las placas PM01-20, se incubaron a 32°C en el lector Omnilog® y el cambio de color fue registrado automáticamente cada 15 minutos durante 96 horas. Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Omnilog-MP, que genera curvas que nos indican la formación de un color púrpura debido a la reducción del tetrazolio a lo largo del tiempo.

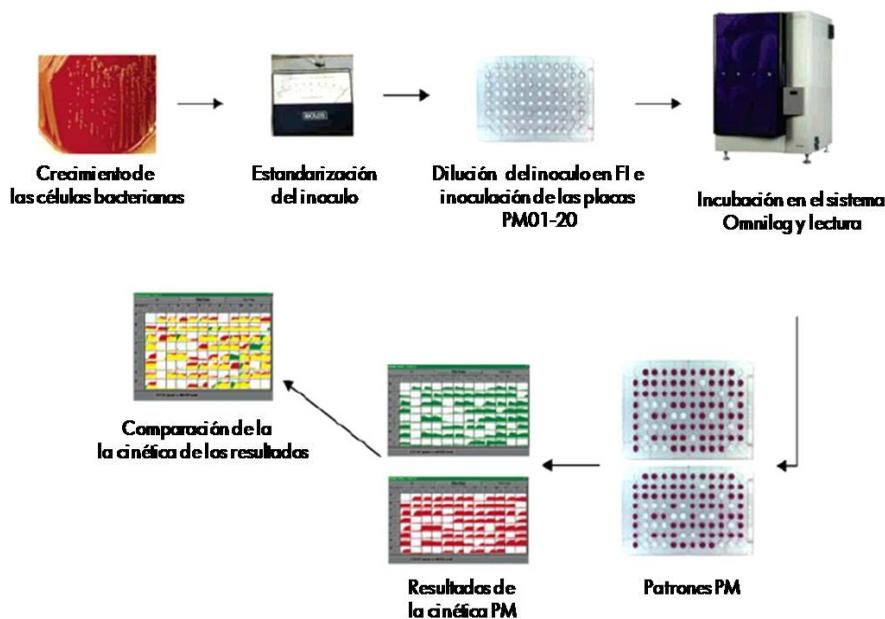


Figura 18. Esquema de las etapas experimentales de la técnica del microarray fenotípico.

4.2. Extracción y purificación del material extracelular

La extracción y purificación de los exopolisacáridos (EPS) se realizó siguiendo la metodología descrita por Quesada y colaboradores (1993) (Figura 19). Se partió de un cultivo de 5ml de cada una de las cepas objeto de estudio en medio MY al 7,5% (p/v) de sales, obtenido tras el crecimiento durante 24 horas a 32°C. Con un volumen de 1ml de dicho cultivo se inocularon cuatro matraces erlenmeyer de 500ml que contenían 150ml de medio MY al 7,5% (p/v) de sales y se incubaron a 32°C durante cinco días en agitación (100 r.p.m) en un incubador orbital. Transcurrido este tiempo, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10.000 r.p.m durante 60 minutos (Centrífuga Sorvall RC 6+, rotor F14-6x250y, Thermo Scientific). El sobrenadante se precipitó con tres volúmenes de etanol 96° frío (-80°C) y tras 24 horas a 4°C se recogió el precipitado del material extracelular mediante centrifugación a 7.000 r.p.m durante 10 minutos. A continuación se dejó evaporar totalmente el alcohol presente en el precipitado y el sedimento se solubilizó en agua destilada. El material extracelular en solución se purificó mediante ultracentrifugación a 50.000 r.p.m durante 60 minutos (Ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor 50Ti). Posteriormente, el sobrenadante se dializó empleando membranas de diálisis Midicell de tamaño de poro 12.000-14.000 Daltons durante 96 horas en agua destilada, y por último se liofilizó para que estuviera exento de agua y así poder determinar la producción por gravimetría. La producción se expresó en mg de EPS (producto final liofilizado) por 100ml de medio de cultivo y por g de peso seco celular.

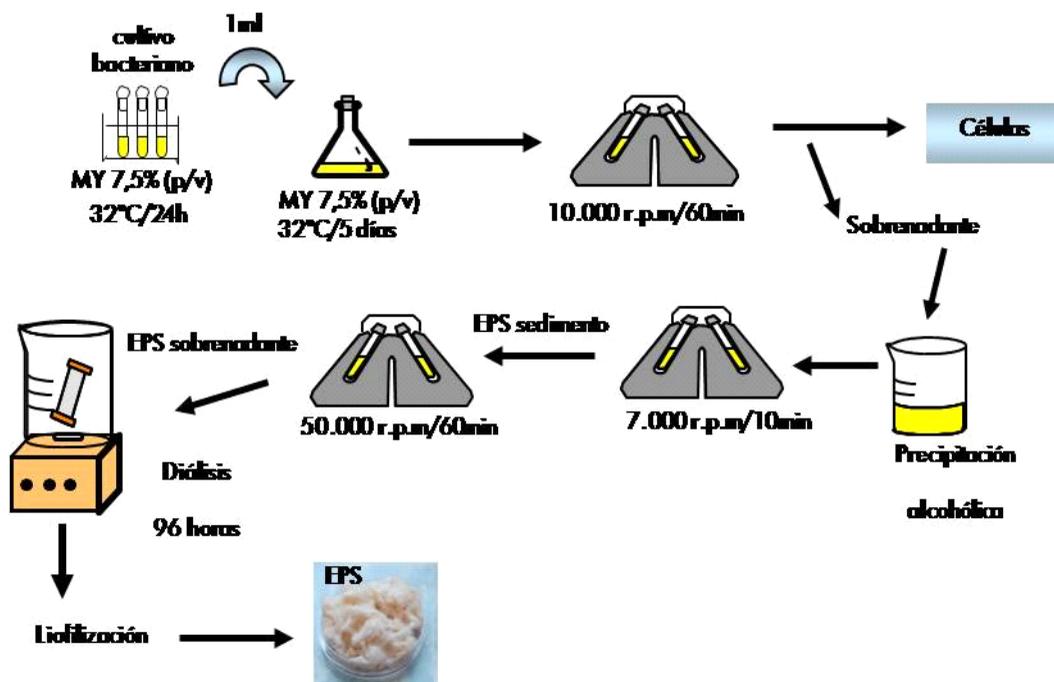


Figura 19. Proceso de extracción del EPS.

4.3. Estudio de formación del biofilm

La cuantificación de la formación del biofilm se realizó mediante tinción con cristal violeta (O'Toole y Kolter, 1998). Se partió de un inóculo en medio SWYE al 2% (p/v) de sales con los antimicrobianos apropiados al que se le hizo una dilución 1:100 en medio MY al 7,5% (p/v) de sales. El inóculo diluido se transfirió a placas microtiter de 96 pocillos que se incubaron a 32°C y en agitación durante 48 horas. A continuación, se midió la densidad óptica de los cultivos a 600nm, se tiró el contenido líquido y se lavaron las placas con agua destilada estéril. Las células adheridas a las paredes de los pocillos de las placas fueron teñidas con una solución al 0,5% (p/v) de cristal violeta en etanol de 95°, durante 15 minutos, pasados los cuales, las placas se lavaron con abundante agua para eliminar el colorante no adherido a las células. Posteriormente, las células formadoras del biofilm fueron resuspendidas en etanol de 95° mediante agitación vigorosa, y se midió la absorbancia de la suspensión resultante a 540nm. Para cada caso se empleó como blanco el medio de cultivo sin inocular.

4.4. Microscopía electrónica de transmisión

Se partió de un cultivo bacteriano en fase estacionaria (24 horas) en medio MY al 7,5% (p/v) sales. Las células se fijaron con glutaraldehído 2,5% (p/v) y rojo de rutenio 0,05% (p/v), en tampón cacodilato sódico, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05M y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2mM (pH=7,4). Este tratamiento se hizo a 4°C durante 4 horas. Después de un lavado con cacodilato sódico 0,1M, las células se deshidrataron en varias series con etanol (30, 50, 70, 90 y 100% v/v) a temperatura ambiente, durante 20 minutos cada deshidratación. Las células deshidratadas se infiltraron en una mezcla de resina/etanol (1:1 v/v) durante una noche, seguido de una infiltración en una resina pura, durante otra noche. Después las células se transfirieron a una cápsula de gelatina que se llenó con un monómero de resina. Esta resina se polimerizó durante 8 horas a 60°C. Tras este proceso se realizaron unas secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Reichter Ultracut S, equipado con una cuchilla de diamante, recogiendo en una rejilla de cobre. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo 1% (p/v) y citrato de plomo. Finalmente, las preparaciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss TEM EM 10C, 30 μm de apertura de objetivo y 80Kv de voltaje de aceleración).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I.

Caracterización del sistema quorum sensing *hanR/hanI* en *Halomonas anticariensis* FP35^T

Este capítulo ha sido publicado como:

Ali Tahrioui, Emilia Quesada and Inmaculada Llamas (2011). The *hanR/hanI* quorum-sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology*, 157: 3378-3387.

RESUMEN

Quorum sensing (QS) es un mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de la densidad celular que en la mayoría de las bacterias Gram negativas implica la producción de moléculas señal tipo *N*-acil homoserín lactonas (AHLs). En este capítulo se estudia el sistema QS de *Halomonas anticariensis* FP35^T a nivel genético. Dicho sistema está compuesto por genes homólogos a los del tipo *luxR/luxI*: el gen *hanR* (regulador transcripcional) y el gen *hanI* (sintasa de AHLs). Para determinar la organización y regulación del sistema *hanR/hanI* realizamos ensayos de RT-PCR y PCR cuantitativa a tiempo real. El análisis transcripcional indicó que los genes *hanR* y *hanI* forman una sola unidad transcripcional cuya transcripción depende de la densidad celular. La proteína HanI podría ser la única sintasa de AHLs en esta bacteria dado que la inactivación del gen *hanI* originó la pérdida completa de la producción de AHLs. Por otra parte, la expresión del gen *hanI* no depende de la proteína HanR que parece transcribirse a partir de su propio promotor. Este resultado viene apoyado por el hecho de que la expresión del gen *hanI* en el mutante *hanR* es similar a la de la cepa parental, así como la producción de AHLs. Además el gen *hanR* se expresa a partir de su propio promotor y es independiente de las moléculas señal AHLs que produce la proteína HanI.

ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a cell-density-dependent, gene-expression mechanism found in many Gram-negative bacteria which involves the production of signal molecules such as *N*-acyl homoserine lactones (AHLs). One significant group of microorganisms in which quorum sensing has not been studied until now, however, are the moderate halophiles. In this chapter we describe the results of our studies into the QS system in *Halomonas anticariensis* FP35^T, which is composed of *luxR/luxI* homologues: *hanR*, believed to be the transcriptional regulator gene, and *hanI*, the autoinducer synthase gene. To understand how the *hanR/hanI* system is organised and regulated we conducted real-time PCR and real-time quantitative PCR assays. Transcriptional analysis indicated that the *hanR* and *hanI* genes are on the same transcript and that their transcription is growth-phase dependent. HanI seems to be the only autoinducer synthase responsible for the synthesis of AHLs by *H. anticariensis* since the inactivation of *hanI* resulted in the complete loss of its AHLs. We also found that the *hanI* gene appears to be transcribed from its own promoter and its expression does not depend upon HanR. This finding was supported by the fact that the FP35 *hanR* mutant showed similar AHL-producing activity and *hanI* expression to the wild-type strain, the latter being measured by RT-PCR. Moreover, *hanR* is expressed from its own promoter and appears to be independent of the AHL signalling molecules produced by HanI.

Nuestro grupo de investigación ha descrito por primera vez la síntesis de moléculas señal QS dependientes de la densidad celular en bacterias halófilas productoras de exopolisacáridos (EPS). Dichas bacterias pertenecen al género *Halomonas*, un grupo de bacterias ampliamente distribuido en la naturaleza y con un gran potencial industrial (Oren, 2010; Ventosa y col., 2004). *Halomonas anticariensis* FP35^T ha sido seleccionada como modelo para nuestros estudios por producir mayores cantidades de moléculas señal que las demás especies de *Halomonas* que fueron objeto de estudio. Los autoinductores caracterizados en esta bacteria son del tipo *N*-acil homoserín lactona (AHLs) y muestran una gran variabilidad en la longitud del ácido graso que constituye la cadena lateral: *N*-butanoil homoserín lactona (C₄-HSL), *N*-hexanoil homoserín lactona (C₆-HSL), *N*-octanoil homoserín lactona (C₈-HSL) y *N*-dodecanoil homoserín lactona (C₁₂-HSL) (Llamas y col., 2005).

El objetivo de este capítulo es identificar y caracterizar los genes implicados en el sistema QS en *Halomonas anticariensis* FP35^T.

RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización de mutantes deficientes en la producción de AHLs

La estrategia que usamos para localizar los genes del sistema QS fue la obtención de mutantes de la cepa tipo FP35^T de *Halomonas anticariensis* deficientes en la producción de una o varias moléculas señal del tipo AHLs. Para ello, se llevaron a cabo experiencias de mutagénesis insercional via conjugación biparental, adaptando cuando fue necesario los protocolos para trabajar con bacterias halófilas productoras de EPS. Se utilizó como cepa receptora *H. anticariensis* FP35-R, un mutante espontáneo resistente a la rifampicina de *H. anticariensis* FP35^T. Esta cepa receptora se cultivó en medio mínimo MM líquido al 2% (p/v) de sales para evitar la producción de EPS, y posteriormente las células fueron lavadas con solución de sales Subow al 2% (p/v) con el fin de minimizar la presencia de antibióticos en el proceso de conjugación. Por su parte, la cepa donadora fue *E. coli* S17-1 *λpir* que porta el vector suicida pUT que contiene el transposón mini-Tn5Km2 y da lugar a inserciones estables, únicas y al azar en especies de *Halomonas*. Los clones que aparecieron en las placas de selección de transconjugantes se sembraron nuevamente en el mismo medio y se sometieron a distintas pruebas fenotípicas que permitieron descartar la presencia de contaminantes. Se seleccionaron por tanto, aquellos clones de bacterias Gram negativas, oxidasa positivos e incapaces de crecer en TSA (lo que demostraba su carácter halófilo). Además, se descartaron aquellos que eran resistentes a ampicilina (100µg/ml), ya que eran consecuencia de la cointegración del plásmido completo en el cromosoma de la célula huésped y no eran el resultado de un verdadero proceso de transposición.

En un rastreo en placa analizamos aproximadamente 5.500 transconjugantes utilizando las cepas bioindicadoras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) que nos permitieron seleccionar 11 clones que originaban una menor respuesta que la cepa silvestre (Figura 20a). Para confirmar la disminución en la producción de autoinductores en los 11 clones seleccionados y determinar el patrón de AHLs, seguidamente realizamos un análisis mediante TLC de los extractos procedentes de cada uno de los cultivos utilizando las mismas cepas bioindicadoras. De esta forma se comprobó que solamente cuatro de ellos eran deficientes en la producción de AHLs. A uno de ellos le denominamos FP35-111 y es objeto de estudio en este capítulo. En la Figura 20b se puede observar que el mutante FP35-111 produce menor cantidad de AHLs que la cepa silvestre FP35^T.

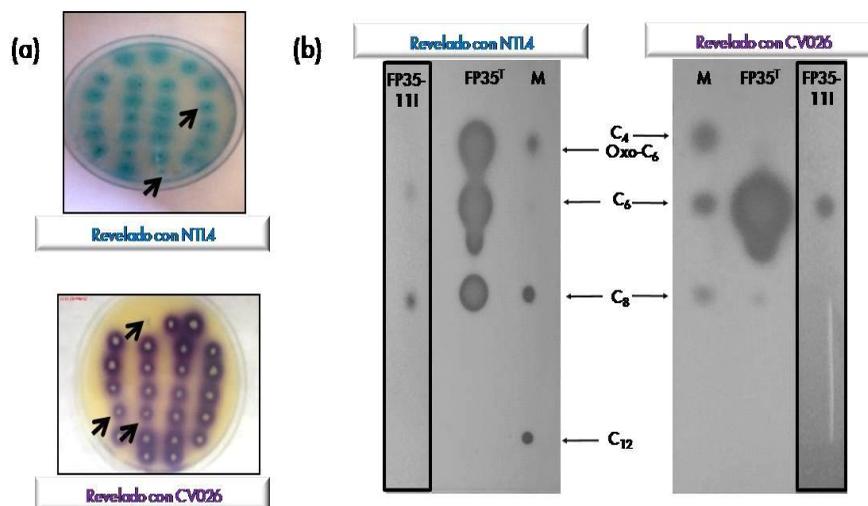


Figura 20. Obtención de mutantes deficientes en la producción de AHLs. (a) Rastreo en placa de los transconjugantes de *H. anticariensis* FP35^T mediante *C. violaceum* CV026 en medio LB/MC y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio AB/X-gal. Las flechas indican transconjugantes deficientes en la acumulación de AHLs. **(b)** Análisis del patrón de moléculas señales producidas por el transconjugante FP35-111 mediante TLC RP-C₁₈. M: AHLs comerciales.

2. Secuenciación del locus quorum sensing *hanR/hanI* homólogo a *luxR/luxI*

2.1. Clonación y secuenciación de las regiones adyacentes al transposón mini-Tn5Km2 en el mutante FP35-111

Para localizar el fragmento de ADN interrumpido en su expresión por la inserción del transposón mini-Tn5Km2 se llevaron a cabo digestiones del ADN genómico del mutante FP35-111 con diferentes enzimas de restricción (*EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *NdeI*, *PstI*, *SmaI*, *XbaI*). Seguidamente se realizó un Southern blot e hibridación utilizando como sonda un fragmento del transposón mini-Tn5Km2, marcado con digoxigenina (fragmento *EcoRI/XbaI* de 1,85kb). En la Figura 21 se puede ver el resultado del Southern blot en el que se confirma que la inserción del transposón ha sido única. De entre todos los fragmentos obtenidos, se seleccionó el fragmento *PstI* de aproximadamente 5kb para su posterior clonación y secuenciación.

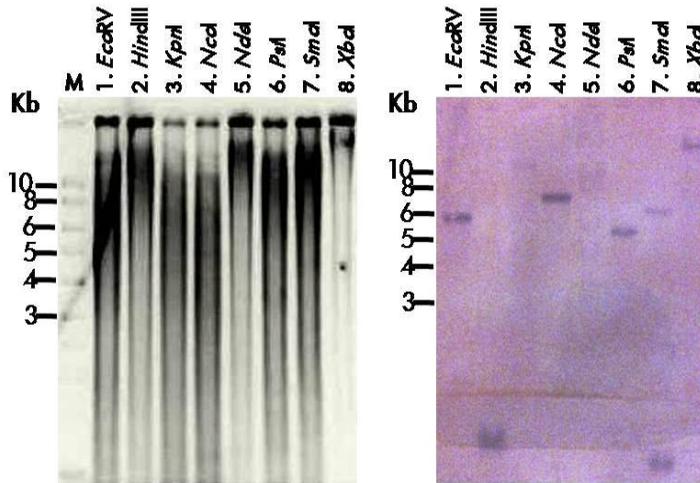
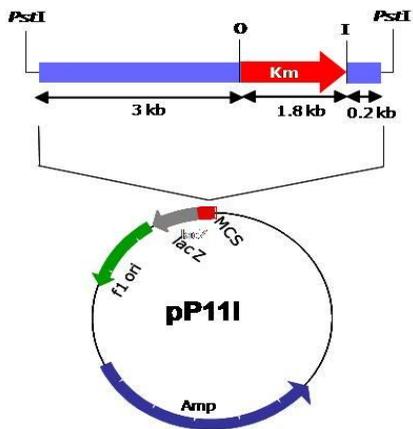


Figura 21. Análisis de restricción para localizar la inserción del transposón mini-Tn5Km2 en el transconjugante *H. anticariensis* FP35-111. La hibridación se llevó a cabo con una sonda correspondiente al fragmento *EcoRI-XbaI* (1,85kb) del transposón mini-Tn5Km2 marcada con digoxigenina. Carril M, Marcador molecular (10kb-200pb); Carril 1-8, ADN del mutante FP35-111 digerido con las enzimas de restricción *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *NdeI*, *PstI*, *SmaI* y *XbaI* respectivamente.

Para la clonación del fragmento *PstI* se usó la siguiente estrategia: se utilizaron diferentes proporciones del ADN genómico del mutante FP35-111 digerido con *PstI* para las reacciones de ligación con el vector pGEM®-T previamente digerido con la enzima *PstI*. Después el producto de ligación se transformó en *E. coli* XL1-Blue por electroporación. Mediante la siembra en placas de LB adicionadas de tetraciclina, ampicilina y kanamicina, se seleccionaron aquellos clones que habían adquirido el plásmido recombinante que portaba el fragmento de restricción *PstI* que contenía el transposón mini-Tn5Km2 y al que se denominó pP111 (Figura 22) (véase Tabla S1 en el apartado de Material Suplementario).

Una vez obtenido el plásmido recombinante pP111, se procedió a su secuenciación utilizando inicialmente los cebadores universales T7 y Sp6. Para ir avanzando en la secuencia se utilizaron



cebadores de diseño cuya secuencia se muestra en la Tabla S2 (véase el apartado de Material Suplementario). La secuencia obtenida fue comparada con las secuencias depositadas en las bases de datos utilizando el programa BLAST. La secuenciación de este plásmido nos permitió identificar tres ORFs. Un ORF parcial que presentaba homología con una catalasa (ORF1), un ORF completo que presentaba homología con el gen sintasa *luxI* (ORF2) y un ORF parcial que presentaba homología con el gen regulador *luxR* (ORF3).

Figura 22. Mapa de restricción del plásmido recombinante pP111.

La secuenciación del plásmido recombinante pP11 no nos permitió la identificación completa del locus de los genes de QS. Para obtener más información realizamos una PCR-inversa corriente arriba de la secuencia conocida (Figura 23). Para la reacción de PCR-inversa (véase el apartado 1.2.10b de Material y Métodos) se preparó una sonda (sonda 11A) de 200pb aproximadamente utilizando los oligonucleótidos S-111-F y S-111-R (Tabla S2), localizada en la región terminal de la secuencia conocida y que fue marcada con digoxigenina por PCR. A continuación, el ADN de la cepa silvestre se digirió con diferentes enzimas de restricción que tuvieran un sitio próximo a la región que constituía la sonda, y mediante Southern blot se eligió el fragmento de restricción *Bam*HI de un tamaño de 2,2kb para su posterior religación y amplificación. Los cebadores empleados para la reacción de PCR inversa (IPCR-111-F y IPCR-111-R) se describen en la Tabla S2. El fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector comercial pGEM®-T obteniéndose el plásmido recombinante pBFP35 (Tabla S1) que fue secuenciado mediante cebadores tanto universales como propios, diseñados a partir de la secuencia obtenida (Tabla S2).

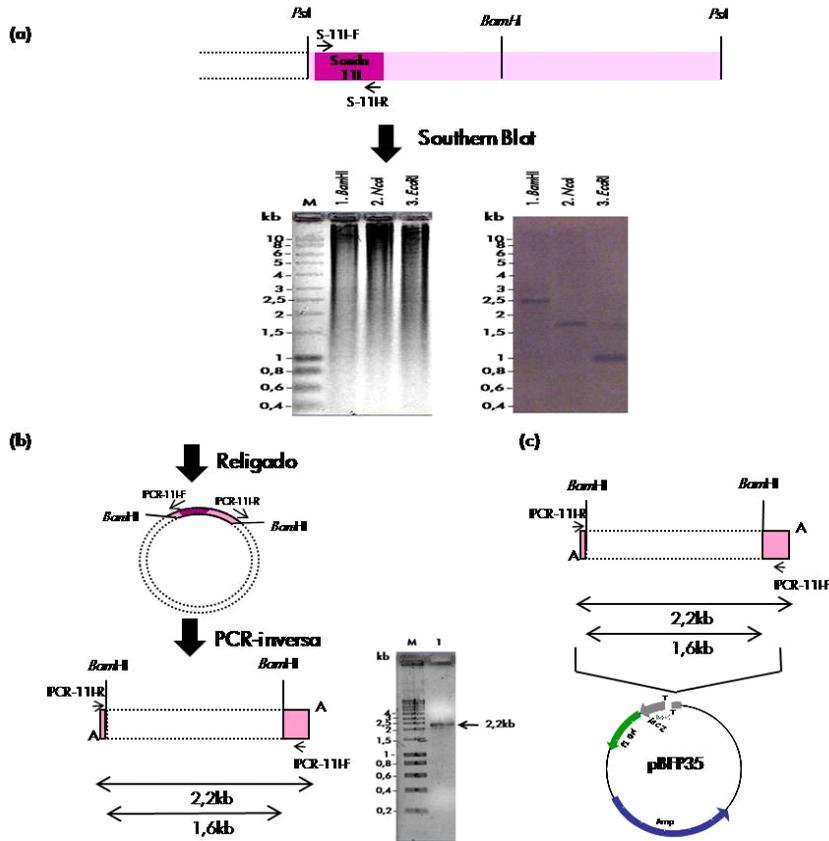


Figura 23. PCR-inversa A. Amplificación de un fragmento *Bam*HI corriente arriba de la secuencia conocida. (a) Digestión de ADN genómico de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda A. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carril 1-3, ADN de la cepa FP35 de *H. anticariensis* digerido con las enzimas *Bam*HI, *Nco*I y *Eco*RI. **(b)** Religación y amplificación de un fragmento de 2,2kb mediante PCR empleando los cebadores IPCR-111-F y IPCR-111-R. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carril 1, fragmento *Bam*HI amplificado por PCR-inversa. **(c)** Mapa de restricción del plásmido recombinante pBFP35.

Para determinar el punto exacto de la inserción del transposón mini-Tn5Km2 en el cromosoma del mutante FP35-111, se amplificó por PCR un fragmento de 0,6kb del ADN de la cepa silvestre FP35^T empleando los cebadores 11P-3 y 111-Tn5 diseñados a partir de las secuencias próximas a ambos lados del transposón (Tabla S2). El análisis de la secuencia total obtenida indicó que el transposón se había insertado en el codón 394 del sitio de inicio de la traducción del ORF1.

En la Figura 24 se muestra la estrategia seguida para secuenciar los plásmidos recombinantes pP111 y pBFP35.

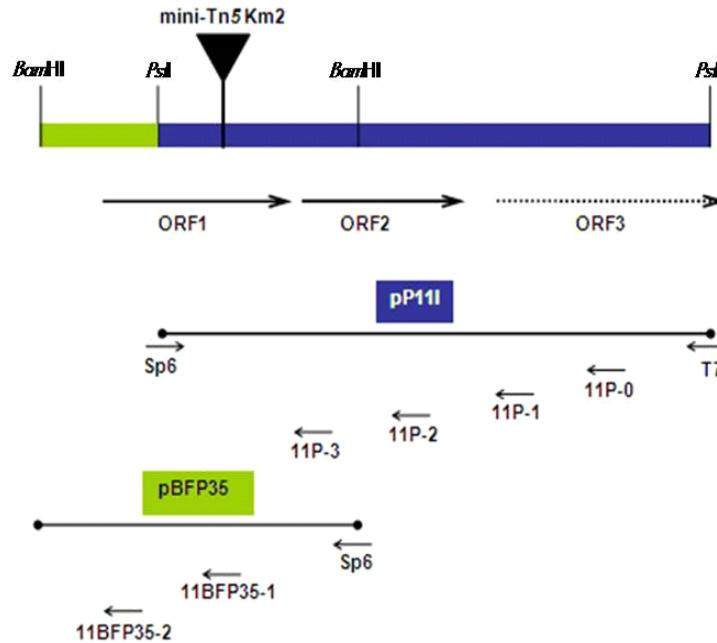


Figura 24. Estrategia de secuenciación del locus QS de *H. anticariensis* FP35^T.

La secuencia obtenida de los plásmidos pP111 y pBFP35 tiene un tamaño de 4.346pb con un contenido en G+C del 48.62 mol% y está depositada en la bases de datos GenBank/EMBL/DDJB con el número de acceso: HM236058 (Figura 25).

```

ACGCTAGGCTCTGGTACGAAAAGTCGGCGAGCGATGGTCAGGCAAGGCCGAAATTGGTCGAA 60
AAACGGACCGGGCTCGCGTGCAGITTTACGGGGGTATGAATGAGCATTITGAGACTGATT 120
TCAACGCAGCATAACCGAGCGCAGACACTTTTCGTACAGAGCCTAGCTTTCTGCAGGCTC 180
GGAACITGACCCCGTCCCGCCTATAACTCCCCACGAAAGACATGACCATCCCCAAAAGA 240
GATCCTAACTAAGCTTATTTTCAGCAGCCTTTCCGGCAGGGTGGCGTTCTCTCGGCGGCA 300
ATGCCAATCGAGCCGTC AACGTCACTGAAAGTTGCTCTTTTATCAATGCTCTTTTCATCA 360
GAACAGCTTCAGGGTTGTGTGAGGTCTCGTCCTTTTCCCTAGCAGCAAGATTGCGATG 420
ATCGGAGCCTTCTTACCTTCATTTTCTCAGTCATTGATAATGTATCATGCTTTGACAAC 480
GTAGAAATTGTAGGCAATGTATTACACCGTGAAGATATTCCTTACGCAAATTGGTACTA 540
TTTTCTACATTTGTGATGGTTATATACTTACAGGGAATTCAGCGCTCTTTGCTATAATGG 600
GTTAATGCCATGAATTTGACCATTTTATTAAGGATGCTTACCGAGCATTAGATGGTTGAT 660
    
```

ACATGGAGTTAGTGTGGTACGTATGGGATGGGGGTAACGCCATGATAAAGTCAAGAACGA 720
 M E L V W Y V W D G G N A M I K S R T 19
 ATCCTTCAGCTGTCAAATTCCTCGATATTGATTATTTTGATAAACAGAAGCTTGCAATGG 780
 N P S A V K F L D I D Y F D K Q K L A M 39
 AAGTAAGGGAAAATACAGGCTTTGAATTTTTCTCTGTGCTGAGGCCGTGCATACCGT 840
 E V R E N T G F E F F S L V L R P C I P 59
 TCACAAACAACACTTGTATATAATAGATAATTATGGATGTGAATGGGAGGGCTGTATC 900
 F T N N Y L Y I I D N Y G C E W E G L Y 79
 AAGATAAAAAATTTGGACGATAGATCCTGTTTTACAGCATAAAAAATTATGTCAACAAAA 960
 Q D K K F W T I D P V L Q H K N Y V N K 99
 GCGGGATTTTATGGGAGAATAGTTTATTTGATAAATCAACGAGTTATGGAGGTCAGCTG 1.020
 S G I L W E N S L F D K S N E L W R S A 119
 AAGACTTCGGGCTTTGTTTCAGGGATGAGTTTTCTGTTTCTTTTCAGATATGCCTGTAA 1.080
 E D F G L C S G M S F L V S F S D M P V 139
 GAGGCGTTTTTCCATTTTCATCTAAAGATTATTATTATGCTAATAATCAAGATGTTAAGA 1.140
 R G V F S I S S K D Y Y Y A N N Q D V K 159
 TGCAGAGATATAATGTTTGTCCATTGTCAATCAAGGTAATGGATTGTATAAAGGGTAAAG 1.200
 M Q R Y N V C P L S I K V M D C I K G K 179
 TTGATGTGGCAAGTCGGTTGCAAAATCCCGTTTTTCTATCTGTTAGAGAAGCCGATATAT 1.260
 V D V G K S V A N P V F L S V R E A D I 199
 TAAGATATTCTGCTGATGGATTGACGTCTTCGGAAATTTCTAAAAAGCTGTATGTGACAA 1.320
 L R Y S A D G L T S S E I S K K L Y V T 219
 AAAGCACAATTGATTTTCATATAAAAAATGCGATAGATAAGCTTGGGTGAAAAATAAAG 1.380
 K S T I D F H I K N A I D K L G C K N K 239
 TTCAAGCTGTCTCGAAAGCTTTACTGTTAGATATATTGTAAATCCATAAGATCAATACGG 1.440
 V Q A V S K A L L L D I L 252
 CGTCATGAGAATTAATTATATTCAGGGTTTGTAAATAAAATAACTGAAGTTGCAGGGATG 1.500
 M 1
 AAGAAAATGAACCATGGATTGACAACATAAAGTGGTGGTTTATGATGATCTATCTGATTCA 1.560
 K K M N H G L T T K V V V Y D D L S D S 21
 AAAGAAAGGGAGATATATACTGTAAGAAAAGAAGCATTGTTGATAGACGAGGATGGGAT 1.620
 K E R E I Y T V R K E A F V D R R G W D 41
 ATACCAACCTATGATGGGGGGGCGTGGGAGCGGGATCAATATGATGACTCTAGTTCAATG 1.680
 I P T Y D G G A W E R D Q Y D D S S S M 61
 TACATTGTTGTTGAGACAGAAGAGCATATACAAGGATGTGTTAGGGTTAGACCTTCTTG 1.740
 Y I V V E T E E H I Q G C V R V R P S L 81
 ATCCCTAATGTGACAAGAGGAATCGTAAGTGAGTTGTCTTTGCAAGAGGATTATTTCTG 1.800
 I P N V T R G I V S E L S L Q E D Y F L 101
 GCTAAAGTAGGAAATGGGACAGTTTGGGAGGCAAGTCGATTTGCCTTGAAAACGACTCGA 1.860
 A K V G N G Q V W E A S R F A L K T T R 121
 AACTCTAGTTTTGTTAGGGTAGATGGCGTCGATATCCGCACCGTCCTTTATTTGGTGAA 1.920
 N S S F V R V D G V D I R T V L L F G E 141
 ATGTTAAATCTAGCGTTGCGAGAATAACCTCATGCTATGAGGTGATTGTGCGATGGCTTG 1.980
 M L N L A L Q N N T S C Y E V I V D G L 161
 ATGAAAAAGGCTTTGAGTCGAGCAAAGTGGGATCTGGATATCGTTCATAAGGGAAGAGGA 2.040
 M K K V L S R A K W D L D I V H K G R G 181
 AGCAAAAATGAGTCTGTGATTATGGATTGTTGGGTTGCTCTGAAAATCAGTATAAAAAA 2.100
 S K N E S V Y Y G L L G C S E N Q Y K K 201
 ATGAAGTTATTAATAGATAAGGCTTTTGGACTGCTTGTATAGTTGGCTGTTAGTTAAGA 2.160
 M K L L I D K A F G L L V 214

GTGATGTAGTCTGGTGTGTGTTCCAATATGTAACACGAAAAATCTTGCTAATACAGATT	2.220
GTTTAGATAACTAAGGAGGATCCGTCGGGCCTGCTTCAGCCGGGATTCCAATCTCTTCTG	2.280
GTGGCGACCATCCCTCTCCTGGGTCCGGGCCTGTTCCAGGAATTCGCGGTAGTTCAGGTC	2.340
TTGCTTACAGAGGCTGTCGAGTGAGGTCTGGAGATTGGCCGCGCGGTGTTTATGGTCA	2.400
ATCAGAGCGCTGCGCGGCGATTGTGAATTTCTTTTACACATGTGTAGATTCAATTTGT	2.460
CCCACTTGTCCCGATAGGGCTACGTTGCAAGGTGCAAGATCGACGGTTCGCACGGCCTGG	2.520
GACGTTCTGAACGTCAGGGAGCCGGAAGCAGAGTCGGCTTGTGGGTTCTGTGCGAGTTGG	2.580
GTTTGGACGACACATCAGCAAACGAGGTGCTGACC ATGGCGAACAAACCCGCATACGAAAC	2.640
CGAACAGCGGTGGGCCGAATGATAGGGATTTCAGGACCACTGGCGACAGCAAATCGGAGA	2.700
ACTTGGAGACGTATCGCAGCGATGCCGAAGGGCACGATCTGCGACCAACCAGGGCTCGC	2.760
GGATCTCCGACAACCACAACCTCGCTGAAGGGCGGCGAGCGTGGTCCGACGCTGATGGAAG	2.820
ACTTCGTCTTCCGCGAGAAGCTCAATCACTTCGACAACGAGCGTATCCCGAGCGCATCG	2.880
TGCATGCTCGGGGGGCGGCGGCACATGGTTACTTTTACGCCCTATGACAACGCTGCCAGT	2.940
ACTCCAAGGCCGGGCTGTTCCAGGATCCGGCCAAGAAAACGCCAGTGTTCGTGCGTTTCT	3.020
CCACGGTACAAGGGGCGCGTGGCTCCAACGATACAGTGCCTGACGTACGTGGTTTCGCGA	3.080
CCAAGTTCTATACCGACGAAGGTAACCTGGGACCTGGTCGGCAACAACCTGCCGGTGTCT	3.140
TCATCCAGGATGCGATCAAGTCCCGATTCGTGCATTTCGGTGAAGCCCGAGCCGCACA	3.200
ATGAGATCCCCAAGGGCAGTCTGCCACGATACCTTCTGGGATTCGTGTCGCTGATGC	3.260
CGGAATCTACACACATGGTGTGTGGACGATGTCCGATCGTGCCTTCCGCGTCACTTCC	3.320
GTAACATGGAAGGCTTCGGCGTGACAGCTTTCGGCTGATCGACAAACAAGGCAAGGCGC	3.380
GTTTCGTCAAGTTCATTGGAAGCCGGTAGCAGGAACCTGCTCGCTGATCTGGGACGAGG	3.420
CCCAGAAGCTGTGGGGGCGCGACCCCGACTTCAACCGCCGTGCGATGTGGGACGACATCG	3.480
AGAAGGGCGATTACCTTGAATACGAATTGGGCATCCAGGTGGTCAAGAAGAGGATGAGC	3.540
ACATGTTCGACTTCGACATTCTCGATCCAACCAAGATCATTCCCGAGGAGCAGGTGCCGG	3.600
TCACCTTGATTGGCAAGATGGTTCTCAACCGCAATCCGGACAACCTTTGCCGAGACTG	3.660
AGCAGGTGGCGTTCAATCCGGCCAACGTCGTGCCGGGCATCGACTTCAGCAATGACCCGT	3.720
TGCTGCAAGGGCGGTTGTTCTCGTATCTCGACACTCAGATGTTGCGCCTGGGTGGGCCGA	3.780
ACTTTCATGAGATCCCCATCAACCAGCCGGTGTGCCCATTCATAACAACCAGCGCGACT	3.840
CCATGCATCGCCAGACGATCAACAAAGGCCAGGCTTCTACGAGCCCAATTCGATCGATG	3.900
GCGGTTGGCCGAGCGAGACGCCGCCGGCGTCCGAAGACGGTGGTTTCGAGTCTATCAGG	3.960
AGCGTATCGATGCCAGCAAGATTCGCGCGCGCAGCGAATCGTTCGGCGATCATTACTCCC	4.020
AGGCGACCTGTTCTGGAACAGCCAGAGCGAAGCGGAGAAGGAACATATCATCGATGCCT	4.080
ATACCTTCGAGCTTTCAAAGTTGGGCGGCCGTGGATCCGCGAGCGGGTAATCAAGGAGA	4.140
TCCTGCCCAATATCGATCTCGAGTTGGCACGCCGGTTCGGCGAGCGACATGGTATCGAGG	4.200
CGCCAAGCAGCAAACCGGCACCCGCCGAGGAGCTAGGCAAGAGTTCGCTGCAGGCGGCCG	4.260
CACTAGTGATTCATGGGCATCCAGCGGAAGCGCCATGCTTACGCGCATTAGTATAGGC	4.320
CAAACCAATCCCGCGGCCATGGCGGC	4.346

Figura 25. Secuencia de nucleótidos correspondientes a los insertos de los plásmidos recombinantes pP111 y pBFP35. Los posibles codones de inicio y terminación de la traducción de los ORFs se encuentran señalados en negrita. En mayúsculas y de color rojo y naranja se muestra las secuencias de 252 y 214 aminoácidos codificadas por los ORF1 y ORF2 que se indican en mayúsculas y de color azul y verde respectivamente. La secuencia parcial del ORF3 se muestra en mayúsculas y de color violeta. Los nucleótidos entre los que se insertó el transposón mini-Tn5Km2 aparecen sombreados en amarillo.

2.2. Análisis bioinformático de la secuencia del locus quorum sensing *hanR/hanI* en *H. anticariensis* FP35^T

El análisis mediante el programa DNASTAR de la secuencia de ADN genómico obtenida a partir de los dos plásmidos recombinantes, pP111 y pBFP35, reveló la presencia de dos ORF completos y un tercer ORF parcial (Figura 25 y Tabla 9).

Tabla 9. Descripción de los ORFs identificados.

ORF	Gen	N° nucleótidos (pb)	N° aminoácidos	G+C mol%	Masa Molecular (kDa)	Predicción		Función probable	Localización Figura 6 (N° nucleótidos)
						Punto isoeléctrico	Carga pH=7		
1	<i>hanR</i>	759	252	35,05	28,9	7,60	1,06	Regulador transcripcional	663-1.421
2	<i>hanI</i>	645	214	39,84	24,4	7,23	0,33	Sintasa de autoinductores	1.498-2.142
3 parcial	<i>katE</i>	1.731	576	58,5	65,4	5,73	-17,9	Catalasa	2.615-4.346

El análisis BLAST de las secuencias obtenidas en comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos indicó que los dos ORFs completos (ORF1 y ORF2) mostraban identidad con sus respectivos homólogos *luxR* y *luxI*. Por ello los denominamos *hanR* (por *H. anticariensis luxR*) y *hanI* (por *H. anticariensis luxI*), respectivamente.

a) Proteína HanR

El gen *hanR* codifica un posible regulador transcripcional que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo LuxR. En la Tabla 10 se muestran las proteínas homólogas a HanR, encontradas en distintos organismos.

Tabla 10. Homólogos de HanR en distintas especies bacterianas.

Proteína	Especie bacteriana	Longitud (aa)	% identidad (% positivos)*	N° acceso	Referencia
LuxR	<i>Burkholderia glumae</i>	239	31 (51)	CAM12358	Devescovi y col., 2007
PhzR	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens strain 30-84</i>	241	30 (47)	ABR21211	Khan y col., 2007

* Porcentaje con respecto a la secuencia de aminoácidos de HanR.

El análisis de la proteína HanR de *H. anticariensis* con el programa SMART puso de manifiesto la presencia de dos dominios conservados: un dominio amino-terminal de unión a autoinductores y un dominio carboxilo-terminal de unión a ADN. En la Figura 26 aparece el dominio de unión a autoinductores subrayado en rojo (aminoácidos 30-178) y el dominio de unión a ADN, que contenía un motivo hélice-giro-hélice característico de la familia LuxR subrayado en verde (aminoácidos 189-246). Además la proteína HanR contenía también los residuos típicos de la familia de proteínas LuxR que se indican con asteriscos en la Figura 26.

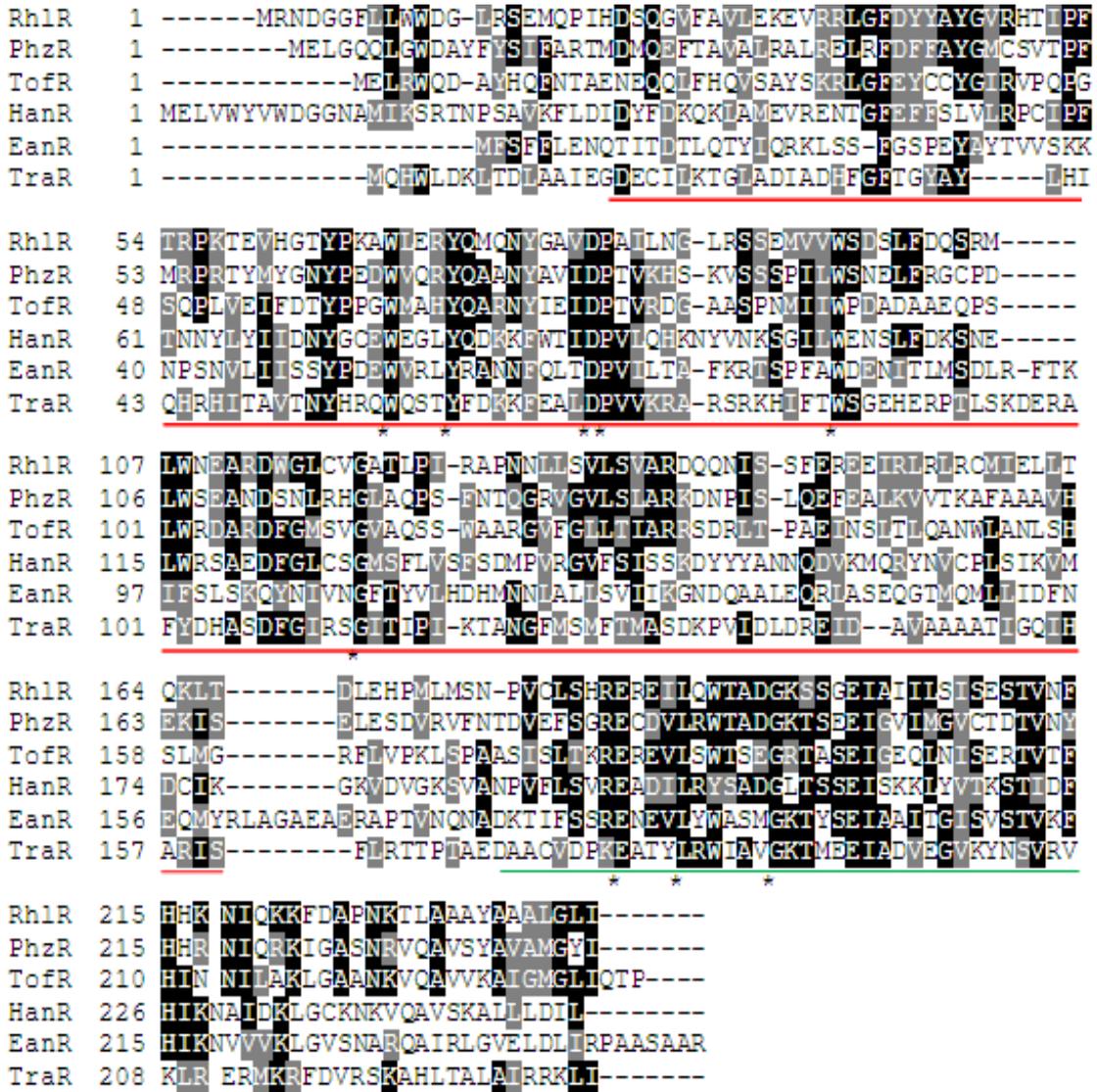


Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína HanR. El alineamiento de las secuencias se realizó con el método ClustalW. Los colores gris y negro indican aminoácidos similares o idénticos, respectivamente. Los asteriscos indican los aminoácidos más conservados en las proteínas tipo LuxR. Las secuencias utilizadas para el alineamiento con la secuencia HanR son EanR de *Pantoea ananatis* (n° acceso AB304810); RhIR de *Pseudomonas aeruginosa* (n° acceso AAG06865); PhzR de *Pseudomonas chlororaphis* cepa 30-84 (n° acceso EF626944); TofR de *Burkholderia glumae* (n° Acceso AM422470) y TraR de *Agrobacterium tumefaciens* (n° Acceso AAA64793). La barra roja representa el dominio de unión de autoinductores y la barra verde representa el motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN identificado por el programa SMART.

b) Proteína HanI

El gen *hanI* codifica una posible sintasa de autoinductores que pertenece a la familia tipo LuxI. En la Tabla 11 se muestran las proteínas homólogas a HanI, con los porcentajes de identidad, encontradas en distintos organismos con evidencia experimental.

Tabla 11. Homólogos de HanI en distintas especies bacterianas.

Proteína	Especie bacteriana	Longitud (aa)	% identidad (% positivos)*	Nº Acceso	Referencia
Pmel	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	257	27 (57)	AEX15482	Licciardello y col., 2012
Expl	<i>Erwinia carotovora</i>	257	26 (57)	ABP88724	Pirhonen y col., 1993
Pcol	<i>Pseudomonas corrugata</i>	257	26 (57)	ABP88724	Licciardello y col., 2007
EanI	<i>Pantoea ananatis</i>	210	26 (57)	AB304809	Morohoshi y col., 2007

* Porcentaje con respecto a la secuencia de aminoácidos de HanI.

En el alineamiento de la proteína HanI con otras proteínas sintasas de la familia LuxI se puede observar que la proteína HanI contenía los mismos aminoácidos conservados en el dominio N-terminal encontrados en sintasas de AHLs relacionadas (Figura 27).

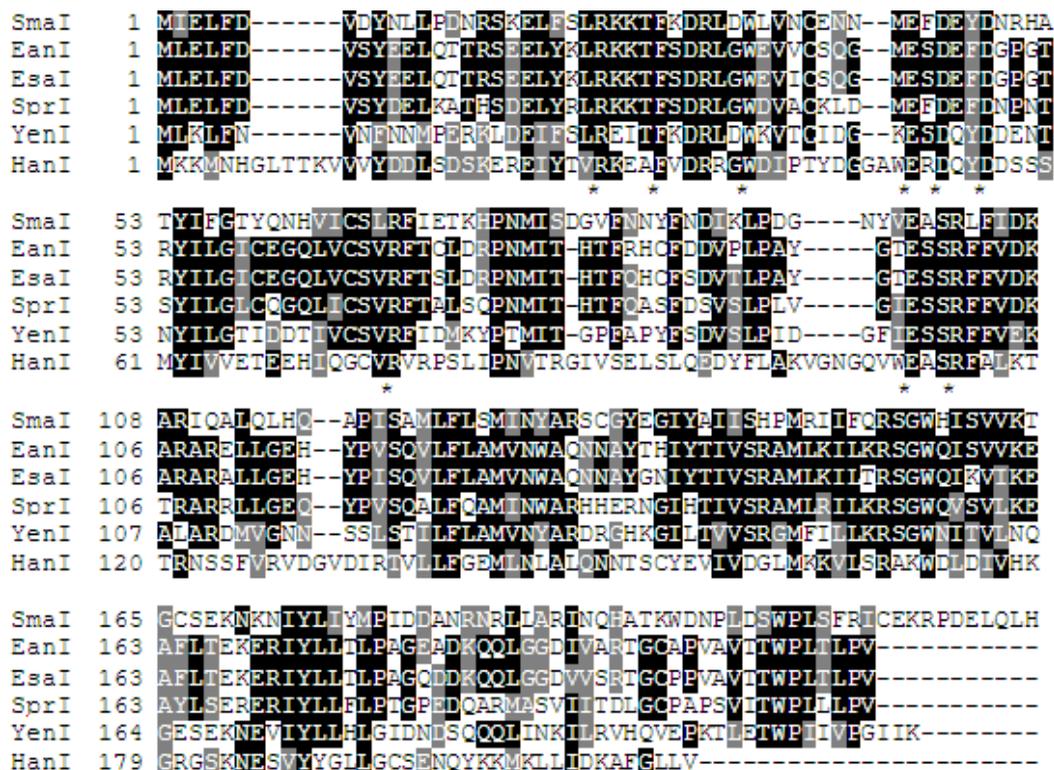


Figura 27. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína HanI. El alineamiento de las secuencias se realizó con el método ClustalW. Los colores gris y negro indican aminoácidos similares o idénticos, respectivamente. Los asteriscos indican los aminoácidos más conservados en las proteínas tipo LuxI. Las secuencias utilizadas para el alineamiento con la secuencia HanI son EanI de *Pantoea ananatis* (nº acceso AB304809); EsaI de *Pantoea stewartii* (nº acceso L32183); SmaI de *Serratia marcescens* (nº acceso AM236917); SprI de *Serratia proteamaculans* (nº acceso AY040209) y YenI de *Yersinia enterocolitica* (nº acceso AM286415).

3. Análisis transcripcional del sistema QS *hanR/hanI* de *H. anticariensis* FP35^T

3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes *hanR/hanI*

Los genes *hanR* y *hanI* podrían constituir una misma unidad transcripcional ya que estaban alineados en la misma dirección y separados por una región intergénica de 76pb (Figuras 25 y 28a). Para determinar si estos dos genes forman un operón llevamos a cabo ensayos de RT-PCR. Para ello, se partió de ARN total de un cultivo de *H. anticariensis* FP35^T crecido en medio MM al 7,5% (p/v) de sales. Posteriormente, se realizó un ensayo de retro-transcripción siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.3.1 de Material y Métodos, con el fin de amplificar la región intergénica. Para la reacción de RT-PCR se utilizaron los cebadores *hanR*-RT-F y *hanI*-RT-R (Tabla S2) basados en la región intergénica (Figura 28a). En la Figura 28b (carril 3) se puede observar una banda del tamaño esperado (351pb), lo que confirmó que los genes *hanR/hanI* se transcribían como una unidad transcripcional.

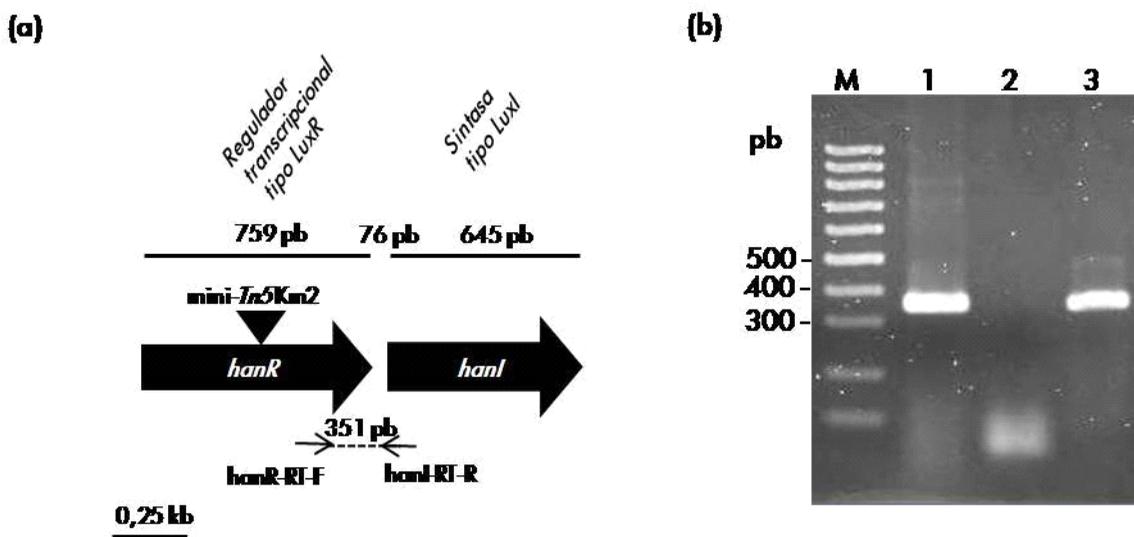


Figura 28. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes *hanR/hanI*. (a) Esquema de la estructura de los genes *hanR/hanI* y localización de los cebadores empleados en la reacción de RT-PCR. Se indica el tamaño del fragmento de PCR esperado para la región intergénica. Las flechas indican la supuesta dirección de transcripción. El triángulo en negrita indica el punto de inserción del transposón. (b) Electroforesis del ADNc amplificado con oligonucleótidos específicos. Carriles: M, marcador molecular (100pb-1kb); 1, control positivo; 2, control negativo; y RT-PCR correspondiente a la región intergénica (tamaño esperado del producto, 351pb).

3.2. Análisis de la región promotora del locus *hanR/hanI*

Para determinar si los genes *hanR* y *hanI* dependían de un solo promotor o por el contrario, cada uno tenía su propio promotor realizamos un análisis bioinformático transcripcional del locus *hanR/hanI* mediante el programa de predicción de promotores BPROM. El resultado obtenido del análisis *in silico* indicó la presencia de una secuencia consenso -10 y -35 corriente arriba de cada gen (Figura 29).

```

TGCTTTGACAAOGTAGAAATTGTAGGCAATGTATTACACCGTGTAAAGATATTCCTTACGCAAATTTGGTACTATTTTCT
                                     -35                -10
ACATTTGTGATGGTTATATATACTTACAGGGGAATTCAGCGCTCTTTGCTATAAATGGGTTAATGCCATGAATTTGAOCATT

TTATTAAGGATGCTTACCGAGCATTAGATGGTTGATACATG.....(hanR).....TAATTCOCATAAGATCAATACGGC
                                     -35                -10      M      *
GTCATGAGAAATAATATATATTCAGGGTTTGTAAATAAAATAACTGAAGTTGCAGGGATG.....(hanJ).....TAGTT
                                     M      *
GGCTGTTAGTTAAGAGTGATGTAGTCTGGTGTGTGTCCAAATATGTAACACGAAAAATCTTGCCTAATACAGA
    
```

Figura 29. Secuencia de ADN de la región promotora situada corriente arriba de los genes *hanR* y *hanI*. M, corresponde al codón de iniciación y el asterisco al codón stop. Las regiones consenso -10 y -35 están sombreadas en gris.

Para confirmar la actividad promotora, construimos una fusión de las regiones promotoras de cada gen al gen *lacZ* desprovisto de promotor en un plásmido de bajo número de copias, el pMP220. Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron transferidos desde *E. coli* S17-1 λ pir al mutante espontáneo resistente a rifampicina, FP35-R de *H. anticariensis* mediante conjugación biparental. Como control negativo se transfirió el plásmido pMP220 sin inserto. La medida de la actividad β -galactosidasa se llevó a cabo con los cultivos de *H. anticariensis*. El resultado obtenido viene resumido en la Tabla 12 y pone de manifiesto que existía actividad promotora delante de cada gen, siendo mucho mayor (seis veces) la correspondiente al gen *hanR*.

Tabla 12. Actividad β -galactosidasa de las regiones corriente arriba de los genes *hanR* y *hanI*.

Cepa	Actividad β -galactosidasa en unidades Miller
<i>H. anticariensis</i> FP35 (pMP220)	6,94 (+/- 0,98)*
<i>H. anticariensis</i> FP35 (pMP- <i>phanR</i>)	451,49 (+/- 21,61)
<i>H. anticariensis</i> FP35 (pMP- <i>phanI</i>)	72,40 (+/- 8,21)

* Desviación estándar del resultado de tres ensayos.

3.3. Análisis de la expresión de los genes QS *hanR/hanI* en función de la densidad celular

El efecto de la densidad celular de la población bacteriana sobre la expresión de los genes *hanR/hanI* se estudió determinando la expresión relativa de ambos genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real, según lo descrito en el apartado 1.3.2 de Material y Métodos. De forma breve, se partió de ARN total de *H. anticariensis* FP35^T procedente de cultivos bacterianos en fase exponencial temprana y en fase estacionaria (D.O._{600nm} de 0,4 y 1,4, respectivamente) y se sintetizó el ADNc utilizando el kit "iScript™ cDNA synthesis" (Bio-Rad). Seguidamente se llevó a cabo una PCR cuantitativa, para la que se diseñaron cebadores internos específicos de los genes *hanR* y *hanI* (Tabla S2). Los datos se analizaron mediante el programa REST-MCS utilizando el gen ARN 16S para la normalización de los mismos. Este programa expresa los resultados en forma de expresión relativa utilizando el método Pfaffl, que tiene en consideración

la eficiencia de la PCR del gen de interés y el gen referencia. Los resultados pusieron de manifiesto que la expresión relativa de los genes *hanR* y *hanI* aumentaba 83,6 y 45,1 veces, respectivamente, al final de la fase estacionaria de crecimiento. Por tanto, podemos decir que la expresión del sistema QS *hanR/hanI* es dependiente de la densidad celular.

4. Función del gen *hanI* en *H. anticariensis* FP35^T

4.1. Inactivación y complementación del gen *hanI*

Con el fin de establecer la implicación de la proteína HanI en la biosíntesis de AHLs, se procedió a la inactivación del gen *hanI* mediante mutagénesis insercional utilizando el vector suicida pVIK112. Para ello, se clonó un fragmento de 356pb del gen *hanI* en el vector suicida pVIK112 originando el plásmido recombinante pVIKHanI (Tabla S1). El plásmido pVIKHanI fue transferido desde *E. coli* S17-1 λ pir al mutante espontáneo resistente a rifampicina FP35-R de *H. anticariensis* mediante conjugación biparental. Mediante un proceso de recombinación homóloga simple, el vector pVIKHanI se insertó en el gen *hanI* de la cepa FP35-R. Como resultado se obtuvo el mutante FP35*hanI*, cuyo gen *hanI* quedó bloqueado (Tabla S1). El estudio del fenotipo del mutante FP35*hanI* se basó en la determinación de la producción de AHLs sintetizadas mediante ensayo en placa (Figura 30a) y posterior estudio del patrón de AHLs por TLC (Figura 30b), utilizando los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

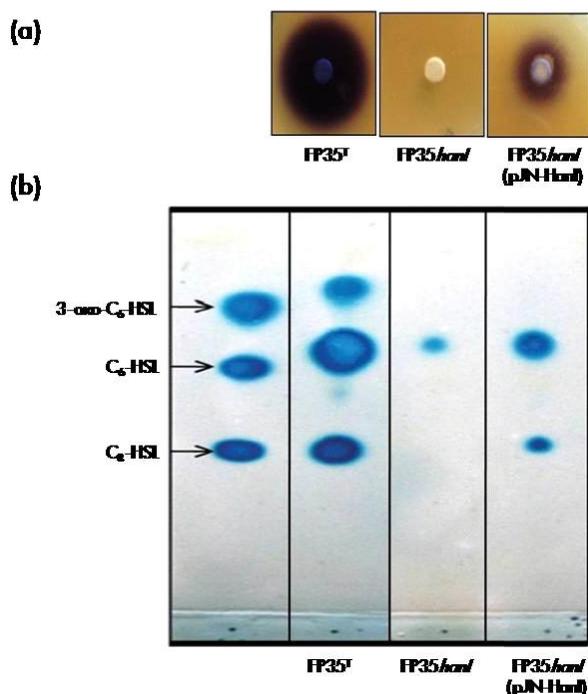


Figura 30. Análisis mediante TLC de la producción de AHLs en el mutante FP35*hanI* de *H. anticariensis* FP35^T. AHLs comerciales utilizadas como referencia: 3-oxo-C₆-HSL (4,7 pmol); C₆-HSL (804 pmol); C₈-HSL (31,6 pmol). (a) *C. violaceum* CV026 fue utilizada para el ensayo en placa. (b) *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) fue utilizada para el ensayo en TLC.

El resultado del análisis de la producción de AHLs por el mutante FP35 *hanI* indicó que no producía moléculas señal (Figura 30). La inducción del biosensor NTL4 (pZLR4) que se observa en la TLC en el carril correspondiente al mutante FP35 *hanI*, es la misma que se observa con un extracto preparado a partir del medio de cultivo líquido MY sin inocular. Por lo tanto, en base a este resultado, la proteína HanI parecía ser la única sintasa responsable de la producción de AHLs en *H. anticariensis* FP35^T. Para confirmar esta hipótesis, el gen *hanI* mutado se complementó *in trans* mediante la expresión del gen *hanI* en el plásmido multicopia pJN105 en el mutante FP35 *hanI* (Tabla S1). Tal y como se puede ver en la Figura 30, la producción de AHLs se recuperó en parte.

4.2. Regulación de la expresión del gen *hanI*

Con el fin de poder determinar si la transcripción del gen sintasa a partir del promotor del gen *hanI* (*phanI*) es dependiente de las AHLs, se realizó un ensayo heterólogo en *E. coli*. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 235pb que contenía la región promotora del gen *hanI*. Con este fin se diseñaron los cebadores hanIsub-EcoRI-F y hanIsub-XbaI-R (Tabla S2). El producto de PCR se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, y el fragmento resultante se clonó en el vector pMP220, cortado con las mismas enzimas, delante del gen informador *lacZ*, obteniéndose así la construcción pMP-*phanI* (Tabla S1), que se comprobó mediante secuenciación. Por otra parte, se construyó un vector de expresión que contiene el gen completo *hanR*. Para ello, se amplificó mediante PCR el gen *hanR* desprovisto de promotor usando los cebadores hanR-EcoRI-F y hanR-XbaI-R (Tabla S2). El fragmento obtenido se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el vector de expresión pJN105 inducible por arabinosa, cortado con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pJN-HanR (Tabla S1). Seguidamente las construcciones obtenidas, pMP-*phanI* y pJN-HanR, se transformaron en *E. coli* DH5a teniendo en cuenta que los dos plásmidos eran compatibles. La cepa resultante de *E. coli* (pMP-*phanI* y pJN-HanR) (Tabla S1) se utilizó para estudiar el efecto que ejercía la presencia de AHLs en la expresión del gen sintasa. Para ello llevamos a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa con diferentes AHLs de origen sintético (C₄, C₆, C₈, C₁₀ y C₁₂-HSL) y también con extractos AHLs de la cepa silvestre FP35^T.

Tal y como se puede apreciar en la Figura 31, los niveles de actividad β -galactosidasa no mostraron diferencias con los valores obtenidos en ausencia de AHLs, lo que sugiere que la expresión del gen *hanI* no depende de las AHLs, al menos en los ensayos realizados en *E. coli*.

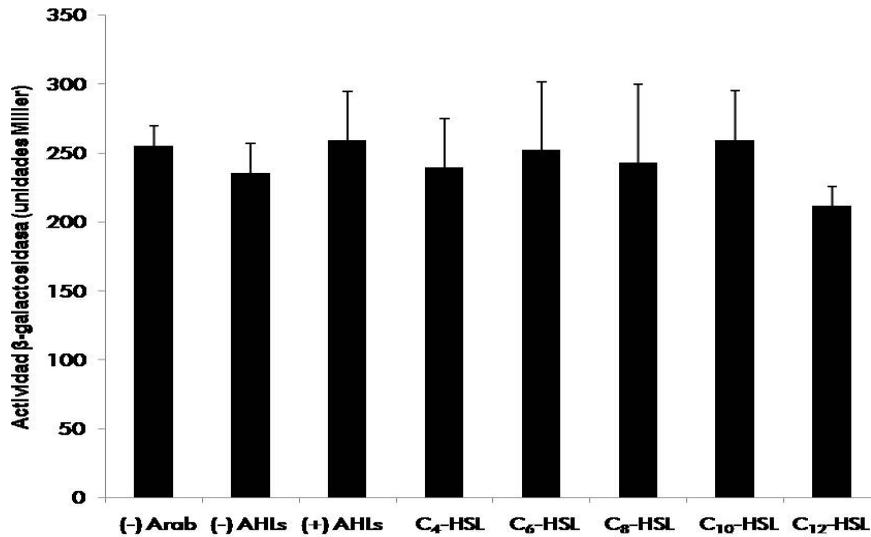


Figura 31. Análisis de la expresión del gen sintasa *hanI* mediante la medida de la actividad β -galactosidasa en *E. coli* (pMP-*phanI*, pJN-HanR). Inducción de la fusión transcripcional *phanI-lacZ* en *E. coli* (pJN-HanR) mediante la adición de diferentes moléculas señal AHLs de origen sintético por medida de la actividad β -galactosidasa. (-) Arab indica la actividad en ausencia de arabinosa y AHLs. (-) AHLs indica el resultado con 0,4% de arabinosa y ausencia de AHLs. Los resultados son la media de tres determinaciones.

Por otro lado, y con el mismo objetivo ensayamos la actividad β -galactosidasa en el mutante FP35 *hanI* (obtenido en el apartado 4.1) en ausencia y presencia de AHLs. Este mutante posee una fusión transcripcional del gen *lacZ* al gen *hanI* y con ello tiene interrumpido el gen sintasa. Como podemos comprobar en la Figura 32 la expresión del promotor del gen *hanI* en *H. anticariensis* también fue independiente de la adición de AHLs al medio de cultivo, al igual que ocurre con los ensayos en *E. coli*.

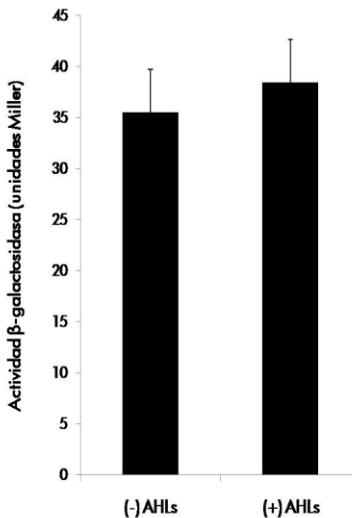


Figura 32. Análisis de la expresión del gen sintasa *hanI* mediante la medida de la actividad β -galactosidasa en *H. anticariensis*. Actividad β -galactosidasa de la fusión *phanI::lacZ* en ausencia y en presencia de extractos AHLs.

5. Función del gen *hanR* en *H. anticariensis* FP35^T

5.1. Inactivación del gen *hanR*

Para poder determinar el papel del gen *hanR* en la síntesis de las moléculas señal en *H. anticariensis*, se procedió a la obtención y caracterización de un mutante afectado en dicho gen. De forma resumida, se clonó un fragmento de 301pb del gen *hanR* en el vector suicida pVIK112 originando el plásmido recombinante pVIKHanR. El plásmido pVIKHanR fue transferido desde *E. coli* S17-1 λ pir al mutante espontáneo resistente a rifampicina FP35-R mediante conjugación biparental. Mediante un proceso de recombinación homóloga simple, el vector pVIKHanR se insertó en el gen *hanR* de la cepa FP35-R, con la consiguiente interrupción del gen *hanR*, obteniéndose el mutante FP35*hanR*.

Como se puede apreciar en la Figura 33, mediante ensayo en placa (Figura 33a) y por TLC (Figura 33b), el mutante FP35*hanR* produjo cantidades similares de AHLs e igual patrón de moléculas que la cepa silvestre FP35^T.

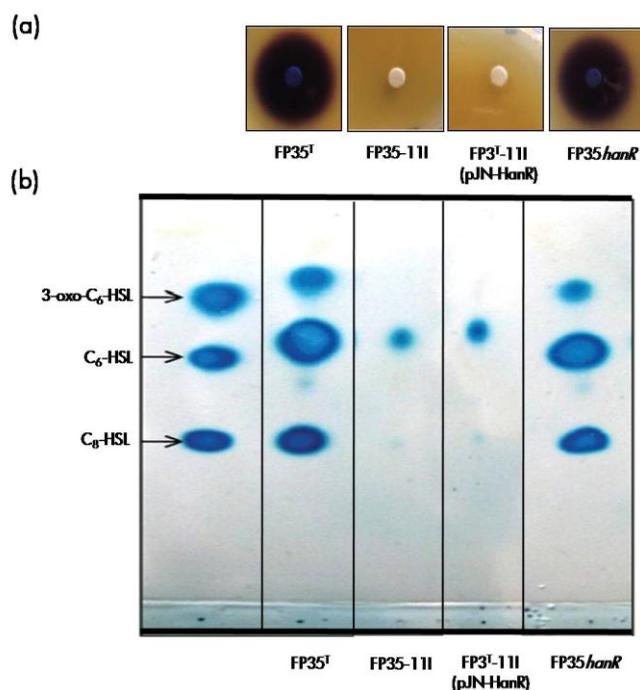


Figura 33. Análisis mediante TLC de la producción de AHLs en los mutantes *hanR* de *H. anticariensis* FP35^T. AHLs comerciales utilizadas como referencia: 3-oxo-C₆-HSL (4,7 pmol); C₆-HSL (804 pmol); C₈-HSL (31,6 pmol). **(a)** *C. violaceum* CV026 fue utilizada para el ensayo en placa. **(b)** *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) fue utilizada para el ensayo en TLC.

Puesto que el mutante FP35*hanR* sintetizaba niveles similares de AHLs que la cepa silvestre, mediante ensayos de RT-PCR se comprobó que la expresión del gen *hanI* era similar a la cepa silvestre FP35^T (Figura 34).

Por otra parte FP35-111, otro mutante en el cual el gen *hanR* (mini-Tn5::*hanR*) estaba bloqueado mediante la inserción del transposón, produjo menor cantidades de moléculas señal que el mutante FP35*hanR* (Figura 33) y esto se corresponde con el hecho de que la expresión del gen *hanI* era menor en dicho mutante (Figura 34). Este resultado podría deberse a un efecto polar del transposón sobre el gen *hanI* que se encuentra corriente abajo en el genoma. De hecho, la producción de AHLs no fue restaurada en el mutante FP35-111 mediante complementación *in trans* con el plásmido pJN-HanR (Figura 33).

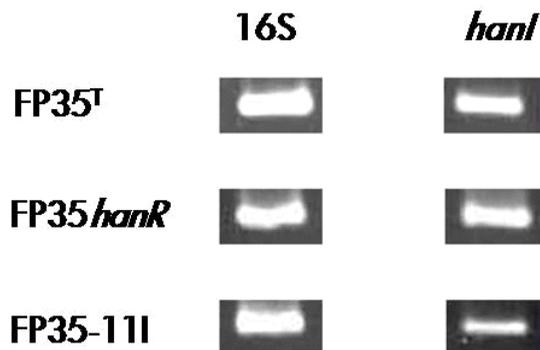


Figura 34. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen sintasa *hanI* en *H. anticariensis* FP35^T y en los mutantes FP35-111 y FP35*hanR*. El nivel de expresión del gen *hanI* en la cepa silvestre FP35^T se utilizó como referencia y el gen ribosomal 16S como control.

Tomando estos resultados en conjunto, la proteína HanR no pareció ser esencial para la producción de AHLs en *H. anticariensis* FP35^T.

5.2. Análisis de la regulación transcripcional del gen *hanR*

El análisis *in silico* de la región corriente arriba del gen *hanR* permitió identificar una posible caja *lux* (Tabla 13) lo que sugiere que la expresión del gen *hanR* era dependiente de las moléculas señal.

Tabla 13. Comparación de una posible secuencia "caja *lux*" corriente arriba del gen *hanR* en *H. anticariensis* FP35^T con la secuencia consenso "caja *lux*" y otras secuencias de "caja *lux*" conocidas.

Gen	Secuencia <i>lux</i> box
<i>splR</i> (<i>Serratia plymuthica</i> RVH1)	ACCTGACCGTACAGGTCAGGT
<i>spnR</i> (<i>Serratia marcescens</i> SS-1)	ACCTGACG--AAAGGTCAGGT
<i>esaR</i> (<i>Pantoea stewartii</i>)	CCCTGTACT-ATAGTGCAGGT
<i>luxI</i> (<i>Aliivibrio fischeri</i>)	ACCTGTAGG-ATCGTACAGGT
<i>hanR</i> (<i>Halomonas anticariensis</i> FP35 ^T)	TACTTACAG-GGAATTCAGCG
Secuencia consenso (Egland y Greenberg, 1999)	NRCTGSRXY-ASRWYNCAGYN

N=A, T, C, o G; R=A o G; S=C o G; Y=T o C; X=N o espacio.

Para determinar si el gen *hanR* dependía de las moléculas señal AHLs realizamos ensayos de expresión de la región promotora del gen *hanR* en *E. coli* en ausencia y presencia de moléculas señal sintéticas y también con extractos de AHLs de *H. anticariensis*. Para ello, se construyó una fusión transcripcional de la región promotora del gen *hanR* y el gen informador *lacZ* desprovisto de promotor y se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa en *E. coli* que portaba el vector de expresión de *hanR*. De forma resumida, se amplificó mediante PCR un fragmento de 269pb que contenía la región promotora del gen *hanR*. Con este fin se diseñaron los cebadores hanRsub-*Bgl*I-F y hanRsub-*Xba*I-R (Tabla S2). El producto de PCR se digirió con las enzimas *Bgl*I y *Xba*I, y el fragmento resultante se clonó en el vector pMP220, cortado con las mismas enzimas, delante del gen informador *lacZ*, obteniéndose así la construcción pMP-*phanR* (Tabla S1), que se comprobó mediante secuenciación. Por otra parte, se utilizó el vector de expresión pJN105 inducible por arabinosa que contenía el gen completo *hanR* (pJN-HanR) construido en el apartado 4.2. Seguidamente las construcciones obtenidas, pMP-*phanR* y pJN-HanR, se transformaron en *E. coli* DH5a. La cepa resultante de *E. coli* (pMP-*phanR* y pJN-HanR) (Tabla S1) se utilizó para estudiar el efecto que ejercía la presencia de AHLs en la expresión del gen regulador transcripcional *hanR*. Para ello, llevamos a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa con diferentes AHLs de origen sintético (C₄, C₆, C₈, C₁₀ y C₁₂-HSL) y también con extractos AHLs de la cepa silvestre FP35^T.

Como podemos observar en la Figura 35, la expresión del promotor *phanR* mostró niveles de actividad β -galactosidasa similares tanto en ausencia como en presencia de diferentes AHLs en las condiciones ensayadas.

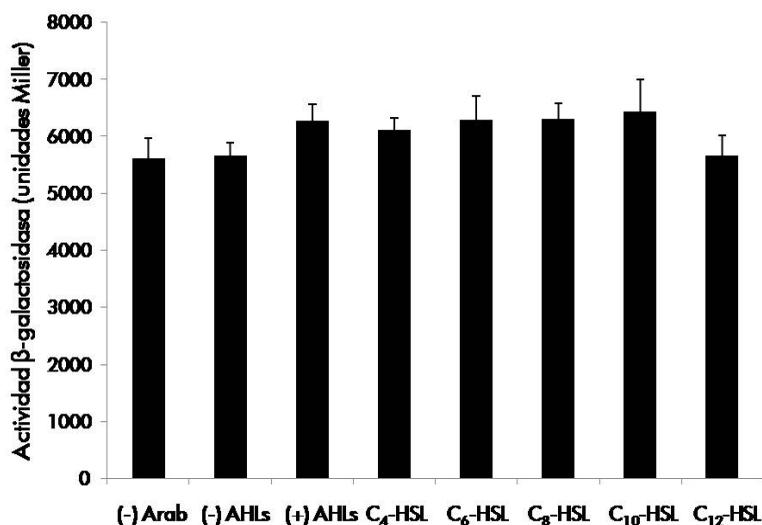


Figura 35. Expresión del promotor *hanR* en *E. coli* (pMP-*phanR* y pJN-HanR) mediante la adición de diferentes moléculas señal AHLs. (-) Arab indica actividad en ausencia de arabinosa y AHLs. (-) AHLs indica el resultado con 0,4% de arabinosa y ausencia de AHLs. Los resultados son la media de tres determinaciones.

Para confirmar el resultado anterior medimos la expresión del gen *hanR* en el mutante FP35*hanI* deficiente en la producción de AHLs en ausencia y presencia de extractos AHLs mediante RT-PCR. Los resultados demostraron que la transcripción del gen *hanR* no estaba afectada por la ausencia de AHLs; tampoco ocurría esto cuando se añadían moléculas señal al medio de cultivo (Figura 36).

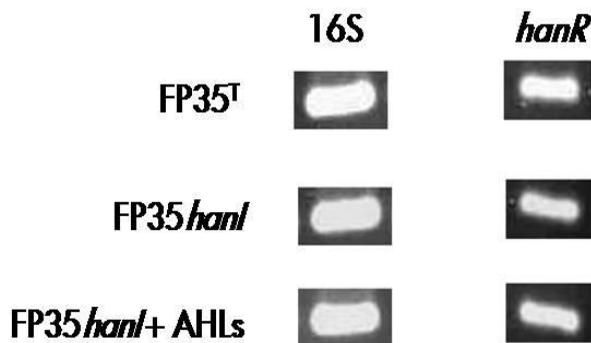


Figura 36. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen *hanR* en *H. anticariensis* FP35^T y en el mutante FP35*hanI* en ausencia y presencia de extractos AHLs. El nivel de expresión del gen *hanR* en la cepa silvestre FP35^T se utilizó como referencia y el gen ribosomal 16S como control.

Todos los datos obtenidos sugieren que el gen *hanR* se transcribía a partir de su propio promotor y no parecía ser modulado por las moléculas señal AHLs en las condiciones ensayadas.

DISCUSIÓN

El estudio de la producción de autoinductores en algunas cepas productoras de exopolisacáridos del género *Halomonas* fue llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en el año 2004 y permitió la detección por primera vez de autoinductores del tipo *N*-acil homoserín lactonas (AHLs) en un grupo de bacterias halófilas (Llamas y col., 2005). En este trabajo se demostró que *H. anticariensis* FP35^T, un bacteria halófila moderada aislada de suelos salinos de la Laguna de Fuente de Piedra (Antequera, Málaga) (Martínez-Cánovas y col., 2004a), producía cantidades significativas de autoinductores que llegaban a ser cuatro veces mayores que en las demás cepas de *Halomonas* ensayadas. Las moléculas señal fueron identificadas y caracterizadas como: *N*-butanoil homoserín lactona (C₄-HSL), *N*-hexanoil homoserín lactona (C₆-HSL), *N*-octanoil homoserín lactona (C₈-HSL) y *N*-dodecanoil homoserín lactona (C₁₂-HSL). A raíz de este estudio y como continuación nos propusimos identificar y caracterizar los genes responsables de la producción de dichas moléculas señal en *H. anticariensis* FP35^T.

Para dar cumplimiento a nuestro objetivo se podían seguir diferentes enfoques o estrategias. En nuestro caso elegimos la mutagénesis con transposones, concretamente con el transposón mini-

Tn5Km2, para localizar los genes que intervienen en la síntesis de moléculas señal en *H. anticariensis* FP35^T. Este tipo de mutagénesis se había utilizado anteriormente en microorganismos halófilos para aislar e identificar genes relacionados con la haloadaptación (Cánovas y col., 1998), el gen responsable de la α -amilasa en *Halomonas meridiana* (Coronado y col., 2000), los genes de la enzima carbamilmfosfato sintetasa en *Halomonas eurihalina* (Llamas y col., 2003), así como los genes responsables de la síntesis de una nitrato reductasa anaerobia (Argandoña y col., 2005) y los genes implicados en la biosíntesis del exopolisacárido maurano en *Halomonas maura* (Arco y col., 2005).

En *H. anticariensis* FP35^T, la obtención del transconjugante FP35-111, deficiente en la producción de moléculas señal AHLs, nos ha permitido identificar una región génica implicada en la síntesis de dichos autoinductores. Los dos ORFs completos identificados (ORF1 y ORF2) presentaban homología con genes homólogos a *luxR/luxI*, siendo el ORF1 el que fue interrumpido en su lectura por el transposón mini-Tn5Km2 (Figura 28a).

Los genes quorum sensing *hanR* y *hanI* identificados en *H. anticariensis* FP35^T presentan una organización en tándem (Figura 28a). Esta misma organización ha sido descrita recientemente en otros microorganismos como *Rhodopseudomonas palustris* (Shaefer y col., 2008), *Gluconacetobacter intermedius* (Iida y col., 2008), *Pseudomonas corrugata* (Licciardello y col., 2007), *Mesorhizobium tianshanense* (Zheng y col., 2006) y *Burkholderia cenocepacia* (Malott y col., 2005). Sin embargo, en otras bacterias existe otro tipo de organización como es el caso de *Aliivibrio fischeri*, cuyos genes *luxR* y *luxI* se transcriben divergentemente (Engebrecht y Silverman, 1984).

La implicación de los genes *hanR* y *hanI* en la síntesis de moléculas señal AHLs en *H. anticariensis* fue evaluada mediante la inactivación de cada uno de dichos genes. La inactivación del gen sintasa *hanI* tuvo como resultado la pérdida total de la producción de moléculas señal AHLs. Este resultado parece indicar que la proteína HanI es la única sintasa responsable de la síntesis de las diferentes AHLs (C_{4r} , C_{6r} , C_{8r} , y C_{12} -HSL) en *H. anticariensis* FP35^T. Este hecho no es sorprendente puesto que ya se ha descrito en otras bacterias como es el caso de *Mesorhizobium tianshanense* (Zheng y col., 2006). Además, se ha propuesto que las diferencias en la longitud de la cadena de ácidos grasos de las AHLs no se deben únicamente a la especificidad de la enzima de síntesis, si no que también depende de la disponibilidad de una fuente celular de proteínas transportadoras de acilos (Fuqua y Eberhard, 1999; Watson y col., 2002). Por otro lado, la inactivación del gen *hanR* no afectó la síntesis de AHLs. Este resultado fue inesperado dado que la mayoría de los mutantes *luxR* descritos en otras bacterias producen AHLs en niveles basales. Cabría especular que la proteína HanR no fuera esencial para la producción de AHLs en *H. anticariensis*, aunque esta hipótesis necesitaba una confirmación teniendo en cuenta que las proteínas de la familia LuxR, en los sistemas QS clásicos, forman un complejo con la molécula

señal tipo AHL y tras su unión al ADN, activan o reprimen la transcripción de determinados genes, entre ellos el gen sintasa responsable de la producción de AHLs. A raíz de este resultado, nos planteamos estudiar la autoregulación de los genes *hanR* y *hanI* en *H. anticariensis* puesto que constituye un rasgo distintivo de los sistemas quorum sensing.

El análisis transcripcional de los genes *hanR* y *hanI* puso de manifiesto que ambos genes se transcriben como una sola unidad transcripcional en *H. anticariensis* FP35^T. Por otro lado, el análisis *in silico* de la secuencia de ambos genes permitió la identificación de dos regiones promotoras corriente arriba de cada gen. Dicha actividad promotora se comprobó experimentalmente mediante ensayos de actividad β -galactosidasa en *H. anticariensis* y resultó que la actividad promotora corriente arriba del gen *hanR* era mayor que la actividad promotora detectada corriente arriba del gen *hanI*. Este resultado parece ser lógico teniendo en cuenta que ambos genes constituyen un operón, sin embargo el hecho de que el gen *hanI* posea su propio promotor hace pensar que dicho gen pueda expresarse por sí mismo. Por otra parte, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, hemos confirmado que la expresión de *hanR* y *hanI* es dependiente de la densidad celular al igual que ocurre en la mayoría de los sistemas quorum sensing (González y Marketon, 2003).

Los resultados de la transcripción del gen sintasa *hanI* a partir de su promotor en *H. anticariensis* demuestran que la expresión del gen *hanI* es independiente de las AHLs y por lo tanto no existe autoinducción. Esta regulación se ha encontrado en otras bacterias pero difiere del sistema clásico descrito en *A. fischeri* (Andersson y col., 2000; Christensen y col., 2003; Nasser y col., 1998; Throup y col., 1995). Este resultado viene apoyado por el hecho de que no hemos podido identificar el elemento regulador "caja *lux*" corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *hanI*. Por el contrario, la presencia de una posible "caja *lux*" corriente arriba del codón de inicio del gen *hanR* sugiere que éste sí sería dependiente de las AHLs. Sin embargo a partir de los datos de expresión del gen *hanR* en ausencia y presencia de AHLs exógenas encontramos que la transcripción del gen *hanR* no parece ser modulada por las AHLs y que éste se transcribe a partir de su propio promotor, al menos bajo las condiciones ensayadas. Una de las explicaciones podría consistir en que el regulador HanR tiene la capacidad de unirse a su propio promotor sin unirse a las AHLs. Otra de las explicaciones reside en el hecho que *H. anticariensis* podría tener otros reguladores transcripcionales del tipo LuxR. Estos reguladores denominados LuxR "solos" o huérfanos están muy bien caracterizados y se ha demostrado que están integrados con los sistemas QS en otros microorganismos (Patankar y González, 2009; Subramoni y Venturi, 2009). Un caso sería el del sistema QS SinRI de *Sinorhizobium meliloti* en el que se ha descrito que el regulador transcripcional ExpR, un regulador homólogo a los reguladores LuxR "solos" o huérfanos, se une a la región intergénica de los genes *sinR* y *sinI* y afecta la transcripción del gen sintasa *sinI* (Hoang y col., 2004; McIntosh y col., 2009). Por otro lado, no podemos descartar

una posible regulación a través del sistema global regulador de dos componentes GacS/GacA que es dependiente de la densidad celular y controla la producción de moléculas señal AHLs de QS en otras bacterias, entre otras funciones celulares, y que será objeto de estudio en el siguiente capítulo.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Listado de cepas bacterianas y plásmidos construidos en este trabajo.

Cepa/plásmido	Genotipo/descripción
Cepas de <i>Halomonas anticariensis</i>	
FP35-R	Mutante rifampicina-resistente espontáneo de FP35, Rif ^R
FP35-111	FP35-R que contiene <i>hanR::mini-Tn5Km2</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>hanI</i>	FP35-R que contiene <i>hanI::lacZ</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>hanR</i>	FP35-R que contiene <i>hanR::lacZ</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 (pMP220)	FP35-R que contiene pMP220, Rif ^R , Tc ^R
FP35 (pMP- <i>phanR</i>)	FP35-R que contiene pMP- <i>phanR</i> , Rif ^R , Tc ^R
FP35 (pMP- <i>phanI</i>)	FP35-R que contiene pMP- <i>phanR</i> , Rif ^R , Tc ^R
FP35-111 (pJN-HanR)	FP35-R que contiene <i>hanR::mini-Tn5Km2</i> y pJN-HanR, Rif ^R , Km ^R , Gm ^R
FP35 <i>hanI</i> (pJN-HanI)	FP35-R que contiene <i>hanI::lacZ</i> y pJN-HanI, Rif ^R , Km ^R , Gm ^R
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	
DH5a (pMP- <i>phanI</i> y pJN-HanR)	DH5a que contiene pMP- <i>phanI</i> y pJN-HanR, Tc ^R , Gm ^R
DH5a (pMP- <i>phanR</i> y pJN-HanR)	DH5a que contiene pMP- <i>phanR</i> y pJN-HanR, Tc ^R , Gm ^R
Plásmidos:	
pP111	pGEM-T [®] que contiene un fragmento de <i>PstI</i> de 5kb que lleva insertado el transposón mini-Tn5Km2, Ap ^R , Km ^R
pBFP35	pGEM-T [®] que contiene un producto de PCR inversa de 1,6kb amplificado a partir de un fragmento de 2,2kb del ADN genómico de la cepa FP35, Ap ^R
pVIKHanI	pVIK112 que contiene un fragmento interno del gen <i>hanI</i> , Km ^R
pVIKHanR	pVIK112 que contiene un fragmento interno del gen <i>hanR</i> , Km ^R
pMP- <i>phanI</i>	pMP220 que contiene la región promotora del gen <i>hanI</i> , Tc ^R
pMP- <i>phanR</i>	pMP220 que contiene la región promotora del gen <i>hanR</i> , Tc ^R
pJN-HanI	pJN105 que contiene el gen <i>hanI</i> intacto, Gm ^R
pJN-HanR	pJN105 que contiene el gen <i>hanR</i> intacto, Gm ^R

Tabla S2. Secuencia de los cebadores sintéticos.

Cebadores y función	Secuencia (5'-3')*
Localización de la inserción Tn5	
111-Tn5	CTGTGCTGAGGCCGTGC
Secuenciación del plásmido pP11	
11P-T7	TAATACGACTCACTATAGGG
11P-0	CCTCGGGAATGATCTTGGT
11P-1	GGTTGGTGCAGATCGTG
11P-2	GATCCCACTTTGCTCGACTC
11P-3	CCGAAGACGTCAATCCATCAG
PCR inversa 111	
S-111-F	CTGTGCTGAGGCCGTGC
S-111-R	CCAGAAAACATCCCTGAAC
IPCR-111-F	AAGTTGATGTGGGCAAGTCGGTTGC
IPCR-111-R	CTTGATACAAGCCCTCCCATTCACATCC
Secuenciación del plásmido pBFP35	
11BFP35-SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
11BFP35-1	CATCGCAATCTTGCTGCTAGG
11BFP35-2	CTGCCGACCTTTGTGCC
PCR gen <i>hanI</i>	
hanI- <i>EcoRI</i> -F	CCGGAATTCATGAAGAAAATGAACCATGG
hanI- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGACTATACAAGCAGTCCAAAAGC
PCR fragmento interno <i>hanI</i>	
hanIsub- <i>EcoRI</i> -F	GCGGAATTCATTGTTGTTGAGACAG
hanIsub- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGACTCTCCCTTATGAACGA
PCR región promotora <i>phanI</i>	
phanI- <i>EcoRI</i> -F	CCGGAATTCCTAAAAGCTGTATGTGAC
phanI- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGACCACTTATAGTTGCAATCC
PCR gen <i>hanR</i>	
hanR- <i>EcoRI</i> -F	CCGGAATTCATGGAGTTAGTGTGGTACG
hanR- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGATTACAATATATCTAACAGTAAAGC
PCR fragmento interno <i>hanR</i>	
hanRsub- <i>EcoRI</i> -F	GCGGAATTCATGGAAGTAAGGG
hanRsub- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGACAGGCATATCTGAAAAG
PCR región promotora <i>phanR</i>	
phanR- <i>BglI</i> -F	CCGAGATCTTCTCAGTCATTGATAATGTATCA
phanR- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGATTGACTTTATCATGGCGTTA
RT-PCR region intergénica <i>hanR-hanI</i>	
hanR-RT-F	GATGGATTGACGTCCTTCGG
hanI-RT-R	GGTATATCCCATCCTCGTCT
PCR cuantitativa amplicón 16S	
qRT-16SFP35-F	ACAGAAGAAGCACCGGCTAA
qRT-16SFP35-R	CTCCTGCACTCTAGCCCAAC
PCR cuantitativa amplicón <i>hanR</i>	
qRT-hanR-F	TGAATGGGAGGGCTTGATC
qRT-hanR-R	CTGAACAAAGCCCGAAGTCT
PCR cuantitativa amplicón <i>hanI</i>	
qRT-hanI-F	GTAGGAAATGGGCAGGTTTG
qRT-hanI-R	AAGCCATCGACAATCACCTC

*Los sitios de restricción incorporados a los cebadores se encuentran subrayados.

Capítulo II.

Control del sistema quorum sensing *hanR/hanI* mediante el sistema regulador de dos componentes *gacS/gacA* en *Halomonas anticariensis* FP35^T

Este capítulo ha dado lugar a la publicación:

Ali Tahrioui, Emilia Quesada and Inmaculada Llamas (2012). **Genetic and phenotypic analysis of two-component regulatory system in *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium.** *Microbiology* (en revisión).

RESUMEN

En este capítulo se describe la integración del sistema quorum sensing (QS) HanR/HanI en un sistema global de comunicación intercelular en *Halomonas anticariensis* FP35^T. El sistema regulador de dos componentes (TCS) está compuesto por una histidina quinasa híbrida (HK) y un regulador de respuesta (RR) que fueron identificados como homólogos del sistema GacS/GacA descrito como elemento regulador de sistemas QS en otras bacterias Gram negativas. El análisis de los extractos de *N*-acil homoserín lactonas (AHLs) de los cultivos de los mutantes *gacS* y *gacA* mostró una disminución en la producción de AHLs en comparación con la cepa silvestre FP35^T. Además, la expresión de los genes *hanR* y *hanI*, cuantificada mediante ensayos RT-PCR, disminuyó considerablemente con respecto a la cepa silvestre FP35^T. Este hallazgo indica que el sistema TCS GacS/GacA tiene un efecto regulador positivo sobre el sistema QS HanR/HanI y sugiere su implicación como regulador global en las estrategias de comunicación intercelular en *H. anticariensis* FP35^T.

ABSTRACT

A multisensory, hybrid, histidine kinase and a response regulator, which together probably constitute a two-component regulatory system (TCS), have been located in *Halomonas anticariensis* FP35^T by transposon mutagenesis. This TCS is homologous to the GacS/GacA system described in many Gram-negative bacteria. An analysis of crude *N*-acyl homoserine lactone (AHL) extracts from cultures of FP35*gacS* and FP35*gacA* mutants showed that they produced lower quantities of AHLs than the wild-type strain. In addition, RT-PCR analysis revealed a considerable decrease in the expression of the quorum-sensing genes *hanR* and *hanI* compared to the wild-type strain. This result indicates that the GacS/GacA TCS exerts a positive effect upon the quorum-sensing HanR/HanI system and suggests its integral involvement in the intercellular communication strategies of *H. anticariensis* FP35^T.

En los últimos años se ha demostrado que el sistema quorum sensing (QS) puede estar integrado en una red de regulación global de la expresión génica que responde a señales externas. Este hecho hace que las bacterias sean capaces de modular la producción de moléculas señal de manera que su concentración no sólo dependa de la densidad poblacional si no que también se regule por parámetros ambientales específicos, gracias a sistemas de regulación interconectados y organizados en paralelo o en cascada. Un ejemplo de ello son los sistemas reguladores de dos componentes que utilizan las bacterias para percibir los diferentes estímulos del medioambiente, transmitir la información intracelularmente, y posteriormente convertirla en un cambio apropiado de la expresión génica para responder de forma adecuada a los cambios ambientales.

El sistema regulador de dos componentes GacS/GacA es uno de los mejor estudiados y está conservado en una amplia variedad de bacterias Gram negativas, incluyendo *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y *Vibrio*. Se ha descrito que el sistema GacS/GacA está implicado en el control de varias funciones celulares que se expresan durante la fase estacionaria como la producción de factores de virulencia, la formación de biofilms, la biosíntesis de exopolisacáridos (EPSs) y la síntesis de metabolitos secundarios y moléculas señal de los sistemas QS, entre otras (Bertani y Venturi, 2004; Blumer y col., 1999; Castañeda y col., 2000, 2001; Chancey y col., 1999; Marutani y col., 2008; Reimann y col., 1997).

En este capítulo se pretende caracterizar el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA en *H. anticariensis* FP35^T y dilucidar la interrelación que existe con el sistema quorum sensing HanR/HanI.

RESULTADOS

1. Aislamiento de los mutantes FP35-48XII y FP35-79X deficientes en la producción de AHLs

Como explicábamos en el capítulo I, para obtener mutantes deficientes en la producción de *N*-acil homoserín lactonas (AHLs) realizamos mutagénesis insercional via conjugación biparental. Uno de los mutantes permitió la identificación y caracterización del sistema QS responsable de la producción de AHLs en *H. anticariensis* FP35^T (Capítulo I) (Tahrioui y col., 2011). Dos de los otros mutantes, denominados FP35-48XII y FP35-79X (véase la Tabla S3 en el apartado de Material Suplementario), han sido utilizados para los estudios correspondientes a este capítulo.

La Figura 37 muestra como los mutantes FP35-48XII y FP35-79X produjeron menor cantidad de AHLs que la cepa silvestre FP35^T. La producción de AHLs se determinó mediante ensayo en placa empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

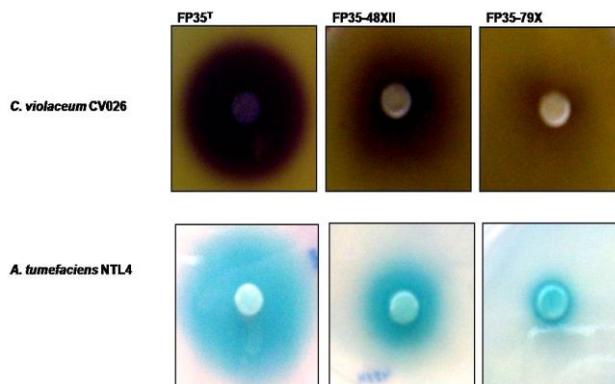


Figura 37. Producción de AHLs en las cepas FP35^T, FP35-48XII y FP35-79X de *H. anticariensis*. Los extractos de AHLs fueron analizados en un ensayo en placa utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 en medio LB/MC y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio AB/X-gal.

2. Análisis de las secuencias de los genes afectados por la inserción del transposón en los mutantes FP35-48XII y FP35-79X

Con el fin de identificar los genes interrumpidos en su lectura por el transposón miniTn5Km2, en primer lugar realizamos un análisis por Southern blot que puso de manifiesto la integración de una sola copia del transposón en el cromosoma de los mutantes FP35-48XII y FP35-79X. Para determinar la secuencia de las regiones adyacentes a la inserción del transposón, se siguió la misma estrategia que empleamos para caracterizar el mutante FP35-111 en el capítulo anterior.

2.1. Localización del transposón miniTn5 en el mutante FP35-48XII

De forma resumida, para aislar el fragmento que contiene el transposón miniTn5Km2, el ADN genómico de *H. anticariensis* FP35-48XII fue digerido con diferentes enzimas de restricción que no tenían sitio de corte en la región del transposón. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados en gel de agarosa y posteriormente transferidos a una membrana de nylon. Seguidamente se realizó una hibridación mediante Southern blot para detectar los fragmentos de ADN que contenían el transposón y presentaban un tamaño adecuado para su clonación. Finalmente, los fragmentos de ADN digeridos con la enzima de restricción *SalI* fueron clonados en el vector pUC19, seleccionándose el plásmido recombinante pS48XII resistente a kanamicina que contenía un inserto de 4,4kb. La secuenciación de las regiones del ADN adyacentes al transposón miniTn5Km2 se llevó a cabo utilizando los cebadores universales comerciales M13-F y M13-R y los cebadores de diseño que se describen en la Tabla S4 (véase el apartado de Material Suplementario) que permitieron avanzar a lo largo de la secuencia del fragmento génico clonado. La secuencia obtenida del fragmento *SalI* (4,4kb) permitió identificar dos ORFs. Un ORF completo que presentaba homología con el gen cisteína sintasa B (*cysM*) y un segundo ORF parcial, en el cual se había insertado el transposón miniTn5Km2 y presentaba homología

con el gen *gacS* que codifica una histidina quinasa de un sistema regulador de dos componentes. Este resultado nos indicó que habíamos localizado parte de un sistema regulador de dos componentes que podría tener efecto sobre la producción de AHLs en *H. anticariensis* FP35^T. Para completar la secuencia del ORF parcial continuamos con la secuenciación corriente abajo de la secuencia conocida. Para ello, se realizaron dos experiencias de PCR inversa sucesivas. En primer lugar se eligió el fragmento de restricción *Pst*I mediante hibridación Southern blot por tener un tamaño adecuado para su clonación (Figura 38). A partir de la nueva secuencia se procedió de forma similar y se seleccionó el fragmento de restricción *Eco*RI (Figura 39).

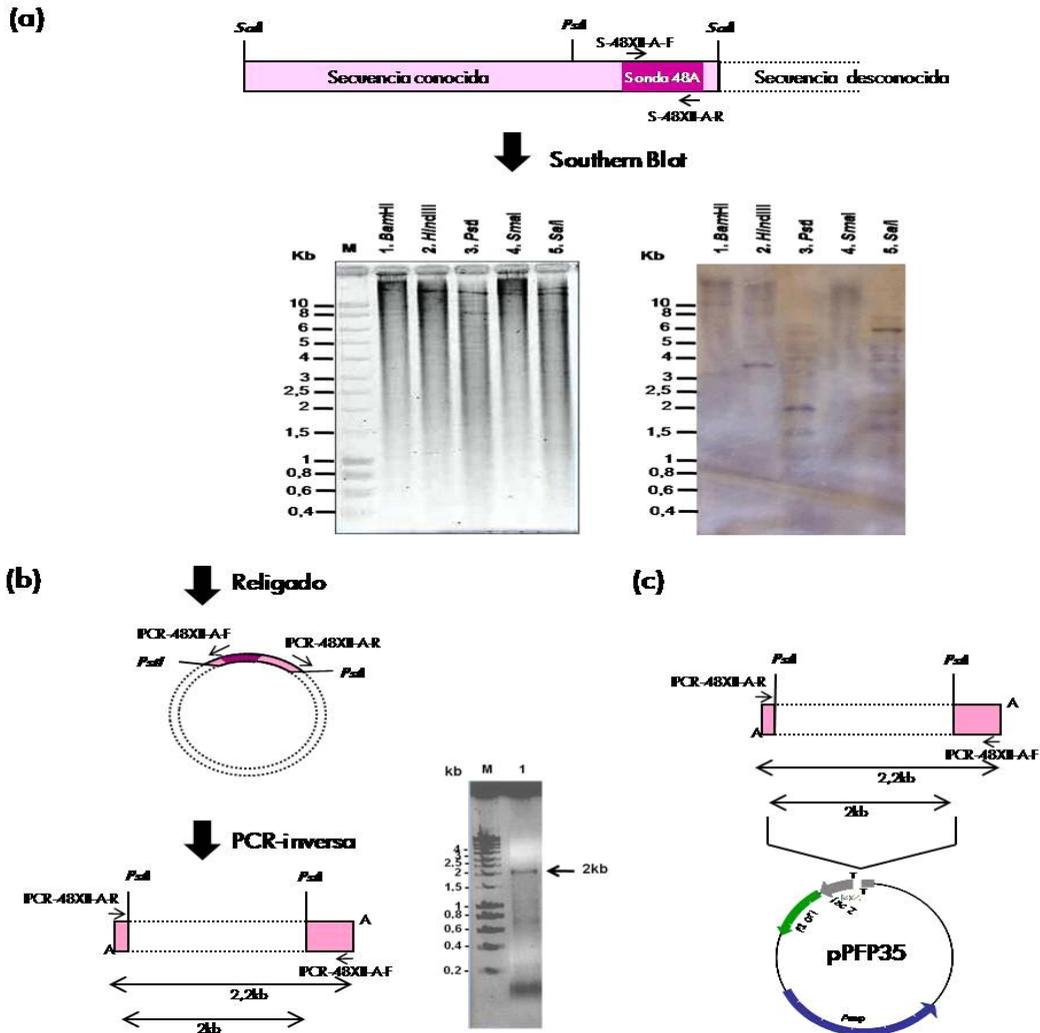
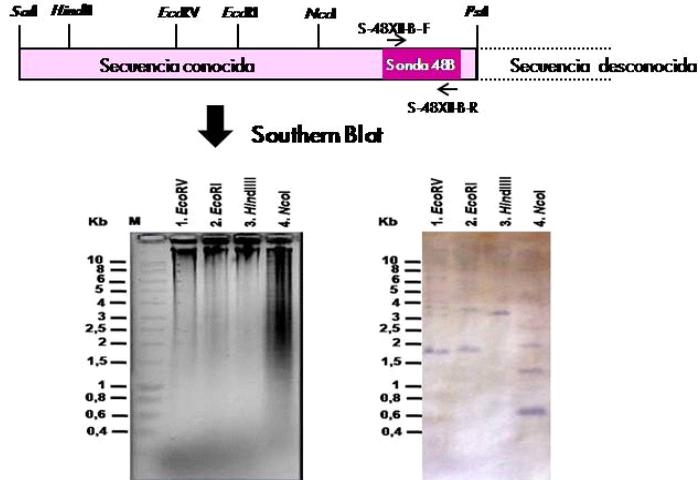
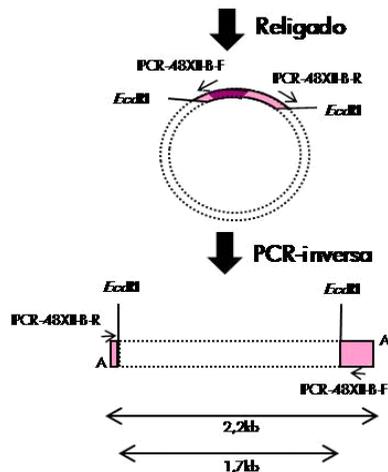


Figura 38. PCR-inversa 48A. Amplificación de un fragmento *Pst*I corriente abajo de la secuencia conocida. (a) Digestión de ADN genómico de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda 48A. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carriles 1-5, ADN de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* digerido con las enzimas *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Sma*I y *Sal*I. (b) Amplificación mediante PCR-inversa de los fragmentos de restricción *Pst*I religados empleando los cebadores IPCR-48XII-A-F e IPCR-48XII-A-R. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carril 1, fragmento *Pst*I amplificado por PCR-inversa. (c) Mapa de restricción del plásmido recombinante pPFP35.

(a)



(b)



(c)

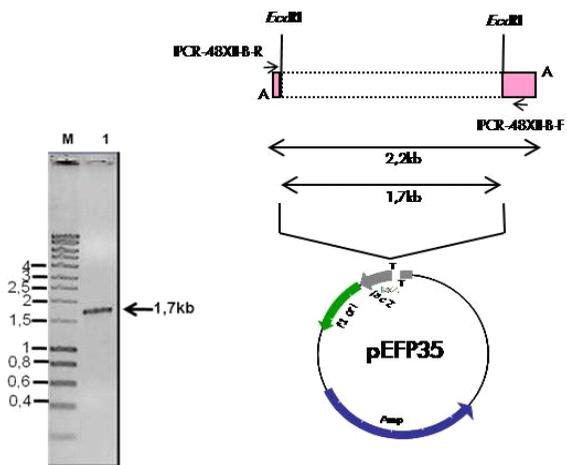


Figura 39. PCR-inversa 48B. Amplificación de un fragmento *EcoRI* corriente abajo de la secuencia conocida. (a) Digestión de ADN genómico de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda 48B. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carriles 1-5, ADN de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* digerido con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* y *NcoI*. (b) Amplificación mediante PCR-inversa de los fragmentos de restricción *EcoRI* religados empleando los cebadores IPCR-48XII-B-F e IPCR-48XII-B-R. Carril M, Marcador molecular (10kb-100pb); Carril 1, fragmento *EcoRI* amplificado por PCR-inversa. (c) Mapa de restricción del plásmido recombinante pEFP35.

Los plásmidos recombinantes obtenidos, pPFP35 y pEFP35 (véase la Tabla S3 en el apartado de Material Suplementario de este capítulo), fueron secuenciados y permitieron aumentar la secuencia conocida a un total de 4,8Kb. Los cebadores utilizados para la secuenciación se describen en la Tabla S4. El análisis de toda la secuencia permitió la identificación de cuatro ORFs completos (Figura 40). La secuencia fue depositada en la bases de datos GenBank/EMBL/DDJB con el número de acceso: JQ437497 (véase el apartado Anexos).

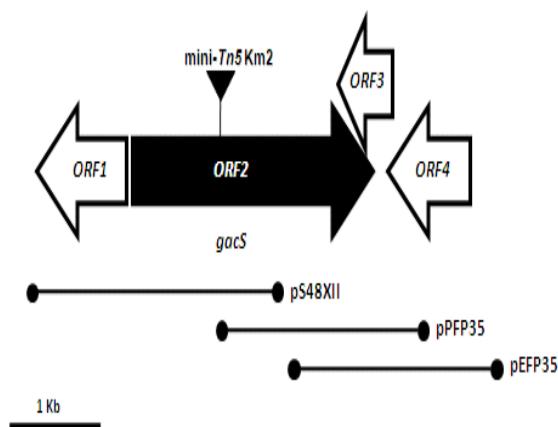


Figura 40. Organización genética de la region cromosómica del mutante FP35-48XII que contiene el transposón miniTn5Km2. Las flechas indican la supuesta dirección de transcripción de los genes. El sitio de inserción del transposón se indica con un triángulo. El ORF correspondiente al gen *gacS* se destaca en negro. Los plásmidos utilizados para la secuenciación, pS48XII, pPFP35 y pEFP35, que contienen los fragmentos de restricción *SalI*, *PstI* y *EcoRI*, se indican en el esquema.

El estudio de las proteínas codificadas por los ORFs se realizó mediante la utilización del programa DNASTAR, y posteriormente la comparación de las nuevas secuencias de aminoácidos se realizó con la ayuda del programa BLAST.

En la Tabla 14 se describen los ORFs encontrados en el fragmento de ADN procedente del análisis del mutante FP35-48XII.

Tabla 14. Descripción de los ORFs encontrados en el fragmento analizado en el mutante FP35-48XII.

ORF	Gen	Nº nucleótidos (pb)	Nº aminoácidos	Función probable
1	<i>cysM</i>	897	298	Cisteína sintasa B
2	<i>gacS</i>	2.745	914	Histidina quinasa
3	<i>acpS</i>	381	126	Transferasa 4'-fosfopanteteinil
4	<i>psxJ</i>	828	275	Sintasa peridoxina 5'-fosfato

El transposón miniTn5Km2 se insertó entre las bases 1.585 y 1.586 del ORF2 (Figura 41) en el cromosoma del mutante FP35-48XII. Este ORF2, de 2745pb, codifica una proteína histidina quinasa de 914aa que presenta homología con la proteína GacS de otras bacterias tales como *Chromohalobacter salexigens* (54%), *Halomonas elongata* (53%) y miembros del género *Pseudomonas* (34%-40%). Este ORF2 se denominó *gacS* al igual que sus homólogos (Figura 41).

GTATTGCACCTCCCTATGGCATACTGGGAACTTTTCGATCGTCTGTTACTGGATATCCGCGA 1
 TGCCGATGAGAACCGCCCTATTGTTACTGCTGCTGGGTGCTCCCCTGGTTGTGATGCTGT 61
 M P M R T R L L L L L L L G A P L V V M L 20
 TGCTCTCCTTTTCAGTCGATCCGGCAGCATGCCAGGTTTCGCAAGGCTGCCTTGGAAACAC 121
 L L S F Q S I R H D A Q V R K A A L E T 40
 GCCTGACCAGGATGCCGAAGTACGACCCGATTGGCTGGTGCCTTGTCCCGAAGCG 181
 R L T T S A E L V A P A L A G A L S R S 60
 ATTCGGCCGCTTTGCACAGCTTGGCTCAGAGACTGCTGAATATCGACGAAGTCCGCTCAC 241
 D S A A L H S L A Q R L L N I D E V R S 80
 TTCGCATTACGACACGAGGCGGACGCTACTACATCTTGGCCAACAGCATATGGGCG 301
 L R I H D T R G R T L L H L G Q Q H M G 100
 TCGAATCACCGAGGGGAACCGATGCCCCCTTGGCTCGGCAGCAACGACCACTGGCATATGA 361
 V E S P R G T D A P L L G S N D H W H M 120
 GCGTGCCCATCCCGCAGGGACACGAAACCTAACCGATGGCTGACGCTGACGG 421
 S V P I P P G T R N N E P N R W L T L T 140
 CTGACACCACCTATTGGCATTGGGAACCTATCGTCAACTGGCCATTACCTCACTGATAG 481
 A D T T S L A L L G T Y R Q L A I T S L I 160
 GCTTGGCTATTGGCTATTGCTTTTCTGGTARGCTATCTCGCCAGTCCGCACTGACTC 541
 G L V I G L L L F L V A Y L A S R H L T 180
 GCCCCCTACTCGAGGCCAGCAAACCCTGCTGCGCCTCAATGCCGGCGACTACCAGCACC 601
 R P L L E A Q Q T L L R L N A G D Y Q H 200
 GCATGTCCAGCCGAGGTGCTAAAGAGGTGAAGCAACTTGCCTCCAGCATCAACGCACTGG 661
 R M S S R G A K E V K Q L A S S I N A L 220
 CCGAGCACCTCAGCCATGCCCATGACGATATGCAGCGCCATATCGAGCAGACGACTCAGG 721
 A E H L S H A H D D M Q R H I E Q T T Q 240
 ACCTTCAAGAGTCGATGGAGACGATCGAGATCAAGAACATCGAACTCGACATGGCTCACC 781
 D L Q E S M E T I E I K N I E L D M A H 260
 GCCGAGCTCTTGAGGCCAACCGCATCAAGACCGAGTTTCTGGCCAACATGAGCCATGAGA 841
 R R A L E A N R I K T E F L A N M S H E 280
 TTCGCACGCCTTGAACGGCATCATCGGTTTCTGCCAGCTATTGGGGCGCTCGTCCCTGG 901
 I R T P L N G I I G F C Q L L G R S S L 300
 ACACACGCCAACGGGAATGGCTGCAACATGTGCACAAGGCATCTGATAGTCTGTTGTGCG 961
 D T R Q R E W L Q H V H K A S D S L L S 320
 TGATCAACGATATTCTTGATTTTTCCAAGATGGAGGCTGGCAAGCTCGAACTCGAGGCCG 1.021
 L I N D I L D F S K M E A G K L E L E A 340
 TCGATCTCGACATGGTGGCATTGGTGGACGAAGTGTCTGGTCTGCAGGCCCTCAGGCAC 1.081
 V D L D M V A L V D E V L G L Q A P Q A 360
 ACCAGAAGCGGTTGCATTTGCTGGCCTTGGTCTACGACGATGTTCCGGTACAATTGCAAG 1.141
 H Q K R L L L A L V Y D D V P V Q L Q 380
 GTGACCCCTGCGCATCAAGCAAGTGTGACCAATCTGGTTCACAACGCTGTCAAGTTCA 1.201
 G D P L R I K Q V L T N L V H N A V K F 400
 CGGAACAAGGCGAGGTGATCGTACAGATCATGGTGGAAAGAGTGCCAGCAGGGCCTGGTCA 1.261
 T E Q G E V I V R V M V E E C Q Q G L V 420
 CCTTGAAGTTAGTGTACGCGACACCGGCATCGGCCTCGATCCCGAATATCGGGACCGAC 1.321
 T L K V S V S D T G I G L D P E Y R D R 440
 TTTTCAAAGCTTTTCAGCCAAGCCAGTGTACGCGATACTCGGCAATACGGCGGTACCGGCC 1.381
 L F K A F S Q A S V S D T R Q Y G G T 460
 TGGGCTGATGATCTGCCGTAACCTCGTCAACAGATGGGTGGCGAGATTGGTGTGAAAA 1.441
 L G L M I C R Q L V E Q M G G E I G V E 480
 GCCAACCAGGGGAAGGGGACGACTTTTCGCTTCACTCTCTCCCTGTTGGCTCGAAGCTTCG 1.501
 S Q P G K G T T F A F T L S L L A R S F 500
 AGGAACGCCCTCCAGAAGTGTCTTGCAGGACCCACATCGCCTGTACGAACCCACG 1.561
 E E R P P E L S L P G T H I A L Y E P H 520
 CACCGACTCGCATGCACTACTGCACTGCTGCTGAAGCGTTGGGGGGTCCAAGTACATCGC 1.621
 A P T R H A L L H L L K R W G V Q V T S 540
 TCGGACACCATCGATTGTCGATATCGAGCCTCCAGCCTGCTACTGGCCGGCTTGGAAA 1.681
 L G T P S I V D I E P P A L L L A G L E 560
 ACGATGGGCTCTCGAATTCATCGATATCGAATTGGCAGGAATGCCTCGATAACACGGATT 1.741
 N D G C L T S N S S I S N W Q E C L D N T D 580
 GTCCTGCACTTCTGCTGATGCAATGCCAGCTCCCTCGATATCCCGACCTACATCTACCCC 1.801
 C P A I L L V N A S S L D I P D L H L P 600
 ATGGTGGCGAAATTCTGACCCGCCCTTGTACGTCAGCCTTGGCCACGACGCTGGACA 1.861
 H G G E I L T R P L S R Q A L A T T L D 620
 ATCTTCTCCACTCGCCTGCCACAGTCCCAACATGACTTGCAGCACCAGCAGACTCCT 1.921
 N L L H S R S P Q S Q H D L P A P R H S 640
 CGGCAAAGGTGCTGGTGTGATGACACGGCATCGAATCGCTTGTGATCAAGGAAGTGC 1.981
 S A K V L V V D D T A S N R L L I K E L 660
 TCGCCGATCTGGGGCTGACCACATTGTTGGCCACAGTGGCGAGGAAGCCCTGGCACTGG 2.041

```

L A D L G L T T L L A T S G E E A L A L 680
CGCAAAGCGAGTCGGCCGACCTGGTCTTGATGGACATCCGCCTGCCCGGCATGGATGGCG 2.101
A Q S E S A D L V L M D I R L P G M D G 700
TCGCCACTACCCACTCCCTACGCAAACCTGGGCGGTTCCCTGGAGGAGTTGTCCCATCATCG 2.161
V A T T H S L R K L G G S W R S C P I I 720
CCGTCACGGCGCACGCCCTGGAAGAGGAGCGCCATAGACTCCTGCAACATGGCCTGCATG 2.221
A V T A H A L E E E R H R L L Q H G L H 740
ATGTACTCATCAAGCCGCTCGATAGCCAGGCATTGACGCGACTGCTTAGCCAACATCTCA 2.281
D V L I K P L D S Q A L T R L L S Q H L 760
ACATGCCACTGACACCGTCTCCGTACGCGCAGGTGCTGATTCCCTGGAAGGTGGAAGG 2.341
N M P L T P S P S A H G A D S L E G G K 780
AGCAAGAAGGCGAACTGCCGATCGTTGACATGGCCCTTGGACCACGTTGGCTGGCGGCC 2.401
E Q E G E L P I V D M A L G T T L A G G 800
ACGATCGCTGGCGAAGAAACCCTGGACCGTTGCTGGATAGCCTGACGATAGTGATG 2.461
H E S L A E E T L D R L L D S L D D S D 820
CAGCACTGCGTCAAGCATGGCAGGACAACGACGCAGAGGCATTTCTGGATGCCATTACG 2.521
A A L R Q A W Q T D N D A E A F L D A I H 840
CGCTCAATGGAGCCTGTCGCTATTGGGGTACCACAAGTGGCCTGGTGGTGGTGGTGGT 2.581
A L N G A C R Y C G V P Q L A L V A E T 860
TGGAGACACGTCTACGCACACGTGGCCTGGCCAAAGTGGAGCCTTTGCTCATCGAACTCT 2.641
L E T R L R T R G G L A K V E P L L I E L 880
TTGATGCCATGGCAGCCTTGGCGCTGGCGGACAACGAATCAGCCGCCCTCCAGCACAA 2.701
F D A M A R L R A W R T T N Q P P S S T 90
CGAAAGCGCAAGCCAGATCGTCTCATCGTCAACGACAGATGA 2.745
T K A Q A R S S S S L N D R 914

```

Figura 41. Secuencia del gen *gacS*. Los posibles codones de inicio y terminación de la traducción del gen *gacS* se encuentran señalados en negrita. En mayúsculas y de color rojo se muestra la secuencia de 914 aminoácidos de la proteína GacS codificada por el gen *gacS* que se indica en mayúsculas y de color azul. Los nucleótidos entre los que se insertó el transposón mini-Tn5Km2 aparecen sombreados en amarillo.

Para estudiar la organización de la arquitectura modular en la proteína histidina quinasa (HK) GacS se utilizó el programa SMART. En la Figura 42 podemos observar la organización de los dominios que componen la proteína GacS en *H. anticariensis* FP35^T. En primer lugar posee dos dominios transmembrana (TM1 y TM2). A continuación existe un dominio transmisor que se compone de dos partes: la primera se corresponde con el dominio DHP (del inglés *Dimerization and Histidine phosphotransfer*) encargado de la dimerización de la HK y que contiene la histidina conservada que es fosforilada; la segunda parte se corresponde con el dominio CA (del inglés *Catalytic and ATP-binding*) con las secuencias motivo designadas como cajas N, G1, F y G2 y que, como su nombre indica, es capaz de unir la molécula de ATP y transferir el grupo fosfato a la histidina del dominio DHP. En la estructura modular de la proteína GacS se ha detectado también el dominio HAMP (del inglés: *Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-binding proteins and Phosphatases domain*); este dominio se encuentra presente en el 31% de las HKs, y generalmente está situado inmediatamente después de las regiones transmembrana (TM); su función está relacionada con la modulación de la señal entre el dominio sensor extracelular y el dominio receptor citoplasmático (Inouye, 2006). Además, esta proteína HK-GacS lleva fusionada en su extremo C-terminal un dominio REC o dominio receptor y un dominio HPT (del inglés *Histidine-containing Phosphotransfer*); La presencia de estos dominios hacen que la proteína GacS de *H. anticariensis* FP35^T sea una HK híbrida. Para cada uno de los dominios se indican los aminoácidos que los delimitan en la Figura 42.

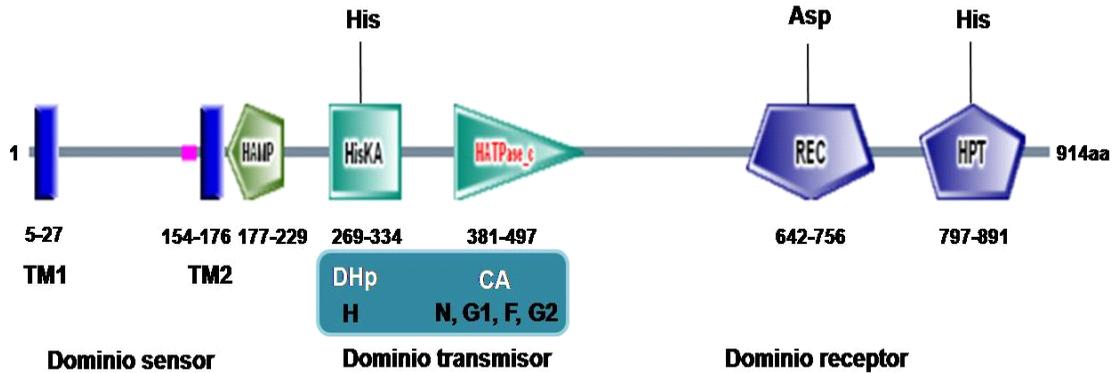


Figura 42. Esquema que muestra la arquitectura modular de la proteína HK-GacS.

2.2. Localización del transposón miniTn5Km2 en el mutante FP35-79X

Para localizar, clonar y secuenciar la región génica adyacente a la inserción del transposón miniTn5Km2 en el mutante FP35-79X se procedió de la misma manera que en el mutante FP35-48XII (apartado 2.1 de este capítulo). Para ello, los fragmentos de restricción *EcoRI* (4kb) y *SalI* (2,5kb) fueron seleccionados mediante Southern blot y clonados en pBlueScript y pGEM[®]-T, respectivamente. Los plásmidos recombinantes obtenidos, pE79X y pS79X, fueron secuenciados mediante cebadores tanto universales como propios, diseñados a partir de la secuencia hallada (Tabla S4). El análisis de la secuencia obtenida (3,4kb) mediante el programa DNASTAR nos permitió localizar tres posibles ORFs completos y dos parciales; cuatro de ellos se transcribían en un mismo sentido mientras que uno de ellos lo hacía en sentido contrario (Figura 43). La secuencia obtenida fue depositada en la bases de datos GenBank/EMBL/DDJB con el número de acceso: EF070731 (véase el apartado Anexos).

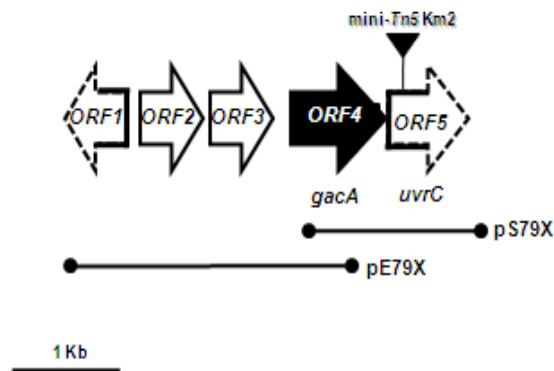


Figura 43. Organización genética de la región cromosómica del mutante FP35-79X que contiene el transposón mini-Tn5Km2. Los ORFs están representados por flechas indicando el sentido de la transcripción. El sitio de inserción del transposón se indica con un triángulo. El ORF correspondiente al gen *gacA* se destaca en negro. Los plásmidos utilizados para la secuenciación, pE79X y pS79X, que contienen los fragmentos de restricción *EcoRI* y *SalI* se indican en el esquema.

En la Tabla 15 se describen los ORFs encontrados en el fragmento cromosómico analizado del mutante FP35-79X.

Tabla 15. Descripción de los ORFs encontrados en el fragmento analizado en el mutante FP35-79X.

ORF	Gen	N° nucleótidos (pb)	N° aminoácidos	Función probable
1 parcial	<i>gntR</i>	1-494	165	Regulador transcripcional de la familia GntR
2	<i>chrA</i>	699-1.253	184	Subunidad A de un transportador de cromosoma
3	<i>chrB</i>	1.250-1.786	178	Subunidad B de un transportador de cromosoma
4	<i>gacA</i>	2.205-2.859	217	Regulador de respuesta
5 parcial	<i>uvrC</i>	2.866-3.400	178	Subunidad C de una excinucleasa ABC

En el mutante FP35-79X el transposón se insertó en el gen *uvrC* (ORF5) (Figura 43), que se corresponde con la subunidad C de la excinucleasa ABC, que participa en la reparación de los daños en el ADN producidos por luz UV. El fenotipo asociado a este mutante fue una disminución en la producción de moléculas señal (Figura 44). Curiosamente el ORF4 (gen regulador de respuesta, *gacA*), localizado corriente arriba del gen *uvrC*, regula positivamente la producción de AHLs en muchos organismos (Chancey y col., 1999; Kitten y col., 1998; Pessi y Hass, 2001). Teniendo en cuenta todos estos datos pensamos que el fenotipo observado en el mutante FP35-79X podría ser debido a un efecto polar del transposón sobre el gen *gacA*. Para verificar esta hipótesis, se realizó mutagénesis dirigida sobre el gen *uvrC* y se analizó la producción de AHLs en este mutante utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

Para inactivar el gen *uvrC* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de dicho gen empleando los cebadores *uvrC-EcoRI-F* y *uvrC-XbaI-R* (Tabla S4). El producto de PCR fue digerido con *EcoRI* y *XbaI* y posteriormente clonado en el vector pVIK112, digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido recombinante obtenido, pVIKUvrC (Tabla S3), fue transformado en la cepa S17 λ pir de *E. coli* y transferido mediante conjugación biparental a una cepa mutante espontánea resistente a la rifampicina de *H. anticariensis* (FP35-R) en la que quedó integrado en su genoma. Los transconjugantes fueron seleccionados en medio SWYE al 2% (p/v) de sales, adicionado con rifampicina y kanamicina. El mutante obtenido se denominó FP35*uvrC* (Tabla S3).

En la Figura 44 se puede observar que el mutante FP35 uvrC produjo mayor cantidad de AHLs que el mutante FP35-79X (mini-Tn5Km2:: uvrC) y una cantidad próxima a la de la cepa silvestre FP35 T . La producción de AHLs se determinó tanto por ensayo en placa como por medida de la actividad β -galactosidasa utilizando *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como cepa bioindicadora. Por tanto este resultado sugirió que el fenotipo deficiente en AHLs del mutante FP35-79X podía ser debido a un efecto polar de la inserción del transposón sobre el gen *gacA*.

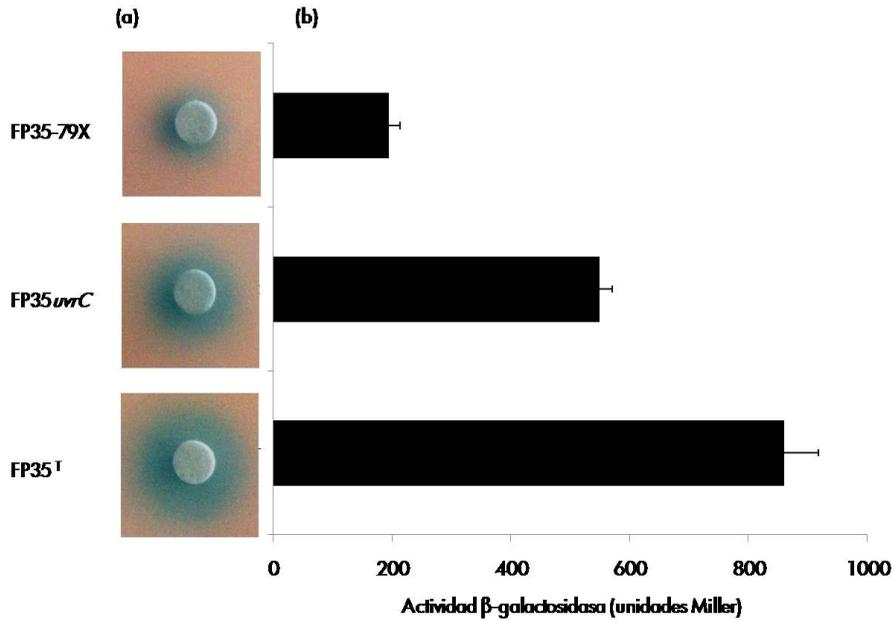


Figura 44. Producción de AHLs en las cepas mutantes de *H. anticariensis*, FP35 uvrC y FP35-79X. Los extractos de AHLs de los cultivos fueron analizados mediante ensayo en placa (a) y cuantificados mediante la medida de la actividad β -galactosidasa (b) empleando la cepa indicadora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

En la Figura 45 se muestra la secuencia del ORF4, al que denominamos *gacA*, que consta de 654pb. El gen *gacA* codifica una proteína de 217aa, a la que hemos denominado GacA (Tabla 15), con una masa molecular estimada de 24kDa. La comparación de esta proteína con las depositadas en las bases de datos mediante el programa BLAST mostró un 80% de identidad con el regulador transcripcional de dos componentes de la familia LuxR de *Chromohalobacter salexigens* y con reguladores de respuesta GacA de especies de *Halomonas* (61%-73%) y *Pseudomonas* (57%-60%).

```

TTGATCAAGGTCCTTGTGCGAGATGACCATCACTTGGTACGCACCAGTATCGCCCGTATG 60
L I K V L V A D D H H L V R T S I A R M 20
CTGGATGCCGAAGAAGGCTTCGCAGTAGTCGGCGAGGCTGCCGATGGAGAAGAAGCCATT 120
L D A E E G F A V V G E A A D G E E A I 40
GCCTTGCTCGCAGGCATCGCCCGATATCGTGTGCTGATGGACATTTCGCATGCCTGGTGTG 180
A L A R R H R P D I V L M D I R M P G V 60
    
```

```

AGCGGACTCGAGGCGACCCGTAAGATCACCAAGGGTATGTCCGATATCAAGGTCGTGGTG 240
S G L E A T R K I T K G M S D I K V V V 80
TTAACGGCATTCTCGAGGAAAACCTTTGCCGAACGCTTACTCAATGCCGGTGCCAGCGGC 300
L T A F L E E N F A E R L L N A G A S G 100
TTCATCAGCAAGGGCACCGAACTTGGTGATATGGTGGCCGCTCTGCGAGCCGTTTTCTCC 360
F I S K G T E L G D M V A A L R A V F S 120
GGACAGCGTTATATCAGTCCGGAATCGCCAACGGGTGGTTCTGGCCAAGGTGGATGCC 420
G Q R Y I S P E I A Q R V V L A K V D A 140
CAGGACAACCCCTTCGACACTCTTTCCGATCGGGAGCTGCAAGTGGCGATGATGATCGTC 480
Q D N P F D T L S H R E L Q V A M M I V 160
AACTGCCAAACGGTTAGCGACATCTCTGACCGCCTGTTTCTGAGCCCAAAGACCGTCAAT 540
N C Q T V S D I S D R L F L S P K T V N 180
ACTTATCGCTACCGTATTTTTGAAAAGCTCGGCGTACATTCTGACGTGCAATTGACCCAT 600
T Y R Y R I F E K L G V H S D V E L T H 200
TTGGGACTGCGCCATGGATTGGTAGACGGCTATCGACGCGAGGAAGAAGCCTGATCAACC 654
L G L R H G L V D G Y R R E E E A 217
ATGAGTTTGACGCCAAGCAATTCTCAAGACCGAAGTGCAGCACCCGGCGTCTATCGCATG 60
CTCGACGACCGAGGCGACACGCCTTATATCGGCAAGGCCAAGCGCCTCAAATCCCGTTG 120
GCTAGCTATTTCCGTTGGCGCTCTCAATACCAAGACCCAGGCCTTGGTGGCACGATCGCC 180
GATATCGAAGTCACGCTAACCCGCAGCGAGACAGAAGCCCTGTTGATGGAACAGGCGCTG 240
ATCAAGGAGCTCCGGCCGCTTACAACATTTTGTGCGTGATGACAAATCCTACCCGTTT 300
GTATTTCGTAGCGATCGTCATCCTTATCCAGCACTAGAGCATAAGCGAGCGCGCAATCGG 360
CGCAGCGACGGTCGCTACCTGGGCCCTACCCAGCAGCGGTGCCGTGCGCGAAACCCCTG 420
TCACTGATGCAAAAGATCTTTTCGATCCGCAACTGCGAGGACAGTGTCTTCGGAAATCGC 480
ACCCGGCCATGCCTGCNTTTCAAATCGAGGGAGANCAAGCGCACCCCTGCGTGCAG 535
    
```

Figura 45. Secuencia completa del gen *gacA* y secuencia parcial correspondiente al gen *uvrC*. Los posibles codones de inicio y terminación de la traducción de los genes *gacA* y *uvrC* se encuentran señalados en negrita. En mayúsculas y de color rojo se muestra la secuencia de 217 aminoácidos de la proteína GacA codificada por el gen *gacA* que se indica en mayúsculas y de color azul. La secuencia parcial del gen *uvrC* se muestra en mayúsculas y de color verde. Los nucleótidos entre los que se insertó el transposón mini-Tn5Km2 aparecen sombreados en amarillo.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína GacA de *H. anticariensis* mediante el programa SMART, mostró la presencia de dos dominios conservados encontrados en proteínas reguladoras de respuesta tipo GacA de diferentes bacterias (Figura 46). Un dominio receptor N-terminal que incluye el aspartato que acepta el fosfato de su HK pareja y un dominio efector variable C-terminal, que suele estar implicado en la unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice (HTH) y que activa o reprime la transcripción de uno o varios genes diana. Para cada uno de los dominios se indican los aminoácidos que los delimitan (Figura 46).

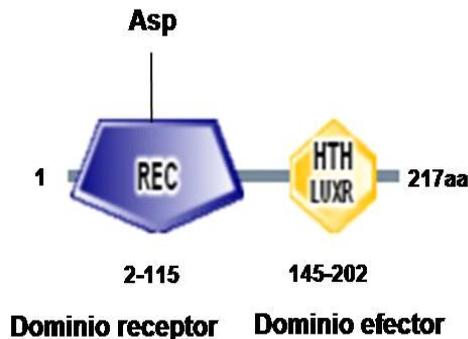


Figura 46. Esquema que muestra la arquitectura modular de la proteína RR-GacA.

2.3. Análisis filogenético del sistema *GacS/GacA* de *H. anticariensis* FP35^T

Para determinar la relación filogenética existente entre las proteínas del sistema regulador de dos componentes de *H. anticariensis* FP35^T y otras proteínas homólogas cuyas secuencias fueron recuperadas de las bases de datos, éstas se alinearon usando el algoritmo ClustalW incluido en el programa MEGA, para obtener a continuación su relación evolutiva mediante la utilización del algoritmo de neighbour-joining.

Como se puede observar en la Figura 47, los dos árboles filogenéticos resultantes mostraron la misma topología, y las proteínas *GacS* y *GacA* se situaron dentro del cluster de *Halomonas*, claramente diferenciadas de las proteínas pertenecientes a *Pseudomonas* y a las enterobacterias.

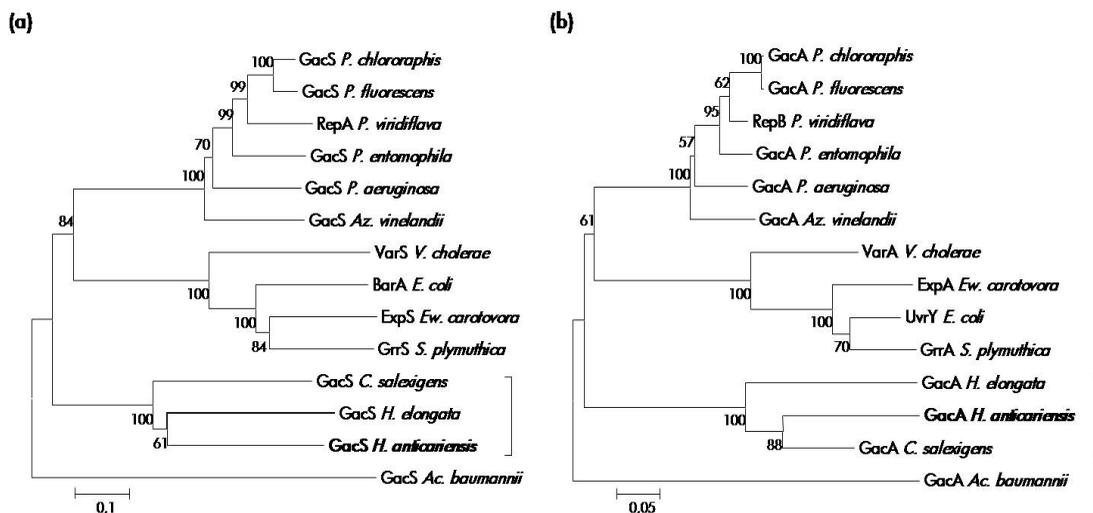


Figura 47. Árboles filogenéticos resultantes del alineamiento de las secuencias de las proteínas HH-*GacS* (a) y RR-*GacA* (b). Abreviaturas para los nombres de los géneros bacterianos: *Ac*, *Acinetobacter*; *Az*, *Azotobacter*; *P*, *Pseudomonas*; *C*, *Chromohalobacter*; *E*, *Escherichia*; *Ew*, *Erwinia*; *H*, *Halomonas*; *S*, *Serratia*; *V*, *Vibrio*.

3. Análisis de la regulación de la producción de AHLs por el sistema *GacS/GacA*.

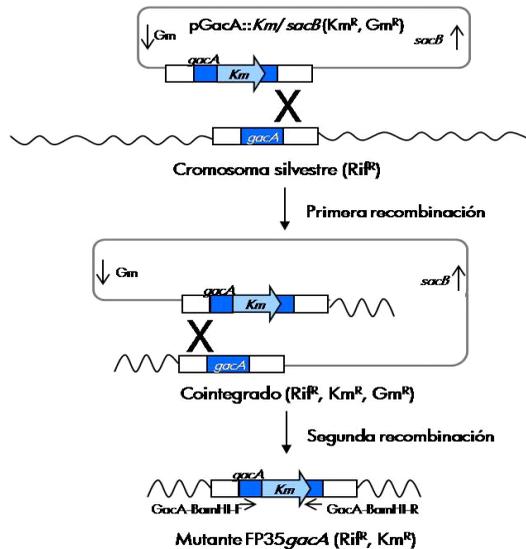
3.1. Obtención de mutantes afectados en los genes *gacS* y *gacA* y complementación

Para determinar el papel de los genes *gacS/gacA* del sistema regulador de dos componentes en la acumulación de AHLs, procedimos a inactivar ambos genes en la cepa silvestre FP35^T. Con el fin de interrumpir el gen *gacS*, amplificamos un fragmento interno de 458pb mediante PCR empleando los cebadores *gacSsub-EcoRI* y *gacSsub-XbaI-R* (Tabla S4). El producto de PCR fue purificado, digerido y clonado en el vector pVIK112. El plásmido resultante, pVIKGacS (Tabla S3), fue transformado en la cepa de *E. coli* S17 λ pir y posteriormente transferido mediante conjugación biparental a la cepa resistente a rifampicina, FP35-R de *H. anticariensis*, donde se integró en su genoma. Los transconjugantes fueron seleccionados en medio SWYE al 2% (p/v) de

sales, adicionado con rifampicina y kanamicina. El mutante obtenido se denominó FP35*gacS* (Tabla S3).

Por otro lado, la inactivación del gen *gacA* se llevó a cabo mediante la incorporación de un casete de resistencia a kanamicina por doble recombinación homóloga. Para ello, se clonó en el plásmido pGEM[®]-T un producto de PCR de 1,7kb obtenido a partir del ADN de la cepa FP35^T, que contenía el gen *gacA*. El plásmido recombinante se denominó pGacA (Tabla S3). Mediante PCR se amplificó el gen de resistencia a kanamicina empleando los cebadores Km-*HpaI*-F y Km-*HpaI*-R (Tabla S4). El producto de PCR fue digerido con el enzima de restricción *HpaI* e insertado en el único sitio de corte del fragmento *gacA* obteniéndose el plásmido recombinante pGacA::Km (Tabla S3). El gen *gacA*, bloqueado en su lectura, se clonó en el vector suicida pJQ200-SK dando lugar al plásmido recombinante pGacA::Km/*sacB* (Tabla S3). Este plásmido se transfirió, mediante conjugación biparental, desde *E. coli* S17-1 λ *pir* hasta una cepa espontánea resistente a rifampicina, FP35-R de *H. anticariensis*, en la que el casete de Km se insertó en el gen *gacA* por recombinación homóloga doble. Los mutantes se seleccionaron en el medio SWYE al 2% (p/v) de sales adicionado de rifampicina, kanamicina, y sacarosa al 5% (p/v). En la Figura 48a se muestra un esquema del proceso de doble recombinación homóloga utilizado para la obtención del mutante *gacA*, al que denominamos FP35*gacA* (Tabla S3). Para comprobar que el gen *gacA* estaba interrumpido por el casete, se amplificó por PCR la región mutada a partir del ADN genómico del mutante (Figura 48b).

(a)



(b)

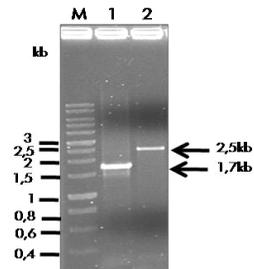


Figura 48. (a) Construcción del mutante FP35*gacA* de *H. anticariensis* por reemplazamiento alélico. (b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) correspondiente a la comprobación de la inserción del casete km en el mutante FP35*gacA*. Carril M, Marcador de pesos moleculares; carril 1, producto de PCR correspondiente al gen *gacA* obtenido a partir del ADN de la cepa silvestre FP35^T; carril 2, producto de PCR obtenido a partir del ADN del mutante FP35*gacA* donde se observa una única banda de 2,5kb correspondiente al alelo mutado *gacA::Km*.

Una vez obtenidos los mutantes *FP35gacS* y *FP35gacA*, se extrajeron las moléculas señal a partir de los cultivos de los mismos y se cuantificaron mediante ensayos β -galactosidasa utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). La cepa silvestre *FP35^T* de *H. anticariensis* se utilizó como control. Como se puede observar en la Figura 49, los niveles de producción de AHLs disminuyeron drásticamente en los mutantes *FP35gacS* y *FP35gacA* en comparación con la cepa silvestre *FP35^T*. Estos resultados, por tanto, sugirieron que el sistema GacS/GacA controla la producción de AHLs en *H. anticariensis* *FP35^T*.

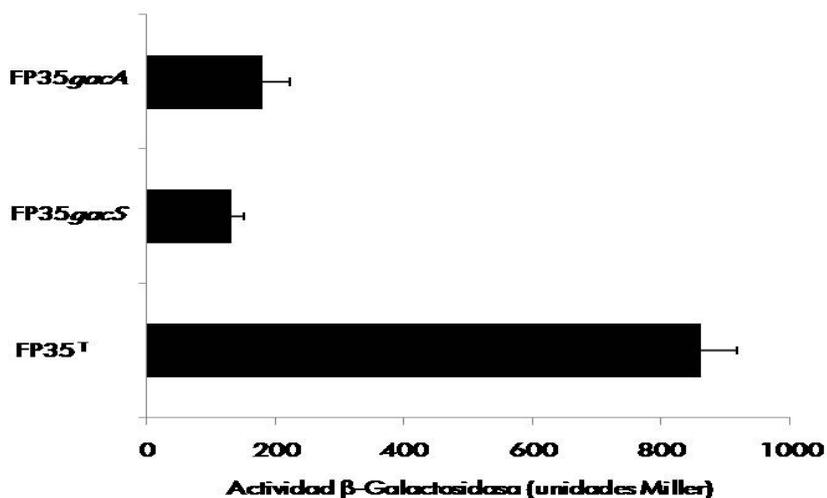


Figura 49. Efecto del sistema regulador de dos componentes GacS/GacA sobre la producción de AHLs en *H. anticariensis* *FP35^T*. Cuantificación de los niveles de AHLs en *H. anticariensis* *FP35^T* y los mutantes *FP35gacS* y *FP35gacA* mediante ensayos de la actividad β -galactosidasa empleando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

Con el fin de comprobar que la disminución en la producción de AHLs era debido a la inactivación puntual de los genes *gacS* y *gacA*, procedimos a realizar la complementación de los mismos para determinar si se recuperaba la cantidad inicial de autoinductores. Para la complementación de los mutantes *FP35gacS* y *FP35gacA* se utilizó el vector de expresión pJN105. Para ello, se amplificaron los genes *gacS* y *gacA* y sus regiones promotoras mediante PCR empleando los cebadores GacS-C-*Bam*HI-F y GacS-C-*Xba*I-R, GacA-C-*Bam*HI-F y GacA-C-*Xba*I-R (Tabla S4), respectivamente. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, y a continuación fueron clonados en el plásmido pJN105 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Los plásmidos recombinantes creados, pJN-GacS y pJN-GacA (Tabla S3), fueron transferidos desde *E. coli* S17 λ pir a las cepas mutantes *FP35gacS* y *FP35gacA* resistentes a kanamicina y rifampicina. Las cepas complementadas se seleccionaron en medio SWYE al 2% (p/v) de sales adicionado de kanamicina y gentamicina, confirmando la presencia del plásmido con posterioridad. Finalmente analizamos la producción de AHLs mediante un ensayo en placa utilizando la cepa bioindicadora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

En la Figura 50 se muestra el resultado de la complementación *in trans* de los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*. En la cepa FP35*gacA* (pJN-GacA) la producción de AHLs se restauró totalmente y además ésta produjo más cantidad de AHLs que la cepa silvestre. Sin embargo en la cepa FP35*gacS* (pJN-GacS) la producción de AHLs no se restauró por razones que desconocemos.

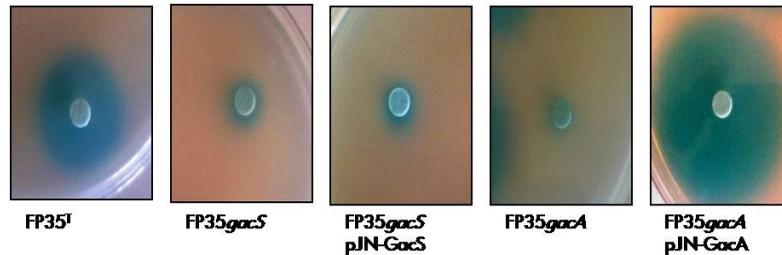


Figura 50. Producción de AHLs en la cepa silvestre FP35^T, los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y los complementados FP35*gacS* (pJN-GacS) y FP35*gacA* (pJN-GacA) de *H. anticariensis*. Los extractos de AHLs fueron analizados en un ensayo en placa utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio AB/X-gal.

3.2. Regulación de la expresión de los genes *hanR/hanI* mediante el sistema *gacS/gacA*

Para confirmar el efecto regulador positivo del sistema de dos componentes GacS/GacA sobre la producción de AHLs en *H. anticariensis*, llevamos a cabo experiencias de RT-PCR para determinar el nivel de expresión de los genes QS *hanR/hanI*. A partir de tres cultivos bacterianos independientes, correspondientes a las cepas mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y a la cepa silvestre FP35^T, en medio mínimo MM, se extrajo el ARN según la metodología descrita en Material y Métodos (apartado 1.2.3). Se realizaron diferentes reacciones de RT-PCR, a partir de concentraciones de ARN que oscilaron entre 0,05-5µg, empleándose los cebadores RT-hanR-F y RT-hanR-R para estudiar la expresión del gen *hanR* y los cebadores RT-hanI-F y RT-hanI-R para analizar la expresión del gen *hanI*. Como control se utilizó el gen ribosomal 16S. La secuencia de los cebadores utilizados se describe en la Tabla S4.

En la Figura 51 se puede apreciar que la expresión de los genes *hanR* y *hanI* se vió afectada de forma drástica en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*, lo que confirmó el fenotipo deficiente en la producción de AHLs observado en los mutantes Gac (Figura 49).

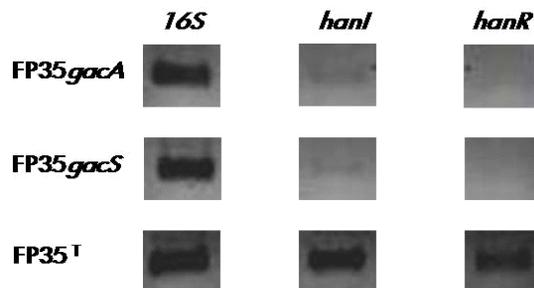


Figura 51. Expresión de los genes *hanR/hanI* mediante ensayos RT-PCR en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y en la cepa silvestre FP35^T. El nivel de expresión de los genes *hanR* y *hanI* en la cepa silvestre se ha utilizado como referencia mientras que el nivel de expresión del gen ribosomal 16S se ha utilizado como control.

DISCUSIÓN

En los experimentos encaminados a la búsqueda de los genes que regulaban el sistema QS, mediante el procedimiento de mutagenésis con el transposón miniTn5Km2, se seleccionaron los mutantes deficientes en la producción de AHLs FP35-48XII y FP35-79X que nos permitieron localizar e identificar el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA en *H. anticariensis* FP35^T.

El análisis de los mutantes FP35-48XII (*gacS*::miniTn5Km2) y FP35-79X (*uvrC*::miniTn5Km2) mostró que contenían una única inserción en ORFs diferentes. *H. anticariensis* FP35-48XII tenía una mutación en un gen homólogo al gen *gacS* que codifica una histidina quinasa (HK). Por su parte, en *H. anticariensis* FP35-79X el gen afectado resultó ser homólogo al gen *uvrC* que codifica la proteína UvrC que forma parte del complejo UvrABC que interviene en la reparación de nucleótidos dañados por la luz UV (Tang y col., 2001). Esta función no se correspondía con el fenotipo deficiente en AHLs observado en el mutante FP35-79X. Sin embargo el ORF situado corriente arriba del gen *uvrC* era homólogo del gen *gacA* que codifica un regulador de respuesta (RR) y ha sido descrito como un elemento regulador en el control de la producción de AHLs. La organización genética *gacA-uvrC* era similar a la descrita en otros microorganismos y parecía estar conservada (Heeb y Hass, 2001). En base a estos datos, una de las hipótesis que nos planteamos fue la existencia de un efecto polar del transposón corriente arriba del gen *uvrC*. La construcción de un nuevo mutante en el gen *uvrC* mostró una producción de AHLs casi similar a la cepa silvestre FP35^T mientras que un mutante en el gen *gacA* producía AHLs en cantidades basales. Estos resultados, por tanto, confirmaron nuestra hipótesis y por ello podemos asegurar que el sistema de dos componentes GacS/GacA regula la producción de AHLs en *H. anticariensis* FP35^T.

El estudio de la organización de las proteínas HK-GacS y RR-GacA (Figuras 42 y 46) mediante el programa SMART indicó la presencia de un dominio transmisor en la proteína GacS y un dominio receptor en la proteína GacA que resultaron estar conservados al igual que en otros sistemas reguladores de dos componentes (Heeb y Haas, 2001). Además, dicho resultado apoyó la idea de una organización modular de los dominios similar a la de la mayoría de los sistemas reguladores dos componentes (Wolanin y col., 2002). Debido a la presencia de los dominios REC y HPI la proteína HK-GacS se considera una HK híbrida y hace que el sistema regulador de dos componentes presente en *H. anticariensis* FP35^T sea más complejo. En este caso, la transferencia del grupo fosfato desde el dominio REC de la HK híbrida a su correspondiente RR final incluye múltiples pasos de transferencia entre residuos de His y Asp, requiriendo la proteína intermedia HTp. Este tipo de sistemas se encuentran en menor medida en organismos procariotas

que en eucariotas. Sólo un tercio de las proteínas HKs de bacterias y algunas de arqueas son híbridas con HPT fusionados (Zhang y Shi, 2005).

El análisis filogenético (Figura 47) mostró que las nuevas secuencias de proteínas GacS y GacA de *H. anticariensis* se agrupaban junto a proteínas relacionadas de otras bacterias halófilas como *Chromohalobacter salexigens* y *Halomonas elongata* en un clúster separado de *Pseudomonas* y las enterobacterias.

El sistema regulador de dos componentes regula numerosas funciones celulares que se expresan en la fase estacionaria de crecimiento a través de la regulación de sistemas quorum sensing o el factor alternativo rpoS. La interconexión del sistema GacS/GacA con estos dos sistemas se ha puesto de manifiesto en numerosos microorganismos, tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Reimmann y col., 1997), *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Kinscherf y Willis, 1999; Kitten y col., 1998), *P. aureofaciens* (Chancey y col., 1999), *P. putida* (Bertani y Venturi, 2004) y *P. syringae* pv. *tabaci* (Marutani y col., 2008). En estas bacterias disminuye la capacidad de producción de AHLs al inactivarse los genes *gacS* y *gacA*. Un efecto similar se observó en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* en los que además hemos demostrado que la expresión de los genes QS *hanR* y *hanI* se afecta de una forma drástica. Este dato confirma a nivel genético el efecto fenotípico observado.

Los resultados obtenidos en el capítulo I mostraron que el sistema quorum sensing HanR/HanI no estaba autorregulado a diferencia de los sistemas clásicos, lo que sugería que debería estar controlado por otro sistema global de regulación dependiente de la densidad celular. Cabe destacar que los datos obtenidos en este capítulo II nos indican que en *H. anticariensis* FP35^T, el sistema QS HanR/HanI está controlado de forma positiva por el sistema de regulación global de dos componentes GacS/GacA. Sin embargo, no sabemos si el efecto que ejerce este sistema es directo o indirecto. Es sabido que los sistemas reguladores de dos componentes actúan mayoritariamente a nivel transcripcional a través del factor σ^{38} (RpoS) o a través de ARNs pequeños no codificantes, entre otros (Galperin, 2006). El factor alternativo sigma σ^{38} es un regulador central en la respuesta de la bacteria al estrés y de la entrada en fase estacionaria de crecimiento. Esto ocurre en *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, en la que el regulador de respuesta GacA controla el factor RpoS (Chatterjee y col., 2003). Recientemente, se ha descrito la activación de la transcripción de pequeños ARNs no codificantes a través del sistema regulador de dos componentes. Estos ARNs no codificantes intervienen regulando los sistemas QS. En *E. carotovora* subsp. *carotovora* y en *P. fluorescens* CHAO, por ejemplo, el sistema QS está regulado a nivel postranscripcional mediante los sistemas RsmA/RsmB y RsmA/RsmZ, respectivamente (Ciu y col., 2001; Heeb y col., 2002).

En definitiva, la integración del sistema QS HanR/HanI en el seno de un sistema de regulación global de *H. anticariensis* FP35^T como es el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA hace que este sistema sea más complejo de lo que pensamos en un principio y a su vez permite a la bacteria tener una plasticidad para combinar la información sobre la densidad celular y responder de forma apropiada a las condiciones fluctuantes del medioambiente.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S3. Listado de cepas bacterianas y plásmidos construidos en este trabajo.

Cepas/plásmidos	Genotipo/descripción
Cepas de <i>Halomonas anticariensis</i>	
FP35-R	Mutante rifampicina-resistente espontáneo de FP35 ^T , Rif ^R
FP35-48XII	FP35-R que contiene <i>gacS</i> ::mini-Tn5Km2, Rif ^R , Km ^R
FP35-79X	FP35-R que contiene <i>uvrC</i> ::mini-Tn5Km2, Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>gacS</i>	FP35-R que contiene <i>gacS</i> :: <i>lacZ</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>gacA</i>	FP35-R que contiene <i>gacA</i> :: <i>Km</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>uvrC</i>	FP35-R que contiene <i>uvrC</i> :: <i>lacZ</i> , Rif ^R , Km ^R
FP35 <i>gacS</i> (pJN-GacS)	FP35-R que contiene <i>gacS</i> :: <i>Km</i> and pJN-GacS, Rif ^R , Km ^R , Gm ^R
FP35 <i>gacA</i> (pJN-GacA)	FP35-R que contiene <i>gacA</i> :: <i>lacZ</i> and pJN-GacA, Rif ^R , Km ^R , Gm ^R
Plásmidos	
pS48XII	pUC19 que contiene un fragmento <i>Sal</i> de 4,4kb que lleva insertado el transposón miniTn5Km2, Ap ^R , Km ^R
pPFP35	pGEM-T [®] que contiene un fragmento de producto de PCR inversa de 1,3kb amplificado a partir de un fragmento de 2,2kb del genoma de la cepa FP35 ^T , Ap ^R
pEFP35	pGEM-T [®] que contiene un fragmento de producto de PCR inversa de 1,7kb amplificado a partir de un fragmento de 2,2kb del genoma de la cepa FP35 ^T , Ap ^R
pE79X	pBluescript SK(+) que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 4kb que lleva insertado el transposón miniTn5Km2, Ap ^R , Km ^R
pS79X	pGEM-T [®] que contiene un fragmento <i>Sal</i> de 2,5 kb que lleva insertado el transposón miniTn5Km2, Ap ^R , Km ^R
pVIKGacS	pVIK112 que contiene un fragmento interno del gen <i>gacS</i> , Km ^R
pVIKUvrC	pVIK112 que contiene un fragmento interno del gen <i>uvrC</i> , Km ^R
pGacA	pGEM-T [®] que contiene el gen <i>gacA</i> y regiones aledañas
pGacA::Km	pGacA que contiene <i>gacA</i> :: <i>Km</i>
pGacA::Km/sacB	pJQ200SK que contiene <i>gacA</i> :: <i>Km</i>
pJN-GacS	pJN105 que contiene el gen <i>gacS</i> intacto, Gm ^R
pJN-GacA	pJN105 que contiene el gen <i>gacA</i> intacto, Gm ^R

Table S4. Secuencia de los cebadores sintéticos.

Cebadores y función	Secuencia (5'-3')*
Localización de la inserción mini-Tn5	
48XII -Tn5-F	GGGAATATCGAGGGAGCTGGC
48XII -Tn5-R	AAGTGCTCGGTCTGCAGGCC
79X-Tn5-F	GACATCTCTGACCGCTG
79X-Tn5-R	CCAAGCGGGATTTGAGGC
Secuenciación del plásmido pS48XII	
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC
M13-F	GTTTTCCAGTCACGAC
S48XII -0	CAGCACCATGCGATAGCC
S48XII -1	CGGACGCTACTACATCTTGGC
S48XII -2	AAGTGCTCGGTCTGCAGGCC
PCR inversa 48XII-A	
S-48XII-A-F	GGGAATATCGAGGGAGCTGGC
S-48XII-A-R	GCATCTGCTGAAGCGTTGGGG
IPCR-48XII-A-F	GCCGGGCAACGACAGTTCTGGAGGGCGTT
IPCR-48XII-A-R	TGTCCTGCCATTCTGCTGGTCAATGCCA
Secuenciación del plásmido pPFP35	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
PCR inversa 48XII-B	
S-48XII-B-F	CGATCGGCAGTTCGCCTT
S-48XII-B-R	GTCCCATCATCGCCGTCA
IPCR-48XII-B-F	CATGCCACTGACACCGTCTCCGTCAGCG
IPCR-48XII-B-R	AGGCTTGACGTGACAAGGGGCGGGTCAG
Secuenciación del plásmido pEFP35	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
EFP35-B	ATGGCTTGAGCGACTGGCGG
Secuenciación del plásmido pE79X	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pUT-O	GCCGCACTTGTTATAAG
E79X-A	CTTCTCGGCATCCAGCATAACG
E79X-B	CGCTGTGATCATACCGATG
Secuenciación del plásmido pS79X	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
PCR fragmento interno <i>uvrC</i>	
<i>uvrC</i> - <i>EcoRI</i> -F	CGGAATCCGGCGTCTATCGCATGCTCG
<i>uvrC</i> - <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGAGGGGCCAGGTAGCGACCGT
PCR fragmento interno <i>gacS</i>	
<i>gacS</i> sub- <i>EcoRI</i> -F	GCGGAATTCGGAAAAATCAAGAATATCG
<i>gacS</i> sub- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGAGCCACCTGACTCGCCCCCTA
PCR <i>gacA</i> y regiones alrededor	
<i>GacA</i> - <i>BamHI</i> -F	GCGGGATCCCGGTGATCGCGATGATGA
<i>GacA</i> - <i>BamHI</i> -R	CGGGATCCCGGTGCGATTTCGAAGAC
PCR casete Km	
Km- <i>HpaI</i> -F	GCGGTTAACATGATTGAACAAGATGGA
Km- <i>HpaI</i> -R	GCGGTTAACTCAGAAGAAGTTCGTC
PCR gen <i>gacS</i>	
<i>GacS</i> -C- <i>BamHI</i> -F	GCGGGATCCAGCCTGTGCGCATTATATC
<i>GacS</i> -C- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGAGCCAACCATCGTTAATGCTAT
PCR gen <i>gacA</i>	
<i>GacA</i> -C- <i>BamHI</i> -F	GCGGGATCCCGGTGATCGCGATGATGA
<i>GacA</i> -C- <i>XbaI</i> -R	GCGTCTAGATCAGGCTTCTCCTCGCTC

Retrotranscripción-PCR amplicon *16S*

RT-16SFP35-F

ACAGAAGAAGCACCGGCTAA

RT-16SFP35-R

CTCCTGCACTCTAGCCCAAC

Retrotranscripción-PCR amplicon *hanR*

RT-hanR-F

TGAATGGGAGGGCTTGTATC

RT-hanR-R

CTGAACAAAGCCCGAAGTCT

Retrotranscripción-PCR amplicon *hanI*

RT-hanI-F

GTAGGAAATGGGCAGGTTTG

RT-hanI-R

AAGCCATCGACAATCACCTC

*Los sitios de restricción incorporados a los cebadores se encuentran subrayados.

Capítulo III.

Estudio del papel de la comunicación intercelular en *Halomonas anticariensis* FP35^T

RESUMEN

En este capítulo se describe el análisis fenotípico de los mutantes afectados en los sistemas de comunicación intercelular en *H. anticariensis* FP35^T. En los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* se han visto afectados la producción del exopolisacárido (EPS), la movilidad y la formación del biofilm, lo que indica que estos fenotipos están controlados por el sistema regulador de dos componentes (TCS) GacS/GacA. Sin embargo dichos fenotipos no parecen estar controlados a través del sistema quorum sensing (QS) HanR/HanI ya que en los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* no se observaron diferencias en estos fenotipos. Por otro lado, los resultados del análisis mediante el uso de la tecnología del microarray fenotípico del mutante FP35*hanI* sugirieron que el sistema QS juega un papel en el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno y fosfato en *H. anticariensis* FP35^T y también en la resistencia y sensibilidad a ciertos antibióticos, aniones y cationes tóxicos y otros compuestos inhibidores, posiblemente mediante la regulación de los sistemas de transporte. Finalmente, el análisis de la inducción de los genes QS mediante la construcción de una librería de promotores en el mutante FP35*hanI* mostró que 587 candidatos de 4.180 clones analizados presentaban una diferencia de expresión igual o mayor a 1,5 veces en presencia de moléculas *N*-acil homoserín lactonas (AHLs). Todos estos datos indican el papel de la comunicación intercelular en *H. anticariensis* FP35^T para percibir y responder a las condiciones fluctuantes en su ambiente.

ABSTRACT

In this chapter we describe the results of a study into the phenotypic changes in strains of *H. anticariensis* FP35^T with mutations to their intercellular communication mechanisms, in which we observed the influence of the two-component system GacS/GacA upon exopolysaccharide production, motility and biofilm formation. It would seem that this regulation does not take place via the quorum-sensing (QS) HanR/HanI system since there were no apparent differences in these phenotypes between the mutants and the wild-type strain of *H. anticariensis* FP35^T. Microarray phenotype analysis indicated that QS seems to play a role in the metabolism of carbohydrates, nitrogen and phosphate, and also to resistance or susceptibility to some antibiotics, toxic anions and cations and other inhibitor compounds, presumably by altering the expression of genes involved in transport systems. Finally, an analysis of QS target genes made by screening a random promoter library of *H. anticariensis* showed that 587 of the 4,180 clones screened produced 50% more luminescence activity when the medium contained *N*-acyl homoserine lactone (AHLs). All these data suggest that intercellular communication appears to play a key role in co-ordinating gene expression and behaviour in *H. anticariensis* FP35^T in response to environmental conditions.

Las bacterias, como todos los seres vivos, se enfrentan a cambios notables en las condiciones de vida existentes en el entorno que les rodea. Para ello disponen de numerosos sistemas de señalización que les permiten generar diversas respuestas de adaptación frente a estímulos ambientales específicos. La abundancia de estos sistemas de señalización en procariotas ha sido subestimada durante mucho tiempo debido a que las bacterias disponen de un conjunto de componentes de señalización diferente del empleado por los eucariotas (Gao et al., 2007). Entre ellos, el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla una amplia variedad de funciones celulares siendo tal vez el mecanismo principal de la transducción de señal en las bacterias (Heeb y Haas, 2001). En *Halomonas anticariensis* FP35^T, tal y como se puso de manifiesto en el capítulo II, el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla la producción de moléculas señal AHLs mediadoras del sistema QS.

En este capítulo se pretende estudiar otros fenotipos que podrían estar regulados tanto por el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA como por el sistema QS HanR/HanI en *H. anticariensis* FP35^T y su posible papel en la adaptación al medioambiente.

RESULTADOS

1. Estudio de los fenotipos controlados por el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA

Para determinar los posibles fenotipos controlados por el sistema global regulador de dos componentes GacS/GacA, se analizaron varios fenotipos en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y sus complementados *in trans* FP35*gacS* (pJN-GacS) y FP35*gacA* (pJN-GacA) y se compararon con la cepa silvestre *H. anticariensis* FP35^T. Todos los mutantes fueron construidos en el capítulo II.

1.1. Tolerancia al estrés osmótico de los mutantes *gacS/gacA*

Para determinar la implicación de los genes *gacS* y *gacA* en el comportamiento frente a la sal de *H. anticariensis*, se procedió a comparar el crecimiento de los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* con la cepa silvestre FP35^T en medio MY a diferentes concentraciones de sales (0,5; 3; 5; 7,5, 12,5 y 15% (p/v). Como se puede apreciar en la Figura 52, no se observó ninguna diferencia de crecimiento entre los mutantes *gac* y la cepa silvestre.

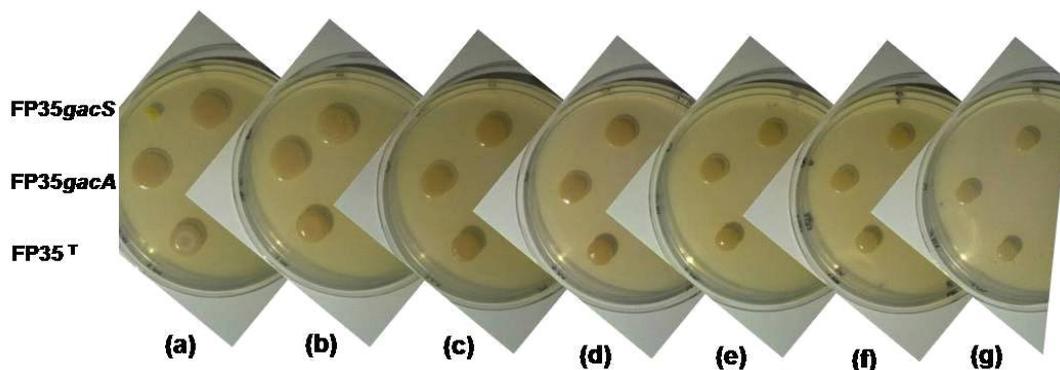


Figura 52. Crecimiento de cultivos bacterianos de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* y sus mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* en medio sólido MY a diferentes concentraciones de sales (% p/v). (a) 0,5 (b) 2 (c) 5 (d) 7,5 (e) 10 (f) 12,5 y (g) 15 tras la incubación durante 5 días a 32°C.

1.2. Análisis de la producción de enzimas hidrolíticas en los mutantes *gacS/gacA*

Para detectar el efecto del sistema regulador de dos componentes sobre las actividades hidrolíticas (amilasa, proteasa, ADNasa, lipasa, etc.), se ensayaron las correspondientes pruebas bioquímicas en medio sólido siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.3 de Material y Métodos. La cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis* no hidroliza la caseína, el almidón, la esculina, la gelatina, la lecitina ni la tirosina pero si hidroliza el ADN, el Tween 20, la urea y produce la enzima fosfatasa en las condiciones ensayadas. Por su parte, ninguna de las cepas mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* mostró alguna diferencia apreciable respecto a la cepa silvestre.

1.3. Análisis de la producción de exopolisacáridos en los mutantes *gacS/gacA*

El estudio de la producción de exopolisacáridos (EPSs) en la cepa silvestre y los mutantes *gac* se llevó a cabo mediante el análisis del aspecto de las colonias, la morfología celular por microscopía electrónica de transmisión y la extracción y cuantificación del material extracelular. Los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* mostraron una morfología colonial lisa que indicaba una disminución en la biosíntesis del EPS (Figura 53).

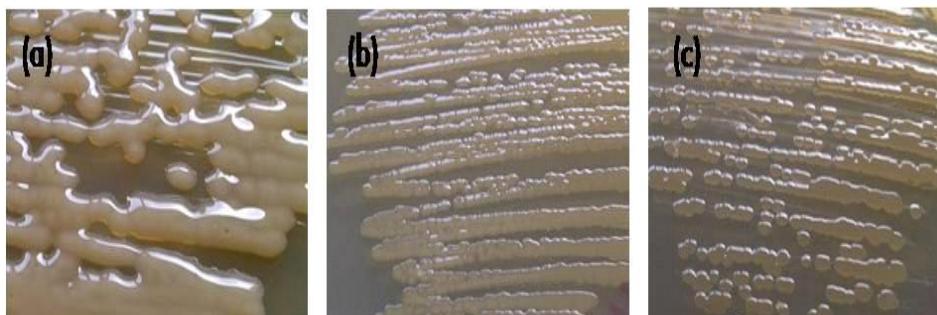


Figura 53. Fotografía del crecimiento de *Halomonas anticariensis* FP35^T (a) y sus mutantes FP35*gacS* (b) y FP35*gacA* (c). El cultivo se obtuvo en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales tras 5 días de incubación a 32°C.

En la Figura 54 se observan las microfotografías de los cultivos de la cepa silvestre y los mutantes *gac*, donde se puede confirmar la diferencia en la producción de EPS. Las células de los cultivos FP35*gacS* y FP35*gacA* presentan una aparente pérdida del material extracelular que rodea a las bacterias y que se desprende al medio en comparación con el cultivo de la cepa silvestre.

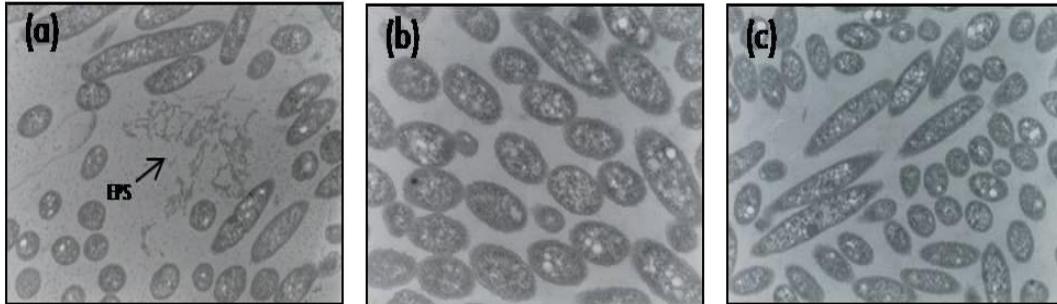


Figura 54. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa silvestre *H. anticariensis* FP35^T (a) y sus mutantes FP35*gacS* (b) y FP35*gacA* (c). El cultivo se obtuvo en medio MY al 7,5% (p/v) de sales tras 24h de incubación a 32°C.

Con el fin de cuantificar la producción de EPS se procedió a la extracción del EPS sintetizado por la cepa FP35^T de *H. anticariensis* y sus mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*. La extracción se realizó a partir de cultivos en medio MY al 7,5% (p/v) de sales, incubados durante 5 días, a 32°C y en agitación, ya que en estas condiciones la cepa FP35^T de *H. anticariensis* presenta su máximo rendimiento en producción de EPS.

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la cuantificación de los EPSs. Los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* producen alrededor de un 44,5% y 57,7% menos de polímero que la cepa silvestre FP35^T, respectivamente.

Tabla 16. Cuantificación de la producción de EPS en la cepa FP35^T de *H. anticariensis* y sus mutantes derivados FP35*gacS* y FP35*gacA*.

Cepa	mgEPS/100ml	mgEPS/gPSC (peso seco celular)
FP35 ^T	37,50	167,5
FP35 <i>gacS</i>	21,67	95,2
FP35 <i>gacA</i>	16,67	78,0

Por otro lado, en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* complementados *in trans* con los vectores de expresión pJN-GacS y pJN-GacA, respectivamente, el aspecto mucoso del crecimiento indicativo de la producción de EPS fue restaurado (Figura 55).

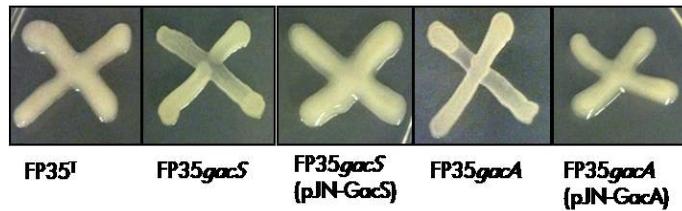


Figura 55. Aspecto mucoso del crecimiento de *H. anticariensis* FP35^T, sus mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y sus complementados FP35*gacS* (pJN-GacS) y FP35*gacA* (pJN-GacA). El cultivo de las bacterias se realizó en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales tras 5 días de incubación a 32°C.

Todos estos resultados sugieren que el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA modula la producción de EPS en *H. anticariensis* FP35^T.

1.4. Formación del biofilm en los mutantes *gacS/gacA*

Para evaluar la formación de biofilms en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y su comparación con la cepa silvestre FP35^T se empleó la técnica de tinción con cristal violeta. Para ello se cuantificó la adhesión de la bacteria a las paredes de los tubos de ensayo (Figura 56a) y las paredes de los pocillos de placas microtiter (Figura 56b) donde se habían cultivado.

En la Figura 56 se muestran los resultados obtenidos tras incubar las bacterias en medio MY al 7,5% (p/v) de sales durante 48h a 32°C en agitación. Los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* mostraron una disminución de la capacidad de formación del biofilm con respecto a la cepa FP35^T después de 48h de incubación. Este fenotipo deficiente fue restaurado en los mutantes complementados FP35*gacS* (pJN-GacS) y FP35*gacA* (pJN-GacA). Estos datos indican que el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA contribuye positivamente a la formación del biofilm en *H. anticariensis* FP35^T.

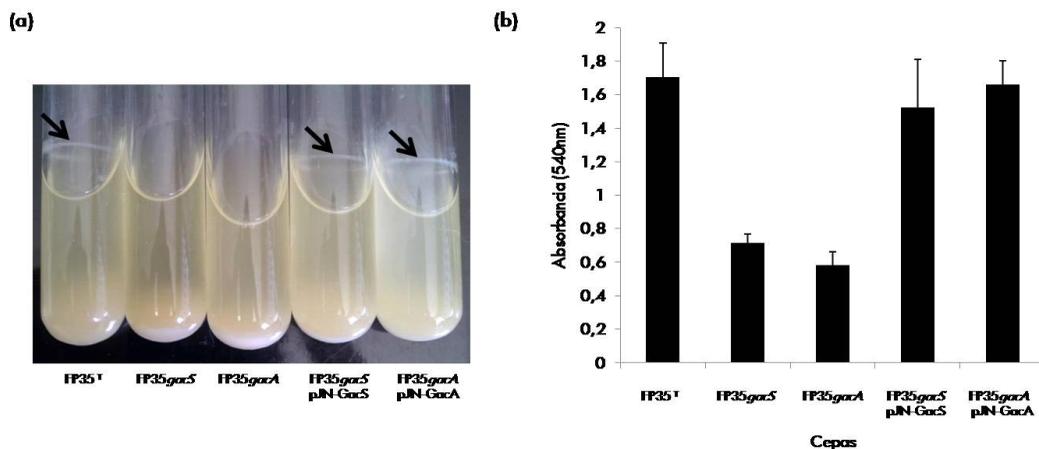


Figura 56. Formación del biofilm por la cepa FP35^T de *H. anticariensis*, los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* y sus complementados FP35*gacS* (pJN-GacS) y FP35*gacA* (pJN-GacA) en medio líquido MY 7,5% (p/v) de sales. (a) Fotografías de los cultivos tras 48h en reposo en tubos de ensayo. (b) Ensayo en placa microtiter tras 48h en agitación y cuantificación mediante tinción con cristal violeta.

1.5. Análisis de la movilidad en los mutantes *gacS/gacA*

Para estudiar la movilidad en las cepas de *H. anticariensis* se ensayaron diversos medios de cultivos semisólidos a diferentes concentraciones de sales. El cultivo de la cepa silvestre FP35^T en medio Koser adicionado del 5% (v/v) de sales, 0,5% (p/v) de casamino ácidos, 0,2% (p/v) glucosa, 0,02% de MgSO₄·7H₂O y 0,3% (p/v) de Bacto Agar (Difco) proporcionó las condiciones óptimas para un ensayo sensible de la movilidad tipo swarming. En la Figura 57 se muestran los resultados tras inocular en la superficie del medio de cultivo un volumen de 2μl de cada cultivo bacteriano ajustado a un D.O._{600nm} de ~ 0,2. Los resultados obtenidos tras medir el diámetro del crecimiento mostraron una reducción de un 20% de movilidad swarming en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* respecto a la cepa silvestre FP35^T.

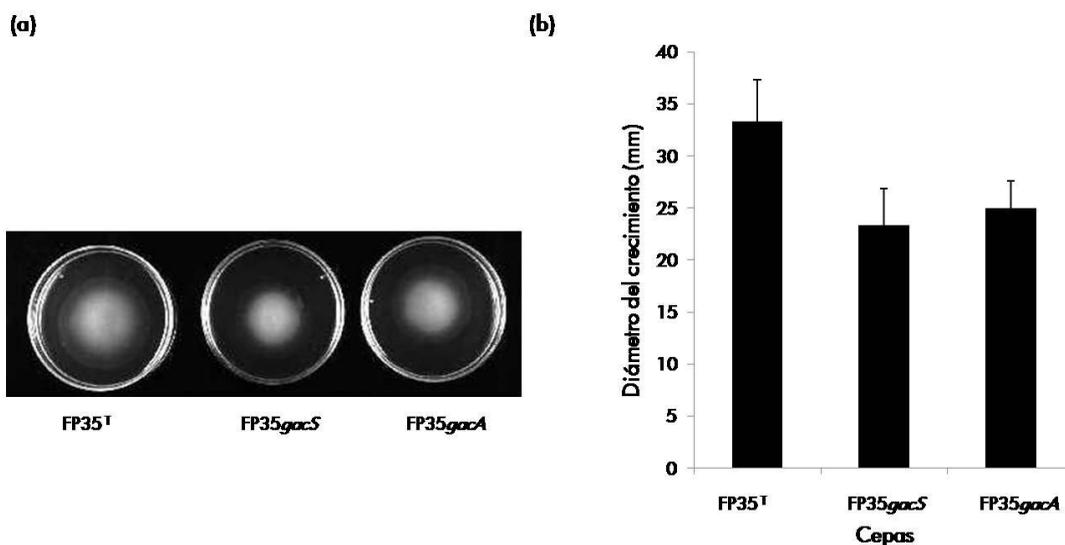


Figura 57. Estudio de la movilidad en la cepa FP35^T de *H. anticariensis* y sus mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*. (a) Imágenes representativas de la movilidad swarming. (b) Diámetros del crecimiento de la movilidad swarming tras 48h de incubación a 32°C.

2. Estudio de los fenotipos controlados por el sistema QS HanR/HanI

Para determinar el papel del sistema QS HanR/HanI en *H. anticariensis* FP35^T analizamos los mismos fenotipos que se ensayaron en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*.

2.1. Análisis de la tolerancia al estrés osmótico, la producción de enzimas hidrolíticas, la producción de exopolisacáridos, formación del biofilm y la movilidad

La metodología utilizada para estudiar la tolerancia al estrés osmótico, la producción de enzimas hidrolíticas, la producción de EPS, el desarrollo del biofilm, la movilidad en los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* fue la misma que se empleó para el análisis de los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA*. Estos mutantes fueron construidos en el capítulo I.

Los mutantes QS FP35*hanR* y FP35*hanI* mostraron un comportamiento frente a la sal similar al de la cepa FP35^T de *Halomonas anticariensis*; es decir, eran capaces de crecer entre el 0,5 y 15% (p/v) de sales.

Al igual que en el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA, la mutación en los componentes del sistema QS HanR/HanI no tuvo ningún efecto sobre la producción de enzimas hidrolíticas.

En cuanto a la producción de exopolisacáridos y el desarrollo del biofilm, que son características comúnmente reguladas por el sistema QS en las bacterias, los resultados obtenidos en relación con los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* no mostraron ninguna diferencia respecto a la cepa silvestre *H. anticariensis* FP35^T (Figura 58). El aspecto colonial mucoso, típico de la cepa silvestre, era el mismo en los mutantes afectados en el sistema QS (Figura 58a). Así mismo, un resultado similar al de la cepa silvestre se obtuvo en el estudio de la formación del biofilm (Figura 58b) y de la movilidad swimmig en los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* (Figura 58c).

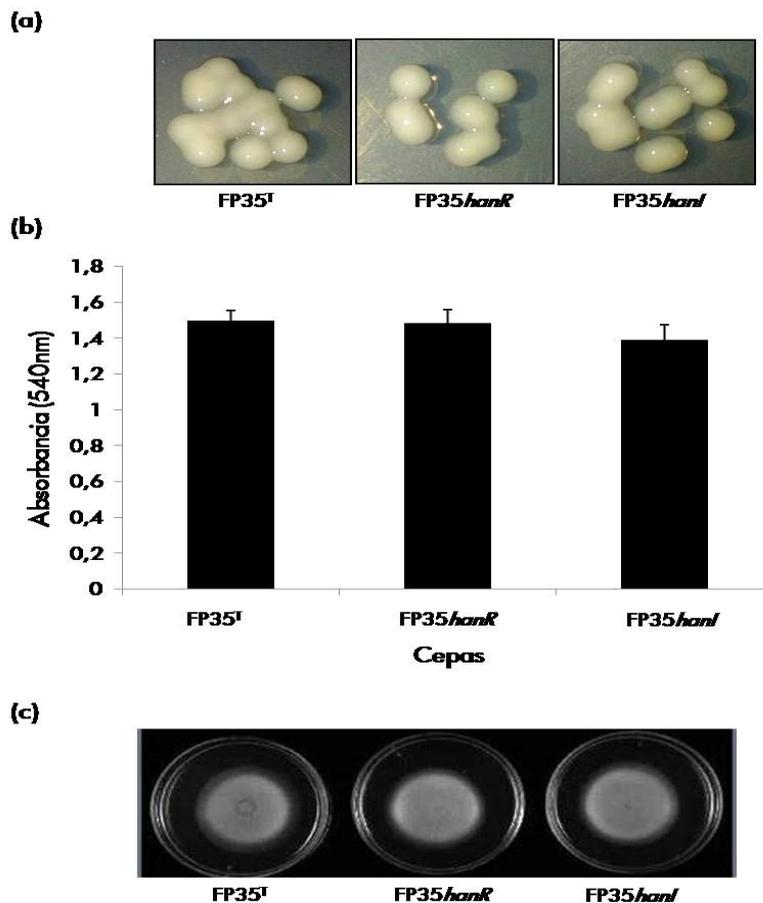


Figura 58. Estudio fenotípico de la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis* y sus mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI*. (a) Aspecto colonial. (b) Cuantificación de la formación del biofilm por el ensayo en placa microtiter y tinción con cristal violeta. (c) Movilidad swimmig.

2.2. Microarray fenotípico

Al no existir diferencias en los fenotipos ensayados en los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* con respecto a la cepa silvestre, nos planteamos analizar otros fenotipos que podrían estar controlados por QS mediante el uso de la tecnología del microarray fenotípico (Phenotypes Microarray™, PM). Para ello se analizó el mutante deficiente en la producción de AHLs FP35*hanI* y la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis* según la metodología descrita en el apartado 4.1.4 de Material y Métodos. La tecnología del microarray fenotípico incluye aproximadamente el análisis de 2,000 fenotipos en un conjunto de 20 paneles o placas microtiter de 96 pocillos. La mitad de estos ensayos están diseñados para estudiar el metabolismo celular y funciones de estrés como por ejemplo el pH y los osmolitos (Placas PM01-PM10) y la otra mitad para medir la susceptibilidad a 240 inhibidores a cuatro concentraciones diferentes (Placas PM11-PM20). En la Figura 59 se muestran los resultados obtenidos de las 20 placas ensayadas (PM01-PM20). Las claves correspondientes a cada pocillo están incluidas en la Figura S1 en el apartado de Material Suplementario.

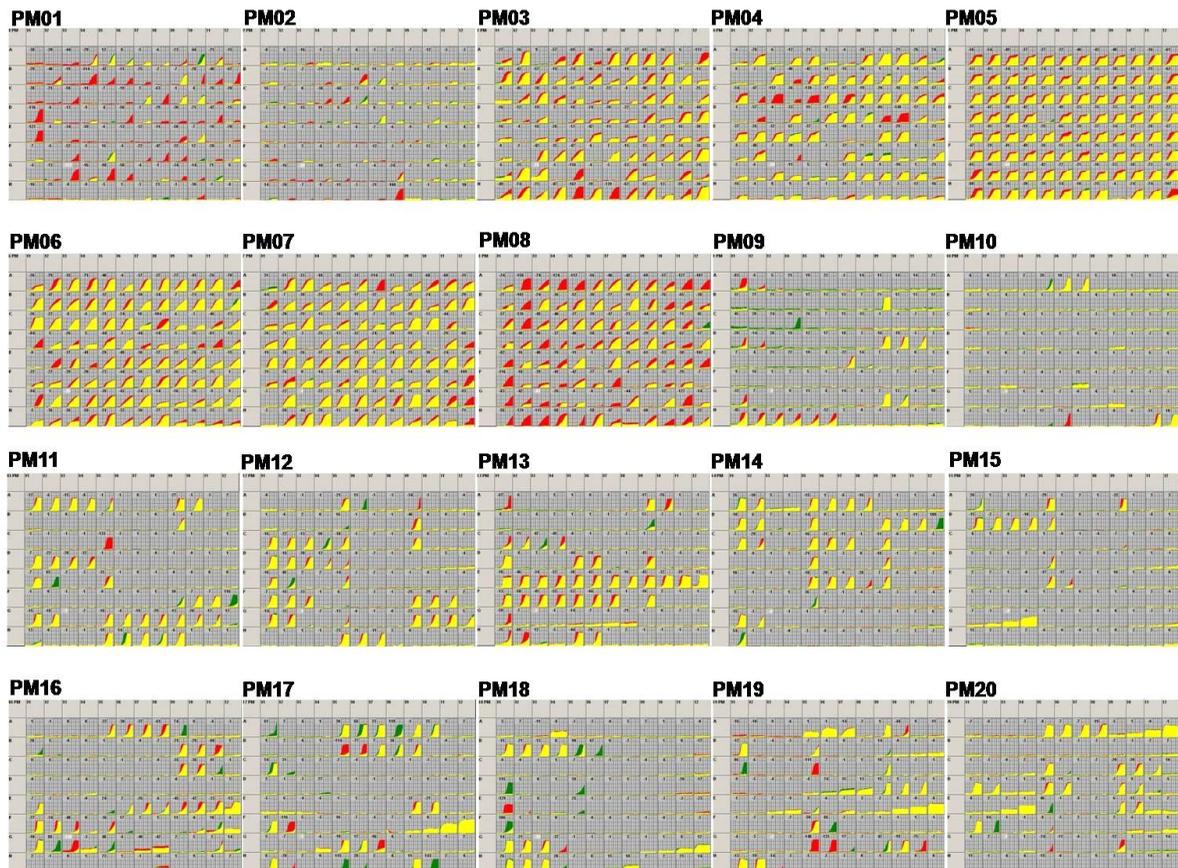


Figura 59. Resultados de la comparación de la cepa mutante FP35*hanI* con la cepa silvestre FP35^T mediante análisis microarray fenotípico. Los datos cinéticos fueron recogidos mediante el programa OmniLog. Las curvas muestran el tiempo cursado (eje horizontal) en función de la cantidad del color púrpura formado a partir de la reducción del

tetrazolio (eje vertical) debido a la respiración bacteriana en cada uno de los 96 pocillos. El color rojo indica una alta actividad de la cepa silvestre FP35^T, mientras que el color verde indica una alta actividad del mutante FP35*hanI*. Cuando ambas cepas tienen la misma actividad o metabolismo en un pocillo, la cinética de color rojo y verde se superpone y se produce un color amarillo.

Los resultados mostraron que el mutante FP35*hanI* tuvo 65 pérdidas fenotípicas (Tabla 17). Los fenotipos deficientes estaban relacionados con el transporte y metabolismo de numerosas fuentes de carbono (15), nitrógeno (42) y fósforo (8).

La comparación de la cinética de las curvas de las placas PM01 y PM02, en las cuales se estudia la capacidad de las células de utilizar diferentes fuentes de carbono, mostró que el mutante FP35*hanI* tiene una baja actividad en presencia de L-fucosa, D-ácido glucónico, L-ácido glutámico, D,L-ácido málico, ácido acético, L-asparagina, ácido α -ceto-glutárico, L-glutamina, adonitol, m-inositol, L-serina, L-alanina, D-arabitol, putrescina y L-alanil-glicina en comparación con la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis*.

Los resultados de la placa PM03, en la cual se ensaya la capacidad de las células para utilizar diferentes compuestos como única fuente de nitrógeno, mostraron que el mutante FP35*hanI* presenta baja actividad en presencia de nitrato, urea, L-asparagina, L-ácido glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-prolina, D-asparagina, etanolamina, putrescina, alantoína, γ -amino-N-ácido butírico, δ -amino-N-ácido valérico y dipéptidos como: Ala-Gln, Ala-His, Ala-Thr, Gly-Asn, Gly-Gln en comparación con la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis*.

La placa PM04, que incluye la utilización de fuentes de fósforo y sulfato, mostró que la cepa mutante FP35*hanI* tenía baja actividad en presencia de fosfoenol piruvato, D-glucosa-1-fosfato, 2-deoxi-D-glucosa 6-fosfato, 6-fosfo-ácido gluconico, citidina-3',5'-cíclica monofosfato, D-manosa-6-fosfato, Uridina-3'-monofosfato, Uridina-5'-monofosfato en comparación con la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis*.

El resultado del análisis de la placa PM05 que estudia rutas biosintéticas no se tuvo en consideración debido que el control negativo registró actividad.

Los resultados de las placas PM06 y PM07, que permiten determinar rutas relacionadas con el catabolismo del nitrógeno, mostraron baja actividad del mutante FP35*hanI* en presencia de Ala-Arg, Ala-Pro, Ala-Tyr, Arg-Arg, Asn-Val, Asp-Phe, Glu-Trp, Gly-Ala, His-Tyr, Ile-Arg, Leu-Ala, Leu-Arg, Lys-Arg, Lys-Leu, Lys-Lys, Lys-Pro, Pro-Tyr, Thr-Gly, Trp-Lys, Tyr-Gly, Tyr-Lys, Tyr-Phe, Tyr-Tyr y γ -Glu-Gly.

El análisis de la placa PM08 no se tuvo en cuenta debido a que los controles negativo y positivo dieron resultados inesperados en comparación con los mismos controles incluidos en las placas PM06 y PM07.

Los resultados obtenidos del análisis de los paneles PM09 y PM10, diseñados para el estudio del estrés osmótico y efecto de ciertos iones, y el pH, indicó que la cepa silvestre FP35^T así como el mutante FP35*hanI* no mostraban actividades comparables a excepción de la resistencia del mutante en presencia del osmolito β -ácido glutámico en medio al 6% (p/v) de NaCl.

En la Tabla 17 se muestra un resumen de los resultados destacados del primer conjunto de ensayos (PM01-PM10).

Tabla 17. Resultados del microarray fenotípico de las rutas metabólicas (PM01-PM10) para el mutante FP35*hanI* de *H. anticariensis*.

Test	Sustrato	Modo de acción	Fenotipo de la cepa FP35 <i>hanI</i> *
Fenotipos perdidos	L-Fucosa	Fuente de carbono	-114
	D-Ácido glucónico	"	-51
	L-Ácido glutámico	"	-67
	D,L-Ácido málico	"	-50
	Ácido acético	"	-63
	L-Asparagina	"	-136
	Ácido α -ceto-glutárico	"	-50
	L-Glutamina	"	-122
	Adonitol	"	-50
	M-Inositol	"	-52
	L-Serina	"	-113
	L-Alanina	"	-98
	D-Arabitol	"	-64
	Putrescina	"	-108
	L-Alanil-Glicina	"	-50
	Nitrato	Fuente de nitrógeno	-57
	Urea	"	-69
	L-Asparagina	"	-61
	L-Ácido glutámico	"	-113
	L-Glutamina	"	-61
	L-Histidina	"	-57
	L-Prolina	"	-54
	D-Asparagina	"	-55
	Etanolamina	"	-56
	Putrescina	"	-58
	Alantoína	"	-116
	γ -Amino-N-Ácido butírico	"	-53
	δ -Amino-N-Ácido valérico	"	-65
	Ala-Gln	"	-74
	Ala-His	"	-162
Ala-Thr	"	-139	
Gly-Asn	"	-62	
Gly-Gln	"	-52	

Resultados y Discusión: Capítulo III

Fosfoenol piruvato	Fuente de fosfato	-54
D-glucosa-1-fosfato	"	-152
2-deoxi-D-glucosa 6-fosfato	"	-130
6-fosfo-ácido gluconico	"	-97
Citidina-3',5'-ciclica monofosfato	"	-57
D-manosa-6-fosfato	"	-57
Uridina-3'-monofosfato	"	-86
Uridina-5'-monofosfato	"	-149
Ala-Arg	Peptidos, fuente de Nitrógeno	-71
Ala-Pro	"	-70
Ala-Tyr	"	-50
Arg-Arg	"	-54
Asn-Val	"	-104
Asp-Phe	"	-84
Glu-Trp	"	-81
Gly-Ala	"	-88
His-Tyr	"	-94
Ile-Arg	"	-54
Leu-Ala	"	-58
Leu-Arg	"	-51
Lys-Arg	"	-114
Lys-Leu	"	-68
Lys-Lys	"	-60
Lys-Pro	"	-64
Pro-Tyr	"	-68
Thr-Gly	"	-76
Trp-Lys	"	-109
Tyr-Gly	"	-65
Tyr-Lys	"	-78
Tyr-Phe	"	-93
Tyr-Tyr	"	-50
γ -Glu-Gly	"	-79
Fenotipos adquiridos	NaCl al 6%+ β -ácido glutámico	Osmolitos +99

* El programa Omnilog-PM genera curvas de tiempo cursado debido a la respiración (formación de un color púrpura a causa de la reducción del tetrazolio) y calcula la diferencia entre las áreas de la cepa mutante y la cepa silvestre. Las unidades son arbitrarias. Los **valores positivos** indican que el mutante muestra una actividad respiratoria más alta que la cepa silvestre; mientras que los **valores negativos** indican que la cepa mutante muestra una actividad respiratoria menor que la cepa silvestre.

El análisis de las placas PM11-PM20 puso de manifiesto la sensibilidad o resistencia del mutante FP35*hanI* a ciertos compuestos químicos (Tabla 18) (15 pérdidas y 20 ganancias). Como era de esperar el mutante FP35*hanI*, que contiene insertado en el genoma el gen de resistencia a kanamicina, ha adquirido resistencia a dicho antimicrobiano. La cepa mutante FP35*hanI* también adquirió resistencia a otros antimicrobianos como la clorhexidina, blastidina S, cefazolina y ácido pipemídico. Además la cepa FP35*hanI* mostró una alta actividad (resistencia) en presencia

de otros inhibidores incluyendo aniones tóxicos como el arsenato sódico y el arsenito sódico, entre otros (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de la susceptibilidad del mutante FP35*hanI* de *H. anticariensis* a diferentes compuestos químicos (PM11-PM20).

Test	Sustrato	Modo de acción	Fenotipo de la cepa FP35 <i>hanI</i> *
Fenotipos pérdidos- Sensibilidad	Higromicina B	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, aminoglucósido	-114
	Dihidroestreptomicina	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, aminoglucósido	-148
	Colistina	Membrana, péptido cíclico	-133
	Ampicilina	Intercalador ADN, inhibición síntesis ARN	-67
	Fosfomicina	Pared celular	-61
	Cefamandol	Pared celular, cefalosporina	-96
	Trimetoprima	Antagonista del folato, inhibidor de la dihidrofolato reductasa	-80
	5-Fluorouracilo	Análogo de ácidos nucleicos, perimidina	-54
	Metasilicato de sodio	Anión tóxico	-129
	Cloruro de litio	Catión tóxico	-116
	Cloruro cuprico	Catión tóxico	-88
	Cloruro de cromo	Catión tóxico	-138
	Umbeliferona	Intercalador en el ADN	-111
	Hidroxilamina	Daño ADN, mutagénico, antifolato (inhibe la síntesis de timina y metionina)	-75
		8-Hidroxiquinolina	Secuestrador, lipofílico
Fenotipos adquiridos- Resistencia	Neomicina	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, aminoglucósido	+116
	Kanamicina	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, aminoglucósido	+54
	Paromomicina	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, aminoglucósido	+50
	Tetraciclina	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S, tetraciclina	+51
	Cefazolina	Pared celular, cefalosporina	+85
	Ácido pipemídico	Topoisomerasa ADN	+53
	Ácido oxolínico	Topoisomerasa ADN	+90
	Arsenato sódico	Anión tóxico, análogo PO_4^{3-}	+109
	<i>m</i> -Arsenito sódico	Anión tóxico	+115
	EGTA	Secuestrador, Ca^{2+}	+54
	Oxido de fenilarsina	Inhibidor de la tirosina fosfatasa	+143
	Semicarbazida	Inhibidor de la amina oxidasa,	+106
	hidrocloruro	Carcinógeno	
	D-Serina	Inhibe la 3PGA dehidrogenasa (L-serina y síntesis de pantotenato)	+61
		4-Aminopiridina	Inhibidor canal ion K^+

β -Cl-L-Alanina	Análogo de aminoácidos, alanina, inhibidor de la aminotransferasa	+119
5-Cl-7-iodo-8-hidroxiquinolina	quelador, lipofílico	+74
Cafeína	Inhibidor de la AMP cíclico fosfodiesterasa	+115
Clorhexidina	membrana, transporte de electrones	+86
Blasticidina S	síntesis de proteínas	+86
4-Hidroxicumarina	intercalador ADN	+84

* El programa Omnilog-PM genera curvas de tiempo cursado debido a la respiración (formación de un color púrpura a causa de la reducción del tetrazolio) y calcula la diferencia entre las áreas de la cepa mutante y la cepa silvestre. Las unidades son arbitrarias. Los **valores positivos** indican que el mutante muestra una actividad respiratoria más alta que la cepa silvestre; mientras que los **valores negativos** indican que la cepa mutante muestra una actividad respiratoria menor que la cepa silvestre.

2.3. Inducción de la transcripción de los genes controlados por el sistema quorum sensing en *H. anticariensis* FP35^T

Para identificar los genes bacterianos que se inducen bajo el control del sistema QS HanR/HanI se siguió un enfoque basado en la clonación de pequeños fragmentos del genoma de la cepa FP35^T de *H. anticariensis* en el vector pMS402 que contiene un sistema informador desprovisto de promotor. Para llevar a cabo este objetivo se procedió a la construcción de una librería de promotores. La metodología consistió en la ligación de fragmentos digeridos con la enzima *Sau3A* en el sitio de corte *Bam*HI del plásmido pMS402 (Gm^R) (véase Tabla 7 en el apartado Material y Métodos). Se ensayaron diferentes proporciones de vector:inserto para las reacciones de ligación. La transformación de los productos de ligación en *E. coli* S17 λ pir permitió la obtención de una librería aleatoria de promotores en *E. coli* (LAP-*Ec*). En cada caso se analizó la eficiencia de la inserción mediante PCR a partir de las colonias de 10 transformantes escogidos de forma aleatoria. Para las reacciones de PCR se emplearon los cebadores pZE05 (5'-CCAGCTGGCAATTCCGA-3') y pZE06 (5'-AATCATCACTTTCGGGAA-3'), que flanquean el sitio de inserción *Bam*HI del plásmido pMS402. Los resultados obtenidos mostraron que aproximadamente el 60% de los transformantes analizados contenían insertos con un tamaño que osciló entre 250pb hasta 2,5kb. La LAP-*Ec* se transfirió por conjugación en masa a *H. anticariensis* FP35*hanI* (Km^R), una cepa mutante que ha perdido totalmente la capacidad de producción de AHLs, obteniéndose así la librería aleatoria de promotores en *H. anticariensis* (LAP-*Ha*).

El sistema informador del plásmido pMS402, que contiene el operón *luxCDABE* desprovisto de promotor, es un sistema sensible que detecta fácilmente posibles regiones promotoras y no requiere la adición de sustratos para su inducción. Los clones positivos, es decir, aquellos que contenían promotores se identificaron mediante la producción de luz.

El rastreo de la LAP-*Ha* se realizó en medio de cultivo SWYE al 2% (p/v) de sales no suplementado con moléculas señal y en medio suplementado con moléculas señal (C₄, C₆, C₈ y C₁₂-HSL) a una concentración final de 1 μM. La actividad promotora en los transconjugantes se detectó directamente en los cultivos mediante la medida de la luminiscencia. De esta manera, se rastrearon aproximadamente 4,180 transconjugantes de los cuales 587 candidatos contenían posibles regiones promotoras que se inducían o reprimían en presencia de las AHLs (Tabla 19).

Tabla 19. Expresión diferencial relativa de los clones candidatos en respuesta a AHLs.

Tipo de regulación	Número de promotores que presentan una diferencia relativa de expresión en presencia de AHLs
Positiva	
>1,5 veces	262
1,5 veces	10
Total	272
Negativa	
>1,5 veces	10
1,5 veces	305
Total	315

En la actualidad, los candidatos seleccionados son objeto de un estudio de confirmación de su expresión diferencial relativa, tanto en presencia de AHLs sintéticas como de extractos de AHLs de *H. anticariensis* FP35^T. Una vez confirmada la actividad promotora se procederá a la secuenciación y posterior clasificación e identificación de los genes diana regulados por QS.

DISCUSIÓN

En este capítulo hemos analizado varios fenotipos en *Halomonas anticariensis* FP35^T, tales como la producción de EPS y la formación del biofilm, que generalmente están asociados a los sistemas de comunicación intercelular descritos en otras especies bacterianas.

Los resultados del análisis fenotípico mostraron que el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controlaba la producción de EPS en *H. anticariensis* FP35^T, tal y como ocurre por ejemplo en la bacteria *Azotobacter vinelandii*. El regulador de respuesta GacA de esta bacteria controla la síntesis de los polímeros alginato y poli-β-hidroxibutirato, mediante la regulación de la expresión del factor alternativo *rpoS*, responsable del control de funciones celulares en fase estacionaria de crecimiento (Castañeda y col., 2000). Sin embargo en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se ha demostrado que el sistema GacS/GacA regula la producción de moléculas señal AHLs que son las encargadas de inducir la expresión del gen *rpoS* y éste a su vez activa la

síntesis de alginato, factores de virulencia, piocianina, exotoxina A, elastasa y de enzimas lipasas, principalmente durante la fase estacionaria (Latifi y col., 1995; Reimmann y col., 1997; Winson y col., 1995). En *H. anticariensis* FP35^T, el sistema QS basado en las AHLs no parece estar implicado en la producción de EPS ya que este fenotipo no se ha visto afectado en los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI*. Es posible que el sistema GacS/GacA actúe bien directamente sobre la expresión de los genes de la síntesis del EPS o bien a través de otra ruta de regulación a nivel transcripcional o postranscripcional, al igual que se ha descrito en otras bacterias.

Los EPSs producidos por los microorganismos desempeñan múltiples funciones que generalmente se traducen en acciones beneficiosas para los mismos (Chen y col., 1995). Algunas de las funciones más importantes de los EPS es facilitar la adhesión microbiana a superficies inertes o biológicas, permitiendo así la colonización de las mismas con la consiguiente formación de un agregado de células bacterianas que daría lugar a un biofilm (Sutherland, 1999; Flemming y col., 2007). Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores (Dennis y col., 2003; Nadell y col., 2008; Parkins y col., 2001; Xavier y Foster, 2007). Un trabajo pionero en *Pseudomonas aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por el sistema QS (Davies y col., 1998).

En *H. anticariensis* FP35^T, el proceso de formación del biofilm no parece estar bajo el control del sistema QS HanR/HanI ya que los mutantes FP35*hanR* y FP35*hanI* no han mostrado diferencia alguna con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, como cabía esperar en los mutantes FP35*gacS* y FP35*gacA* el desarrollo del biofilm se ha visto afectado. Este resultado viene apoyado por el hecho de que el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla la producción de EPS, que es esencial para el proceso de formación del biofilm bacteriano ya que constituye gran parte de la matriz del biofilm. En *Halomonas maura* se ha demostrado que el EPS conocido como maurano es imprescindible para la formación del biofilm, lo que podría facilitar a dicha bacteria adherirse a superficies inertes o vivas como raíces de plantas que crecen en los suelos salinos (Llamas y col., 2006). Por otro lado hemos puesto de manifiesto que el sistema GacS/GacA afecta la movilidad que en algunas bacterias ayuda a la primera etapa de formación del biofilm aunque no parece ser un requisito esencial.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA regula de forma positiva la producción del EPS, la movilidad y con ello el proceso de formación del biofilm en *H. anticariensis* FP35^T. Este sistema, por tanto, influye en la adaptación de la bacteria al medio ambiente, transmitiendo la señal ambiental al interior celular para adecuar la expresión de los genes implicados. Por otro lado, aunque el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla el sistema QS HanR/HanI, no parece actuar a través del mismo en la regulación de los fenotipos ensayados.

Con el objetivo de determinar el papel del sistema QS HanR/HanI en *H. anticariensis* FP35^T utilizamos la tecnología del microarray fenotípico que permite un barrido de aproximadamente de 2,000 fenotipos.

El análisis de la cepa mutante FP35*hanI* en comparación con la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis* mediante esta tecnología mostró que el mayor número de fenotipos perdidos por la cepa mutante FP35*hanI* estaban relacionados con las rutas metabólicas y los sistemas de transporte de carbohidratos, nitrógeno y fósforo (Figura 59; Tabla 17). Datos similares fueron puestos de manifiesto en otras bacterias mediante otros enfoques como los análisis transcriptómicos y proteómicos. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* se demostró que el sistema QS controla el catabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno (Wagner y col., 2003). Otro estudio en esta bacteria mostró que los genes implicados en la utilización de carbohidratos y en el transporte de nutrientes están reprimidos por el sistema QS (Shuster y col., 2003). Análisis proteómicos en *Sinorhizobium meliloti* indicaron que las moléculas señal C_{16:1}-HSL y C₁₄-HSL afectan de forma directa o indirecta los niveles de proteínas implicados en el metabolismo del carbono y nitrógeno, la síntesis de nucleótidos así como el metabolismo secundario (Chen y col., 2003). Estos estudios revelan la importancia de los sistemas QS en la regulación del uso preferencial de las vías metabólicas y de los sistemas de transporte en función de las condiciones ambientales.

Teniendo en cuenta que las membranas celulares son el primer punto de contacto entre la célula y su medio ambiente, los transportadores localizados en la membrana facilitan la entrada de los nutrientes y metabolitos así como el flujo de compuestos tóxicos. De hecho Wagner y colaboradores (2003) en un análisis transcriptómico realizado en *P. aeruginosa* demostró que 60 genes regulados por QS (31 genes activados y 29 genes reprimidos) codificaban y controlaban proteínas de membrana.

En este sentido se ha demostrado que los sistemas de transporte MDR (del inglés *Multi Drug Resistance*) son capaces de expulsar de forma relativamente inespecífica un amplio número de sustratos no relacionados entre sí estructuralmente. Estos transportadores no actúan simplemente como sistemas de multiresistencia a antibióticos si no que también juegan un papel importante en los procesos de detoxificación de metabolitos intracelulares, homeostasis celular y transporte de las señales intracelulares, que son relevantes para el comportamiento fisiológico y ecológico de las bacterias en su ecosistema natural (Martinez y col., 2009; Sánchez Díaz, 2003).

Los datos del análisis del microarray fenotípico mostraron que el mutante QS FP35*hanI* había adquirido sensibilidad y resistencia hacia ciertos compuestos químicos como antimicrobianos, aniones y cationes tóxicos y otros inhibidores de procesos celulares con respecto a la cepa silvestre (Figura 59; Tabla 18). Estos resultados nos sugieren que el sistema QS podría ejercer un

control sobre los transportadores de dichos compuestos ya que estos sustratos no son metabolizables. En *Pseudomonas aeruginosa*, se demostró que el sistema transportador MexAB-OprM perteneciente a la superfamilia RND (del inglés *Resistance Nodulation cell Division*) se induce en fase estacionaria en presencia de moléculas señal QS del tipo C₄-HSL (Evans y col., 1999; Maseda y col., 2004). En *Bacteroides fragilis*, que contiene reguladores ortólogos del tipo LuxR, también se ha descrito que en presencia de AHLs exógenas se modula la expresión de la bomba de flujo BmeB perteneciente a la superfamilia RND (Pumbwe y col., 2008). Aparte de estos ejemplos, se ha propuesto también en otras especies bacterianas como *Burkholderia pseudomallei* y *E. coli* el control del sistema QS sobre los transportadores MDR (Chan y Chua, 2005; Chan y col., 2007; Yang y col., 2006).

Aunque la función fisiológica principal de los transportadores MDR no sea el flujo de las moléculas señal QS como es el caso en *P. aeruginosa* y *B. pseudomallei*, parece ser que juegan un papel relevante en la respuesta QS (Chan y Chua, 2005; Chan y col., 2007; Maseda y col., 2004). Es posible que *H. anticariensis* altere la expresión de ciertas bombas de flujo para adecuar la respuesta QS y adaptarse de forma rápida al medioambiente.

Aunque los resultados obtenidos mediante la tecnología del microarray fenotípico son reproducibles cabe mencionar que son preliminares y necesitan ser confirmados en pruebas individuales en tubos de ensayo en las mismas condiciones ensayadas. Además es necesario realizar dichas pruebas fenotípicas en el mutante complementado para confirmar la restauración del fenotipo.

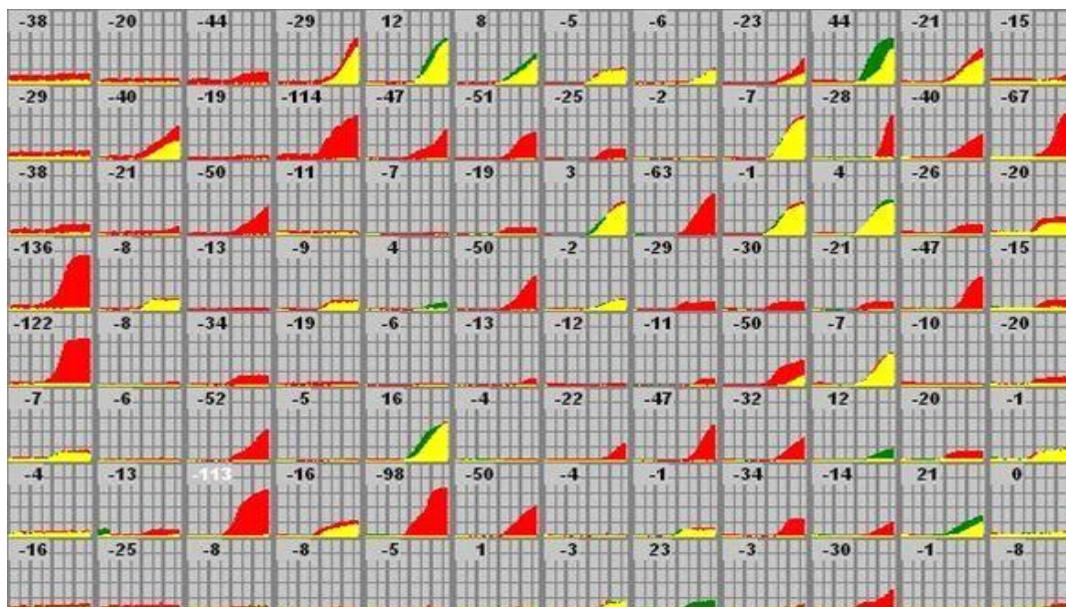
Con la misma finalidad, es decir, para arrojar luz sobre el papel del sistema QS HanR/HanI en *H. anticariensis* FP35^T decidimos usar una aproximación de tipo molecular. Para ello se pueden elegir diferentes enfoques, como por ejemplo el análisis proteómico (Cantero y col., 2006; Chen y col., 2003; Goo y col., 2010) o el uso de la tecnología de los microarray basados en ADN o ARN con sus limitaciones (Vasil, 2003). En nuestro caso escogimos una estrategia que consistió en la inducción de la transcripción de los genes mediante el clonaje de pequeños fragmentos de ADN corriente arriba de un gen informador para buscar posibles secuencias promotoras (Aguilar y col., 2003; Bjarnason y col., 2003; Duan y col., 2003; Marra y col., 2002; Pothier y col., 2007; Subsin y col., 2007).

De los resultados iniciales que hemos obtenido podemos destacar que se consiguió la construcción de una librería de promotores aleatoria (LPA-*Ha*) en la cepa mutante FP35*hanI* de *H. anticariensis* y se realizó un primer rastreo de la misma con resultados prometedores aunque entendemos que todavía nos falta optimizar y completar algunas etapas del experimento. Primero, continuar con el rastreo de la librería hasta alcanzar una representación significativa del genoma de *H. anticariensis* FP35^T; segundo, confirmar en los clones seleccionados la diferencia

de expresión relativa mostrada en presencia de las AHLs; tercero, identificar y clasificar los genes bajo control de la actividad promotora en los candidatos seleccionados; y finalmente, confirmar y analizar la expresión génica promotora mediante PCR cuantitativa a tiempo real o RT-PCR.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

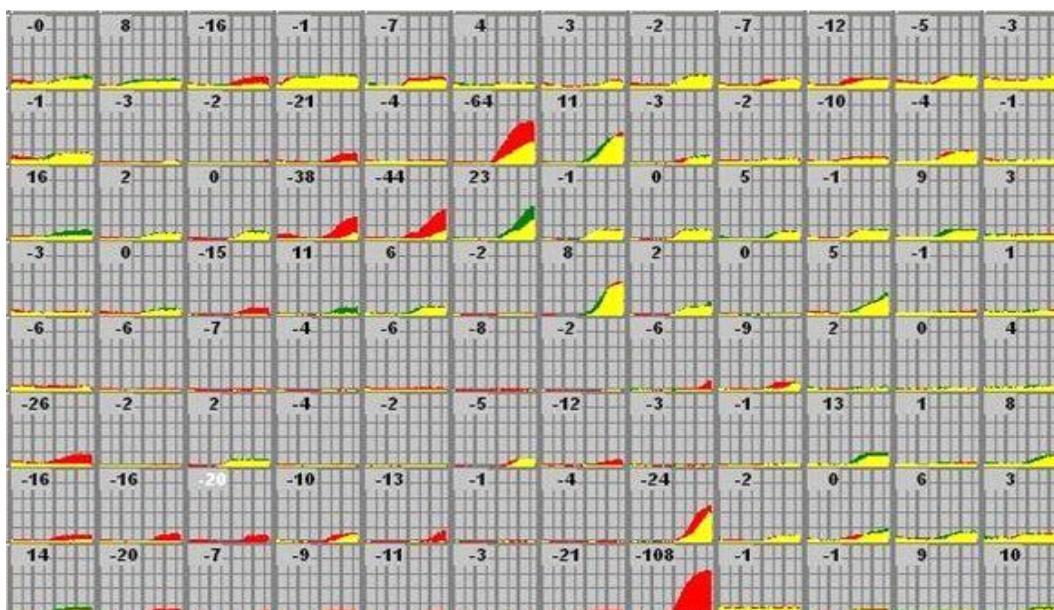
Resultado PM01 (Fuentes de carbono)



Clave PM01

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D-Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Gluconic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L- α -Glycerol-Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6-Phosphate	C2 D-Galactonic Acid- γ -Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α -D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucoaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 α -Keto-Glutaric Acid	D7 α -Hydroxy Butyric Acid	D8 β -Methyl-D-Galactoside	D9 α -D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 M-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1-Phosphate	E4 D-Fructose-6-Phosphate	E5 Tween 80	E6 α -Hydroxy Glutaric Acid- γ -Lactone	E7 α -Hydroxy Butyric Acid	E8 β -Methyl-D-Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L-Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 m-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 Bromo Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L-Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl-Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L-Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D- Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid- γ -Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethyl-amine	H12 2-Aminoethanol

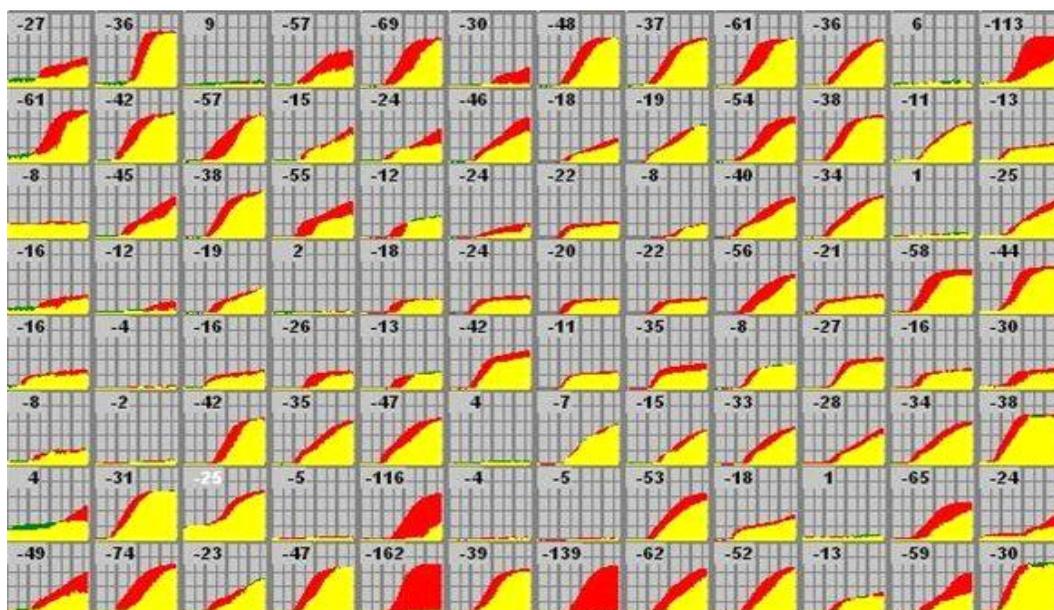
Resultado PM02 (Fuentes de carbono)



Clave PM02

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 α -Cyclodextrin	A4 β -Cyclodextrin	A5 γ -Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D-Galactosamine	B2 N-Acetyl-Neuraminic Acid	B3 β -D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D-Ribose	B10 l-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O- β -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 α -Methyl-D-Glucoside	C7 β -Methyl-D-Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 β -Methyl-D-Glucuronic Acid	C10 α -Methyl-D-Mannoside	C11 β -Methyl-D-Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosan	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turannose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D-Glucosaminitol	D10 γ -Amino Butyric Acid	D11 β -Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 β -Hydroxy Butyric Acid	E9 γ -Hydroxy Butyric Acid	E10 α -Keto-Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D-Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Melibionnic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4-Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L-Proline	G9 L-Isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Pyroglutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Sec-Butylamine	H7 D,L-Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanone	H12 3-Hydroxy 2-Butanone

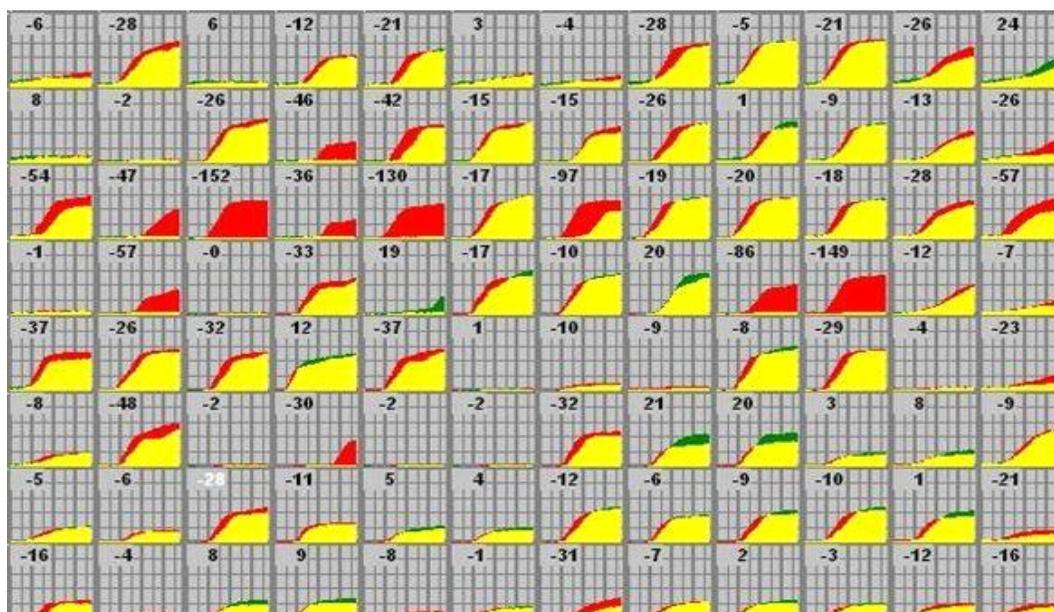
Resultado PM03 (Fuentes de nitrógeno)



Clave PM03

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Buret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L- Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethyl- amine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D- Glucosamine	E12 N-Acetyl-D- Galactosamine
F1 N-Acetyl-D- Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N- Butyric Acid	G8 γ-Amino-N- Butyric Acid	G9 ε-Amino-N- Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino- Caprylic Acid	G11 δ-Amino-N- Valeric Acid	G12 α-Amino-N- Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

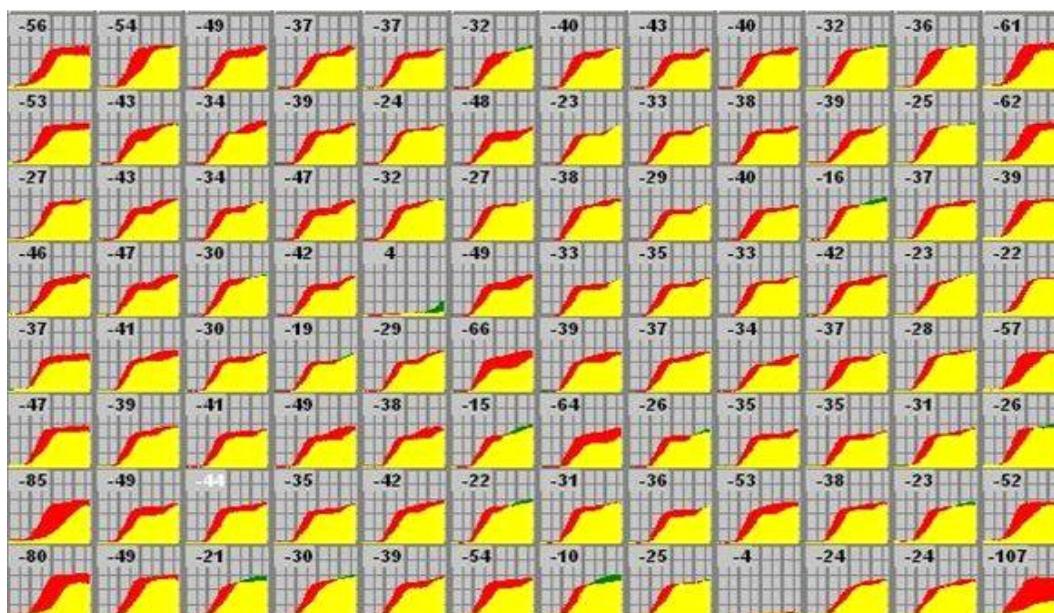
Resultado PM04 (Fuentes de fosfato y sulfato)



Clave PM04

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta- phosphate	A5 Tripoly- phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hyphosphate	A8 Adenosine- 2'- monophosphate	A9 Adenosine- 3'- monophosphate	A10 Adenosine- 5'- monophosphate	A11 Adenosine- 2',3'- cyclic monophosphate	A12 Adenosine- 3',5'- cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphate	B3 D,L- α -Glycerol Phosphate	B4 β -Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho- Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho- Glyceric Acid	B8 Guanosine- 2'- monophosphate	B9 Guanosine- 3'- monophosphate	B10 Guanosine- 5'- monophosphate	B11 Guanosine- 2',3'- cyclic monophosphate	B12 Guanosine- 3',5'- cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho- Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1- Phosphate	C4 D-Glucose-6- Phosphate	C5 2-Deoxy-D- Glucose 6- Phosphate	C6 D-Glucosamine- 6-Phosphate	C7 6-Phospho- Gluconic Acid	C8 Cytidine- 2'- monophosphate	C9 Cytidine- 3'- monophosphate	C10 Cytidine- 5'- monophosphate	C11 Cytidine- 2',3'- cyclic monophosphate	C12 Cytidine- 3',5'- cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1- Phosphate	D2 D-Mannose-6- Phosphate	D3 Cysteamine-S- Phosphate	D4 Phospho-L- Arginine	D5 o-Phospho-D- Serine	D6 o-Phospho-L- Serine	D7 o-Phospho-L- Threonine	D8 Uridine- 2'- monophosphate	D9 Uridine- 3'- monophosphate	D10 Uridine- 5'- monophosphate	D11 Uridine- 2',3'- cyclic monophosphate	D12 Uridine- 3',5'- cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D- Tyrosine	E2 O-Phospho-L- Tyrosine	E3 Phosphocreatine	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl- Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine- 3'- monophosphate	E10 Thymidine- 5'- monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'- cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphate	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteiny- Glycine	F10 L-Cysteic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfonic Acid
G1 N-Acetyl-L- Cysteine	G2 S-Methyl-L- Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L- Methionine	G10 N-Acetyl-D,L- Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio- β -D- Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaurine	H8 p-Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2-Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

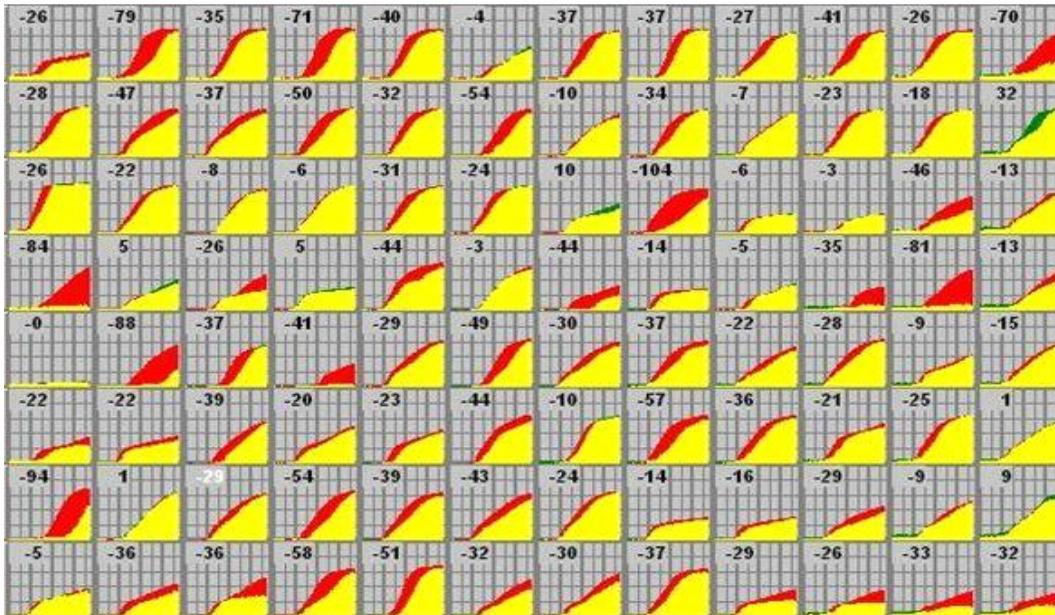
Resultado PM05 (Suplementos nutritivos)



Clave PM05

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenine	A11 Adenosine	A12 2-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanine	B11 Guanosine	B12 2-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine + L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (5) 4-Amino-Imidazole-4(5)-Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Chorismic Acid	D4 (-)Shikimic Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L- α,ϵ -Diaminopimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 β -Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Croitic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2-Deoxy Uridine
F1 Quinolinic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide	F5 β -Amino-Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Deferoxamine Mesylate	F8 D-(+)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyanocobalamin	G4 p-Amino-Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyrrolo-Quinoline Quinone	G11 Menadione	G12 Myo-Inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L- α -Hydroxy-Butyric Acid	H3 α -Ketobutyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L- α -Lipoic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevalonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80

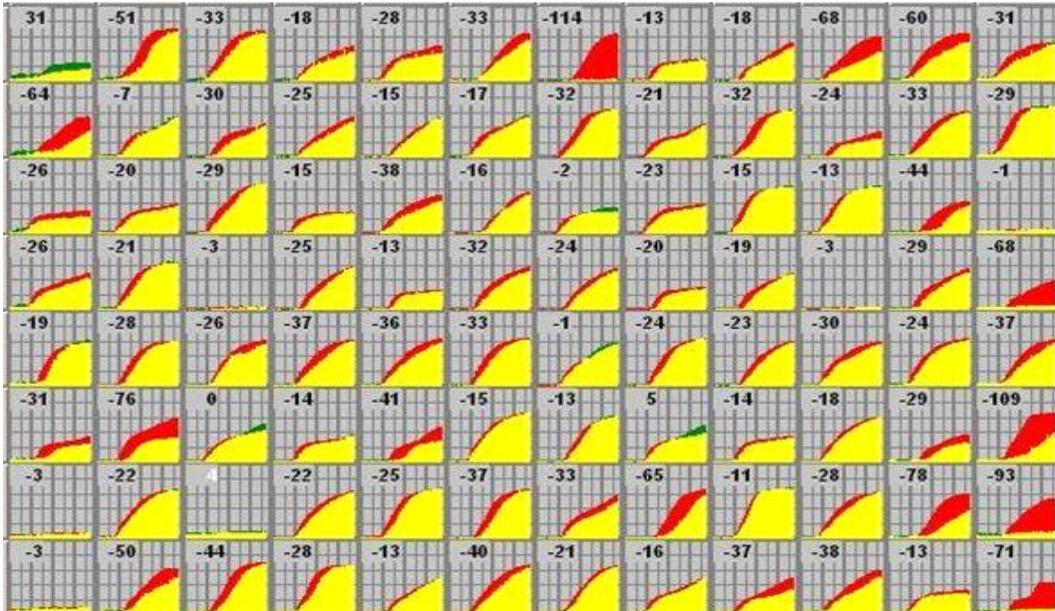
Resultado PM06 (Peptidos como fuente de nitrógeno)



Clave PM06

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Ala-Ala	A4 Ala-Arg	A5 Ala-Asn	A6 Ala-Glu	A7 Ala-Gly	A8 Ala-His	A9 Ala-Leu	A10 Ala-Lys	A11 Ala-Phe	A12 Ala-Pro
B1 Ala-Ser	B2 Ala-Thr	B3 Ala-Trp	B4 Ala-Tyr	B5 Arg-Ala	B6 Arg-Arg	B7 Arg-Asp	B8 Arg-Gln	B9 Arg-Glu	B10 Arg-Ile	B11 Arg-Leu	B12 Arg-Lys
C1 Arg-Met	C2 Arg-Phe	C3 Arg-Ser	C4 Arg-Trp	C5 Arg-Tyr	C6 Arg-Val	C7 Asn-Glu	C8 Asn-Val	C9 Asp-Asp	C10 Asp-Glu	C11 Asp-Leu	C12 Asp-Lys
D1 Asp-Phe	D2 Asp-Trp	D3 Asp-Val	D4 Cys-Gly	D5 Gln-Gln	D6 Gln-Gly	D7 Glu-Asp	D8 Glu-Glu	D9 Glu-Gly	D10 Glu-Ser	D11 Glu-Trp	D12 Glu-Tyr
E1 Glu-Val	E2 Gly-Ala	E3 Gly-Arg	E4 Gly-Cys	E5 Gly-Gly	E6 Gly-His	E7 Gly-Leu	E8 Gly-Lys	E9 Gly-Met	E10 Gly-Phe	E11 Gly-Pro	E12 Gly-Ser
F1 Gly-Thr	F2 Gly-Trp	F3 Gly-Tyr	F4 Gly-Val	F5 His-Asp	F6 His-Gly	F7 His-Leu	F8 His-Lys	F9 His-Met	F10 His-Pro	F11 His-Ser	F12 His-Trp
G1 His-Tyr	G2 His-Val	G3 Ile-Ala	G4 Ile-Arg	G5 Ile-Gln	G6 Ile-Gly	G7 Ile-His	G8 Ile-Ile	G9 Ile-Met	G10 Ile-Phe	G11 Ile-Pro	G12 Ile-Ser
H1 Ile-Trp	H2 Ile-Tyr	H3 Ile-Val	H4 Leu-Ala	H5 Leu-Arg	H6 Leu-Asp	H7 Leu-Glu	H8 Leu-Gly	H9 Leu-Ile	H10 Leu-Leu	H11 Leu-Met	H12 Leu-Phe

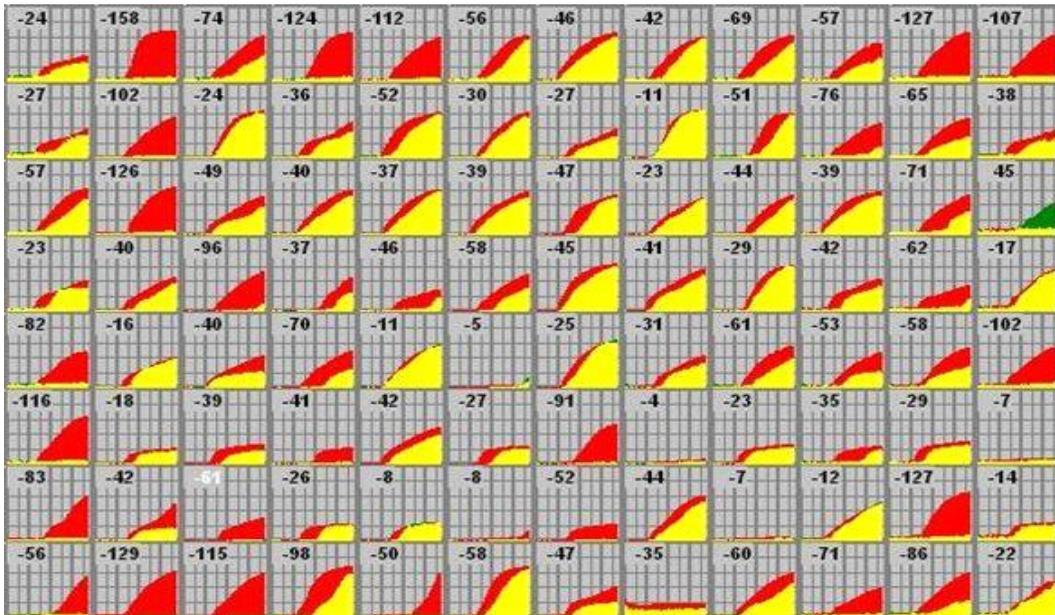
Resultado PM07 (Peptidos como fuente de nitrógeno)



Clave PM07

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Leu-Ser	A4 Leu-Trp	A5 Leu-Val	A6 Lys-Ala	A7 Lys-Arg	A8 Lys-Glu	A9 Lys-Ile	A10 Lys-Leu	A11 Lys-Lys	A12 Lys-Phe
B1 Lys-Pro	B2 Lys-Ser	B3 Lys-Thr	B4 Lys-Trp	B5 Lys-Tyr	B6 Lys-Val	B7 Met-Arg	B8 Met-Asp	B9 Met-Gln	B10 Met-Glu	B11 Met-Gly	B12 Met-His
C1 Met-Ile	C2 Met-Leu	C3 Met-Lys	C4 Met-Met	C5 Met-Phe	C6 Met-Pro	C7 Met-Trp	C8 Met-Val	C9 Phe-Ala	C10 Phe-Gly	C11 Phe-Ile	C12 Phe-Phe
D1 Phe-Pro	D2 Phe-Ser	D3 Phe-Trp	D4 Pro-Ala	D5 Pro-Asp	D6 Pro-Gln	D7 Pro-Gly	D8 Pro-Hyp	D9 Pro-Leu	D10 Pro-Phe	D11 Pro-Pro	D12 Pro-Tyr
E1 Ser-Ala	E2 Ser-Gly	E3 Ser-His	E4 Ser-Leu	E5 Ser-Met	E6 Ser-Phe	E7 Ser-Pro	E8 Ser-Ser	E9 Ser-Tyr	E10 Ser-Val	E11 Thr-Ala	E12 Thr-Arg
F1 Thr-Glu	F2 Thr-Gly	F3 Thr-Leu	F4 Thr-Met	F5 Thr-Pro	F6 Trp-Ala	F7 Trp-Arg	F8 Trp-Asp	F9 Trp-Glu	F10 Trp-Gly	F11 Trp-Leu	F12 Trp-Lys
G1 Trp-Phe	G2 Trp-Ser	G3 Trp-Trp	G4 Trp-Tyr	G5 Tyr-Ala	G6 Tyr-Gln	G7 Tyr-Glu	G8 Tyr-Gly	G9 Tyr-His	G10 Tyr-Leu	G11 Tyr-Lys	G12 Tyr-Phe
H1 Tyr-Trp	H2 Tyr-Tyr	H3 Val-Arg	H4 Val-Asn	H5 Val-Asp	H6 Val-Gly	H7 Val-His	H8 Val-Ile	H9 Val-Leu	H10 Val-Tyr	H11 Val-Val	H12 Y-Glu-Gly

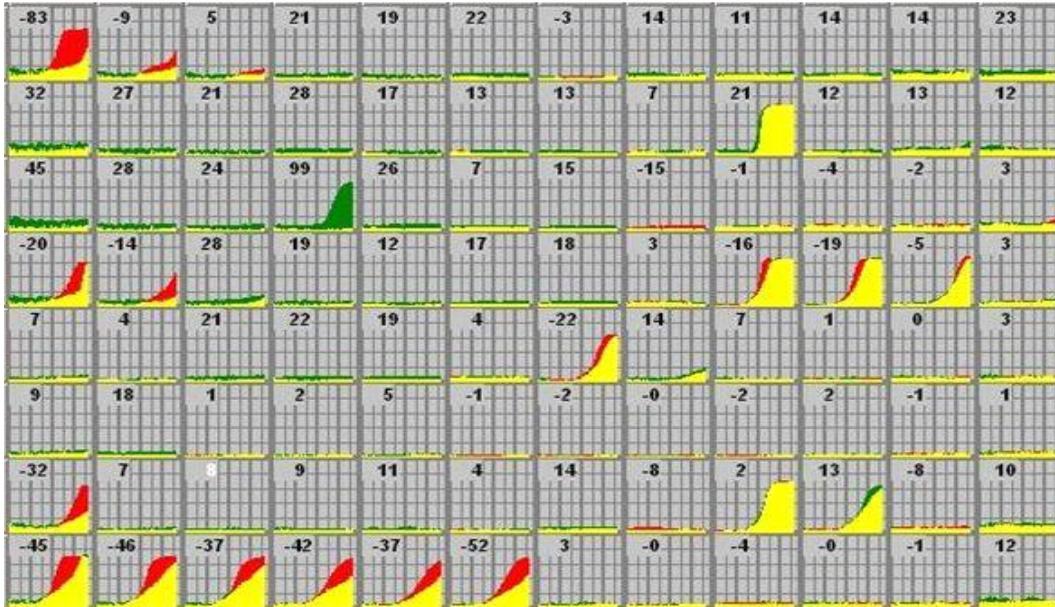
Resultado PM08 (Peptidos como fuente de nitrógeno)



Clave PM08

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Ala-Asp	A4 Ala-Gln	A5 Ala-Ile	A6 Ala-Met	A7 Ala-Val	A8 Asp-Ala	A9 Asp-Gln	A10 Asp-Gly	A11 Glu-Ala	A12 Gly-Aan
B1 Gly-Asp	B2 Gly-Ile	B3 His-Ala	B4 His-Glu	B5 His-His	B6 Ile-Aan	B7 Ile-Leu	B8 Leu-Aan	B9 Leu-His	B10 Leu-Pro	B11 Leu-Tyr	B12 Lys-Asp
C1 Lys-Gly	C2 Lys-Met	C3 Met-Thr	C4 Met-Tyr	C5 Phe-Asp	C6 Phe-Glu	C7 Gln-Glu	C8 Phe-Met	C9 Phe-Tyr	C10 Phe-Val	C11 Pro-Arg	C12 Pro-Aan
D1 Pro-Glu	D2 Pro-Ile	D3 Pro-Lys	D4 Pro-Ser	D5 Pro-Trp	D6 Pro-Val	D7 Ser-Aan	D8 Ser-Asp	D9 Ser-Gln	D10 Ser-Glu	D11 Thr-Asp	D12 Thr-Gln
E1 Thr-Phe	E2 Thr-Ser	E3 Trp-Val	E4 Tyr-Ile	E5 Tyr-Val	E6 Val-Ala	E7 Val-Gln	E8 Val-Glu	E9 Val-Lys	E10 Val-Met	E11 Val-Phe	E12 Val-Pro
F1 Val-Ser	F2 β -Ala-Ala	F3 β -Ala-Gly	F4 β -Ala-His	F5 Met- β -Ala	F6 β -Ala-Phe	F7 D-Ala-D-Ala	F8 D-Ala-Gly	F9 D-Ala-Leu	F10 D-Leu-D-Leu	F11 D-Leu-Gly	F12 D-Leu-Tyr
G1 Y-Gly-Gly	G2 Y-D-Glu-Gly	G3 Gly-D-Ala	G4 Gly-D-Asp	G5 Gly-D-Ser	G6 Gly-D-Thr	G7 Gly-D-Val	G8 Leu- β -Ala	G9 Leu-D-Leu	G10 Phe- β -Ala	G11 Ala-Ala-Ala	G12 D-Ala-Gly-Gly
H1 Gly-Gly-Ala	H2 Gly-Gly-D-Leu	H3 Gly-Gly-Gly	H4 Gly-Gly-Ile	H5 Gly-Gly-Leu	H6 Gly-Gly-Phe	H7 Val-Tyr-Val	H8 Gly-Phe-Phe	H9 Leu-Gly-Gly	H10 Leu-Leu-Leu	H11 Phe-Gly-Gly	H12 Tyr-Gly-Gly

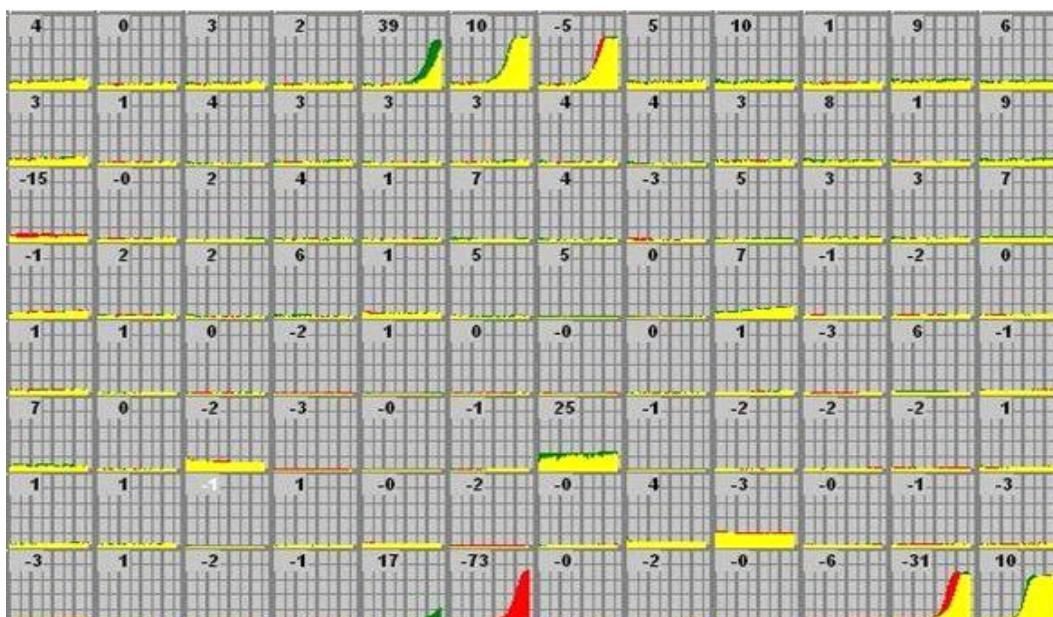
Resultado PM09 (Osmolitos)



Clave PM09

A1 NaCl 1%	A2 NaCl 2%	A3 NaCl 3%	A4 NaCl 4%	A5 NaCl 5%	A6 NaCl 5.5%	A7 NaCl 6%	A8 NaCl 6.5%	A9 NaCl 7%	A10 NaCl 8%	A11 NaCl 9%	A12 NaCl 10%
B1 NaCl 6%	B2 NaCl 6% + Betaine	B3 NaCl 6% + N-N Dimethyl glycine	B4 NaCl 6% + Sarcosine	B5 NaCl 6% + Dimethyl sulphonyl propionate	B6 NaCl 6% + MOPS	B7 NaCl 6% + Ectoine	B8 NaCl 6% + Choline	B9 NaCl 6% + Phosphoryl choline	B10 NaCl 6% + Creatine	B11 NaCl 6% + Creatinine	B12 NaCl 6% + L-Carnitine
C1 NaCl 6% + KCl	C2 NaCl 6% + L-proline	C3 NaCl 6% + N-Acetyl L-glutamine	C4 NaCl 6% + β-Glutamic acid	C5 NaCl 6% + γ-Amino-n-butiric acid	C6 NaCl 6% + Glutathione	C7 NaCl 6% + Glycerol	C8 NaCl 6% + Trehalose	C9 NaCl 6% + Trimethylamine-N-oxide	C10 NaCl 6% + Trimethylamine	C11 NaCl 6% + Octopine	C12 NaCl 6% + Trigonelline
D1 Potassium chloride 3%	D2 Potassium chloride 4%	D3 Potassium chloride 5%	D4 Potassium chloride 6%	D5 Sodium sulfate 2%	D6 Sodium sulfate 3%	D7 Sodium sulfate 4%	D8 Sodium sulfate 5%	D9 Ethylene glycol 5%	D10 Ethylene glycol 10%	D11 Ethylene glycol 15%	D12 Ethylene glycol 20%
E1 Sodium formate 1%	E2 Sodium formate 2%	E3 Sodium formate 3%	E4 Sodium formate 4%	E5 Sodium formate 5%	E6 Sodium formate 6%	E7 Urea 2%	E8 Urea 3%	E9 Urea 4%	E10 Urea 5%	E11 Urea 6%	E12 Urea 7%
F1 Sodium Lactate 1%	F2 Sodium Lactate 2%	F3 Sodium Lactate 3%	F4 Sodium Lactate 4%	F5 Sodium Lactate 5%	F6 Sodium Lactate 6%	F7 Sodium Lactate 7%	F8 Sodium Lactate 8%	F9 Sodium Lactate 9%	F10 Sodium Lactate 10%	F11 Sodium Lactate 11%	F12 Sodium Lactate 12%
G1 Sodium Phosphate pH 7 20mM	G2 Sodium Phosphate pH 7 50mM	G3 Sodium Phosphate pH 7 100mM	G4 Sodium Phosphate pH 7 200mM	G5 Sodium Benzoate pH 5.2 20mM	G6 Sodium Benzoate pH 5.2 50mM	G7 Sodium Benzoate pH 5.2 100mM	G8 Sodium Benzoate pH 5.2 200mM	G9 Ammonium sulfate pH 8 10mM	G10 Ammonium sulfate pH 8 20mM	G11 Ammonium sulfate pH 8 50mM	G12 Ammonium sulfate pH 8 100mM
H1 Sodium Nitrate 10mM	H2 Sodium Nitrate 20mM	H3 Sodium Nitrate 40mM	H4 Sodium Nitrate 60mM	H5 Sodium Nitrate 80mM	H6 Sodium Nitrate 100mM	H7 Sodium Nitrite 10mM	H8 Sodium Nitrite 20mM	H9 Sodium Nitrite 40mM	H10 Sodium Nitrite 60mM	H11 Sodium Nitrite 80mM	H12 Sodium Nitrite 100mM

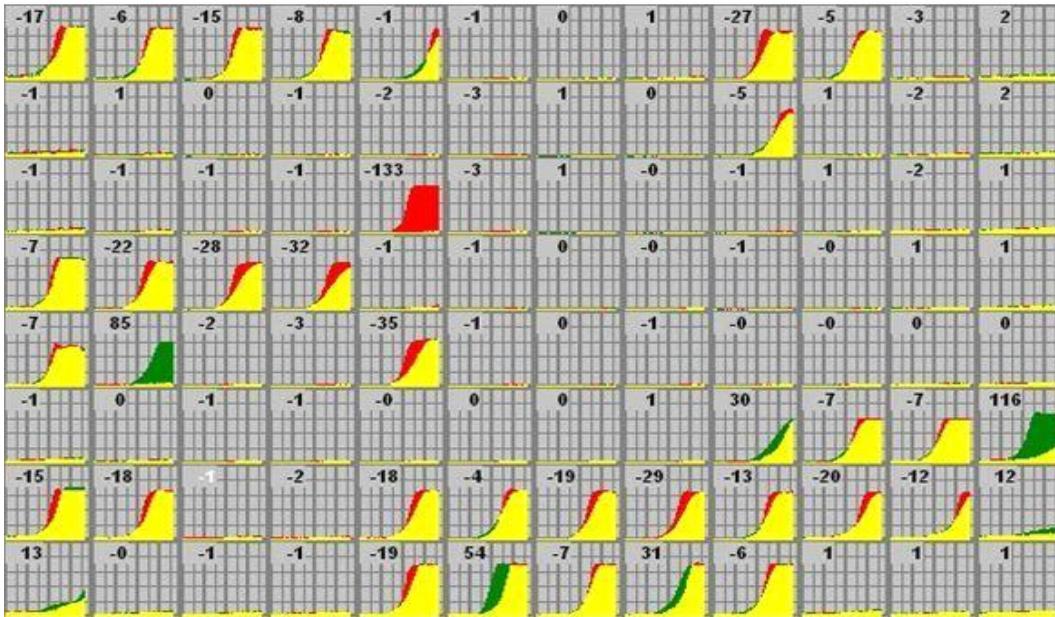
Resultado PM10 (pH)



Clave PM10

A1 pH 3.5	A2 pH 4	A3 pH 4.5	A4 pH 5	A5 pH 5.5	A6 pH 6	A7 pH 7	A8 pH 8	A9 pH 8.5	A10 pH 9	A11 pH 9.5	A12 pH 10
B1 pH 4.5	B2 pH 4.5 + L-Alanine	B3 pH 4.5 + L-Arginine	B4 pH 4.5 + L-Asparagine	B5 pH 4.5 + L-Aspartic Acid	B6 pH 4.5 + L-Glutamic Acid	B7 pH 4.5 + L-Glutamine	B8 pH 4.5 + Glycine	B9 pH 4.5 + L-Histidine	B10 pH 4.5 + L-Isoleucine	B11 pH 4.5 + L-Leucine	B12 pH 4.5 + L-Lysine
C1 pH 4.5 + L-Methionine	C2 pH 4.5 + L-Phenylalanine	C3 pH 4.5 + L-Proline	C4 pH 4.5 + L-Serine	C5 pH 4.5 + L-Threonine	C6 pH 4.5 + L-Tryptophan	C7 pH 4.5 + L-Tyrosine	C8 pH 4.5 + L-Valine	C9 pH 4.5 + Hydroxy- L-Proline	C10 pH 4.5 + L-Omitine	C11 pH 4.5 + L-Homocarginine	C12 pH 4.5 + L-Homoserine
D-1 pH 4.5 + Anthranilic acid	D2 pH 4.5 + L-Norleucine	D3 pH 4.5 + L-Norvaline	D4 pH 4.5 + o-Amino-N- butyric acid	D5 pH 4.5 + o-Amino malonate	D6 pH 4.5 + β-Hydroxy Glutamate	D7 pH 4.5 + γ-Hydroxy Glutamate	D8 pH 4.5 + 5-Hydroxy Lysine	D9 pH 4.5 + 5-Hydroxy Tryptophan	D10 pH 4.5 + D,L-Diamino pimelic acid	D11 pH 4.5 + Trimethyl amine-N-oxide	D12 pH 4.5 + Urea
E1 pH 9.5	E2 pH 9.5 + L-Alanine	E3 pH 9.5 + L-Arginine	E4 pH 9.5 + L-Asparagine	E5 pH 9.5 + L-Aspartic Acid	E6 pH 9.5 + L-Glutamic Acid	E7 pH 9.5 + L-Glutamine	E8 pH 9.5 + Glycine	E9 pH 9.5 + L-Histidine	E10 pH 9.5 + L-Isoleucine	E11 pH 9.5 + L-Leucine	E12 pH 9.5 + L-Lysine
F1 pH 9.5 + L-Methionine	F2 pH 9.5 + L-Phenylalanine	F3 pH 9.5 + L-Proline	F4 pH 9.5 + L-Serine	F5 pH 9.5 + L-Threonine	F6 pH 9.5 + L-Tryptophan	F7 pH 9.5 + L-Tyrosine	F8 pH 9.5 + L-Valine	F9 pH 9.5 + Hydroxy- L-Proline	F10 pH 9.5 + L-Omitine	F11 pH 9.5 + L-Homocarginine	F12 pH 9.5 + L-Homoserine
G1 pH 9.5 + Anthranilic acid	G2 pH 9.5 + L-Norleucine	G3 pH 9.5 + L-Norvaline	G4 pH 9.5 + Agmatine	G5 pH 9.5 + Cadaverine	G6 pH 9.5 + Putrescine	G7 pH 9.5 + Histamine	G8 pH 9.5 + Phenylethylamine	G9 pH 9.5 + Tyramine	G10 pH 9.5 + Tryptamine	G11 pH 9.5 + Trimethyl amine-N-oxide	G12 pH 9.5 + Urea
H1 X-Caprylate	H2 X-o-D- Glucoside	H3 X-β-D- Glucoside	H4 X-o-D- Galactoside	H5 X-β-D- Galactoside	H6 X-o-D- Glucuronide	H7 X-β-D- Glucuronide	H8 X-β-D- Glucosaminide	H9 X-β-D- Galactosaminide	H10 X-o-D- Mannoside	H11 X-P04	H12 X-S04

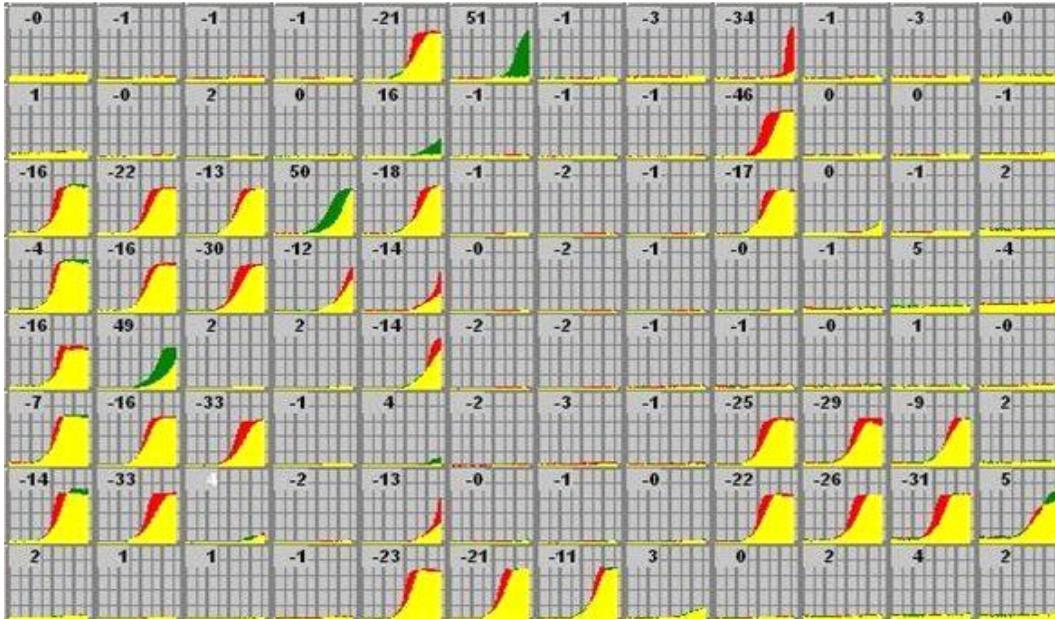
Resultado PM11 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM11

A1 Amikacin	A2 Amikacin	A3 Amikacin	A4 Amikacin	A5 Chlortetracycline	A6 Chlortetracycline	A7 Chlortetracycline	A8 Chlortetracycline	A9 Lincomycin	A10 Lincomycin	A11 Lincomycin	A12 Lincomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Amoxicillin	B2 Amoxicillin	B3 Amoxicillin	B4 Amoxicillin	B5 Cloxacillin	B6 Cloxacillin	B7 Cloxacillin	B8 Cloxacillin	B9 Lomefloxacin	B10 Lomefloxacin	B11 Lomefloxacin	B12 Lomefloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Bleomycin	C2 Bleomycin	C3 Bleomycin	C4 Bleomycin	C5 Colistin	C6 Colistin	C7 Colistin	C8 Colistin	C9 Minocycline	C10 Minocycline	C11 Minocycline	C12 Minocycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Capreomycin	D2 Capreomycin	D3 Capreomycin	D4 Capreomycin	D5 Demeclocycline	D6 Demeclocycline	D7 Demeclocycline	D8 Demeclocycline	D9 Nafcillin	D10 Nafcillin	D11 Nafcillin	D12 Nafcillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefazolin	E2 Cefazolin	E3 Cefazolin	E4 Cefazolin	E5 Enoxacin	E6 Enoxacin	E7 Enoxacin	E8 Enoxacin	E9 Nalidixic acid	E10 Nalidixic acid	E11 Nalidixic acid	E12 Nalidixic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Erythromycin	F6 Erythromycin	F7 Erythromycin	F8 Erythromycin	F9 Neomycin	F10 Neomycin	F11 Neomycin	F12 Neomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Ceftriaxone	G2 Ceftriaxone	G3 Ceftriaxone	G4 Ceftriaxone	G5 Gentamicin	G6 Gentamicin	G7 Gentamicin	G8 Gentamicin	G9 Potassium tellurite	G10 Potassium tellurite	G11 Potassium tellurite	G12 Potassium tellurite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cephalothin	H2 Cephalothin	H3 Cephalothin	H4 Cephalothin	H5 Kanamycin	H6 Kanamycin	H7 Kanamycin	H8 Kanamycin	H9 Ofloxacin	H10 Ofloxacin	H11 Ofloxacin	H12 Ofloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

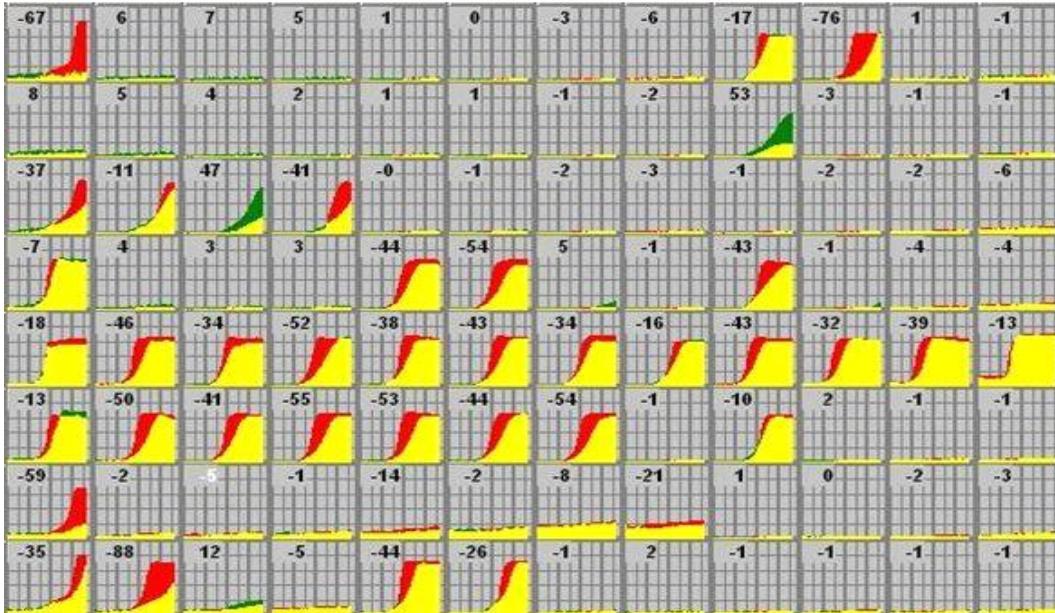
Resultado PM12 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM12

A1 Penicillin G	A2 Penicillin G	A3 Penicillin G	A4 Penicillin G	A5 Tetracycline	A6 Tetracycline	A7 Tetracycline	A8 Tetracycline	A9 Carbenicillin	A10 Carbenicillin	A11 Carbenicillin	A12 Carbenicillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Oxacillin	B2 Oxacillin	B3 Oxacillin	B4 Oxacillin	B5 Penimepicycline	B6 Penimepicycline	B7 Penimepicycline	B8 Penimepicycline	B9 Polymyxin B	B10 Polymyxin B	B11 Polymyxin B	B12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Paromomycin	C2 Paromomycin	C3 Paromomycin	C4 Paromomycin	C5 Vancomycin	C6 Vancomycin	C7 Vancomycin	C8 Vancomycin	C9 D,L-Serine hydroxamate	C10 D,L-Serine hydroxamate	C11 D,L-Serine hydroxamate	C12 D,L-Serine hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sisomicin	D2 Sisomicin	D3 Sisomicin	D4 Sisomicin	D5 Sulfamethazine	D6 Sulfamethazine	D7 Sulfamethazine	D8 Sulfamethazine	D9 Novoblocin	D10 Novoblocin	D11 Novoblocin	D12 Novoblocin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 2,4-Diamino-6,7-diaisopropyl-pteridine	E2 2,4-Diamino-6,7-diaisopropyl-pteridine	E3 2,4-Diamino-6,7-diaisopropyl-pteridine	E4 2,4-Diamino-6,7-diaisopropyl-pteridine	E5 Sulfadiazine	E6 Sulfadiazine	E7 Sulfadiazine	E8 Sulfadiazine	E9 Benzethonium chloride	E10 Benzethonium chloride	E11 Benzethonium chloride	E12 Benzethonium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Tobramycin	F2 Tobramycin	F3 Tobramycin	F4 Tobramycin	F5 Sulfathiazole	F6 Sulfathiazole	F7 Sulfathiazole	F8 Sulfathiazole	F9 S-Fluoroorotic acid	F10 S-Fluoroorotic acid	F11 S-Fluoroorotic acid	F12 S-Fluoroorotic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Spectinomycin	G2 Spectinomycin	G3 Spectinomycin	G4 Spectinomycin	G5 Sulfamethoxazole	G6 Sulfamethoxazole	G7 Sulfamethoxazole	G8 Sulfamethoxazole	G9 L-Aspartic-β-hydroxamate	G10 L-Aspartic-β-hydroxamate	G11 L-Aspartic-β-hydroxamate	G12 L-Aspartic-β-hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Spiramycin	H2 Spiramycin	H3 Spiramycin	H4 Spiramycin	H5 Rifampicin	H6 Rifampicin	H7 Rifampicin	H8 Rifampicin	H9 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H10 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H11 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H12 Dodecyltrimethyl ammonium bromide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

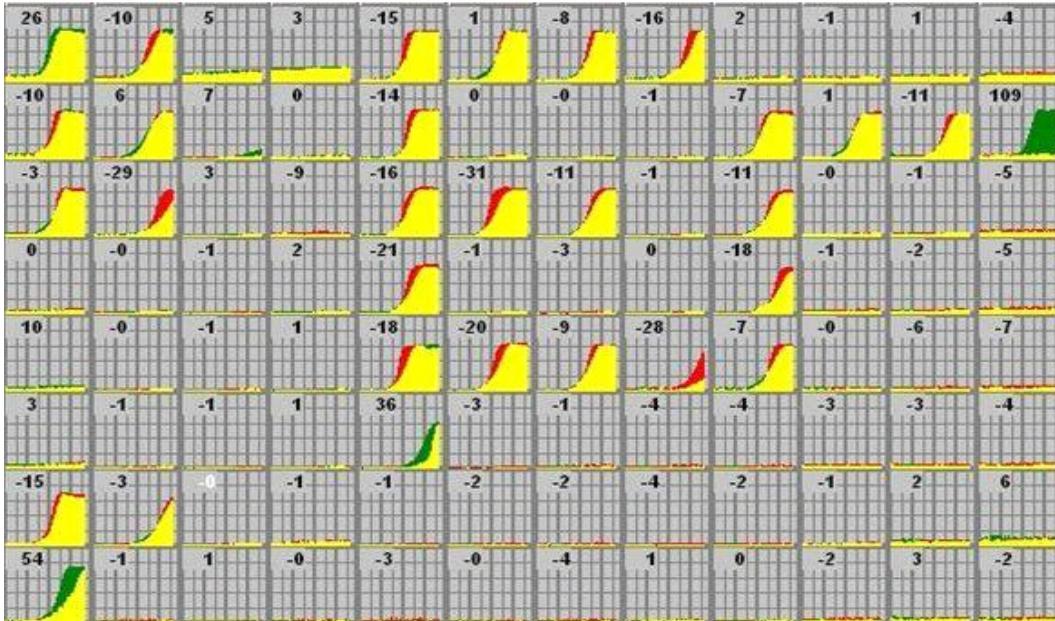
Resultado PM13 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM13

A1 Ampicillin	A2 Ampicillin	A3 Ampicillin	A4 Ampicillin	A5 Dequalinium chloride	A6 Dequalinium chloride	A7 Dequalinium chloride	A8 Dequalinium chloride	A9 Nickel chloride	A10 Nickel chloride	A11 Nickel chloride	A12 Nickel chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Azlocillin	B2 Azlocillin	B3 Azlocillin	B4 Azlocillin	B5 2, 2'-Dipyridyl	B6 2, 2'-Dipyridyl	B7 2, 2'-Dipyridyl	B8 2, 2'-Dipyridyl	B9 Oxolinic acid	B10 Oxolinic acid	B11 Oxolinic acid	B12 Oxolinic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 S-Mercaptopurine	C2 S-Mercaptopurine	C3 S-Mercaptopurine	C4 S-Mercaptopurine	C5 Doxycycline	C6 Doxycycline	C7 Doxycycline	C8 Doxycycline	C9 Potassium chromate	C10 Potassium chromate	C11 Potassium chromate	C12 Potassium chromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cefuroxime	D2 Cefuroxime	D3 Cefuroxime	D4 Cefuroxime	D5 S-Fluorouracil	D6 S-Fluorouracil	D7 S-Fluorouracil	D8 S-Fluorouracil	D9 Rofitetracycline	D10 Rofitetracycline	D11 Rofitetracycline	D12 Rofitetracycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E2 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E3 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E4 Cytosine-1-beta-D-arabino-furanoside	E5 Geneticin (G418)	E6 Geneticin (G418)	E7 Geneticin (G418)	E8 Geneticin (G418)	E9 Ruthenium red	E10 Ruthenium red	E11 Ruthenium red	E12 Ruthenium red
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Caesium chloride	F2 Caesium chloride	F3 Caesium chloride	F4 Caesium chloride	F5 Glycine	F6 Glycine	F7 Glycine	F8 Glycine	F9 Thallium (I) acetate	F10 Thallium (I) acetate	F11 Thallium (I) acetate	F12 Thallium (I) acetate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Cobalt chloride	G2 Cobalt chloride	G3 Cobalt chloride	G4 Cobalt chloride	G5 Manganese chloride	G6 Manganese chloride	G7 Manganese chloride	G8 Manganese chloride	G9 Trifluoperazine	G10 Trifluoperazine	G11 Trifluoperazine	G12 Trifluoperazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cupric chloride	H2 Cupric chloride	H3 Cupric chloride	H4 Cupric chloride	H5 Moxalactam	H6 Moxalactam	H7 Moxalactam	H8 Moxalactam	H9 Tyrosin	H10 Tyrosin	H11 Tyrosin	H12 Tyrosin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

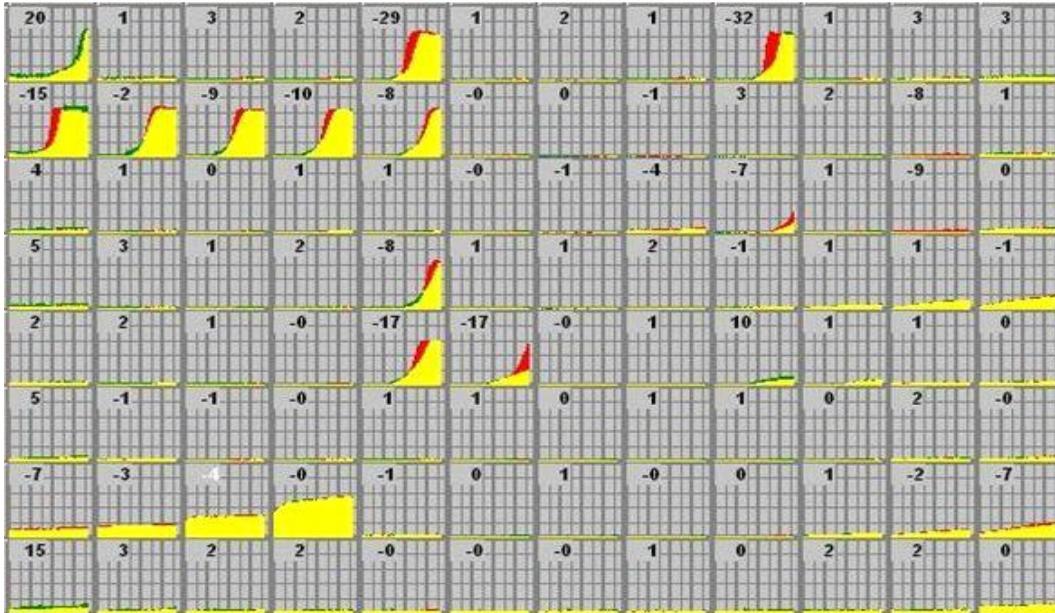
Resultado PM14 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM14

A1 Acriflavine	A2 Acriflavine	A3 Acriflavine	A4 Acriflavine	A5 Furalatadone	A6 Furalatadone	A7 Furalatadone	A8 Furalatadone	A9 Sanguinarine	A10 Sanguinarine	A11 Sanguinarine	A12 Sanguinarine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 S-Aminoacridine	B2 S-Aminoacridine	B3 S-Aminoacridine	B4 S-Aminoacridine	B5 Fusaric acid	B6 Fusaric acid	B7 Fusaric acid	B8 Fusaric acid	B9 Sodium arsenate	B10 Sodium arsenate	B11 Sodium arsenate	B12 Sodium arsenate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Boric Acid	C2 Boric Acid	C3 Boric Acid	C4 Boric Acid	C5 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C6 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C7 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C8 1-Hydroxy-pyridine-2-thione	C9 Sodium cyanate	C10 Sodium cyanate	C11 Sodium cyanate	C12 Sodium cyanate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Cadmium chloride	D2 Cadmium chloride	D3 Cadmium chloride	D4 Cadmium chloride	D5 Iodoacetate	D6 Iodoacetate	D7 Iodoacetate	D8 Iodoacetate	D9 Sodium dichromate	D10 Sodium dichromate	D11 Sodium dichromate	D12 Sodium dichromate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefoxitin	E2 Cefoxitin	E3 Cefoxitin	E4 Cefoxitin	E5 Nitrofurantoin	E6 Nitrofurantoin	E7 Nitrofurantoin	E8 Nitrofurantoin	E9 Sodium metaborate	E10 Sodium metaborate	E11 Sodium metaborate	E12 Sodium metaborate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Piperacillin	F6 Piperacillin	F7 Piperacillin	F8 Piperacillin	F9 Sodium metavanadate	F10 Sodium metavanadate	F11 Sodium metavanadate	F12 Sodium metavanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chelerythrine	G2 Chelerythrine	G3 Chelerythrine	G4 Chelerythrine	G5 Carbenicillin	G6 Carbenicillin	G7 Carbenicillin	G8 Carbenicillin	G9 Sodium nitrite	G10 Sodium nitrite	G11 Sodium nitrite	G12 Sodium nitrite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 EGTA	H2 EGTA	H3 EGTA	H4 EGTA	H5 Promethazine	H6 Promethazine	H7 Promethazine	H8 Promethazine	H9 Sodium orthovanadate	H10 Sodium orthovanadate	H11 Sodium orthovanadate	H12 Sodium orthovanadate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

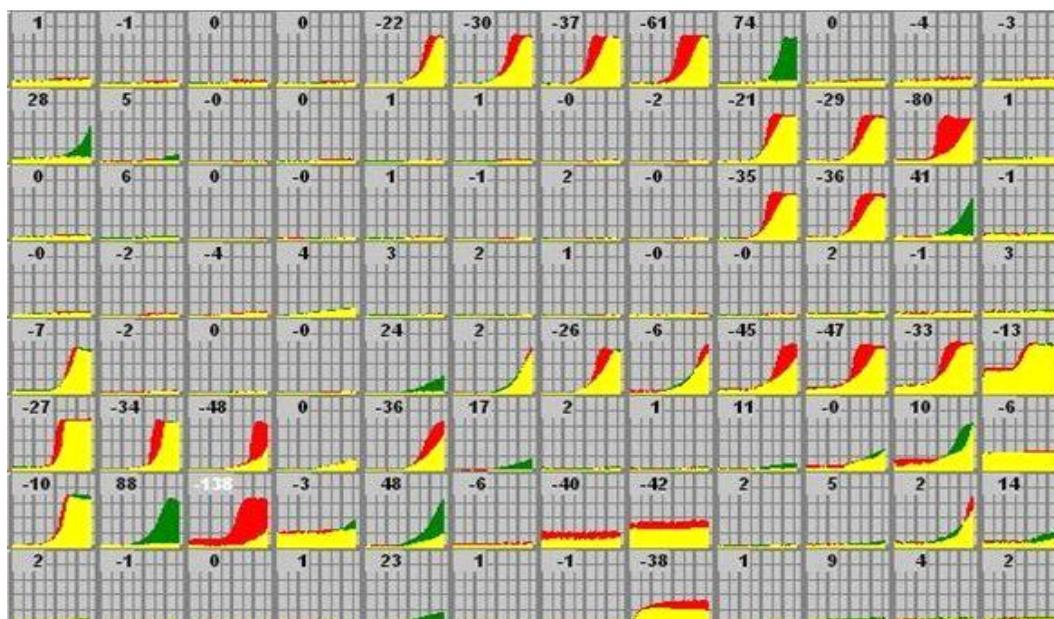
Resultado PM15 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM15

A1 Procaine	A2 Procaine	A3 Procaine	A4 Procaine	A5 Guanidine hydrochloride	A6 Guanidine hydrochloride	A7 Guanidine hydrochloride	A8 Guanidine hydrochloride	A9 Cefmetazole	A10 Cefmetazole	A11 Cefmetazole	A12 Cefmetazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 D-Cycloserine	B2 D-Cycloserine	B3 D-Cycloserine	B4 D-Cycloserine	B5 EDTA	B6 EDTA	B7 EDTA	B8 EDTA	B9 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinidine	B10 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinidine	B11 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinidine	B12 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinidine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	C2 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	C3 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	C4 5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	C5 Fusidic acid	C6 Fusidic acid	C7 Fusidic acid	C8 Fusidic acid	C9 1,10-Phenanthroline	C10 1,10-Phenanthroline	C11 1,10-Phenanthroline	C12 1,10-Phenanthroline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Phleomycin	D2 Phleomycin	D3 Phleomycin	D4 Phleomycin	D5 Domiphen bromide	D6 Domiphen bromide	D7 Domiphen bromide	D8 Domiphen bromide	D9 Nordihydroguaiaretic acid	D10 Nordihydroguaiaretic acid	D11 Nordihydroguaiaretic acid	D12 Nordihydroguaiaretic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Alexidine	E2 Alexidine	E3 Alexidine	E4 Alexidine	E5 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone	E6 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone	E7 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone	E8 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone	E9 Methyl viologen	E10 Methyl viologen	E11 Methyl viologen	E12 Methyl viologen
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	F2 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	F3 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	F4 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	F5 Oleandomycin	F6 Oleandomycin	F7 Oleandomycin	F8 Oleandomycin	F9 Puromycin	F10 Puromycin	F11 Puromycin	F12 Puromycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 CCCP	G2 CCCP	G3 CCCP	G4 CCCP	G5 Sodium azide	G6 Sodium azide	G7 Sodium azide	G8 Sodium azide	G9 Menadione	G10 Menadione	G11 Menadione	G12 Menadione
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 2-Nitroimidazole	H2 2-Nitroimidazole	H3 2-Nitroimidazole	H4 2-Nitroimidazole	H5 Hydroxyurea	H6 Hydroxyurea	H7 Hydroxyurea	H8 Hydroxyurea	H9 Zinc chloride	H10 Zinc chloride	H11 Zinc chloride	H12 Zinc chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

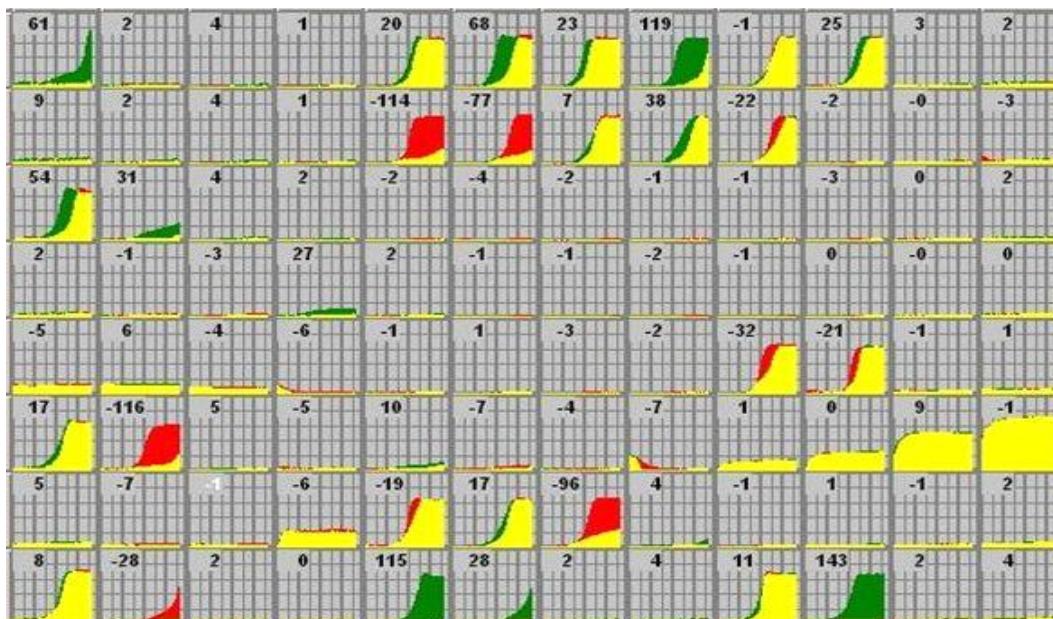
Resultado PM16 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM16

A1 Cefotaxime	A2 Cefotaxime	A3 Cefotaxime	A4 Cefotaxime	A5 Phosphomycin	A6 Phosphomycin	A7 Phosphomycin	A8 Phosphomycin	A9 5-Chloro-7-Iodo-8-hydroxy-quinoline	A10 5-Chloro-7-Iodo-8-hydroxy-quinoline	A11 5-Chloro-7-Iodo-8-hydroxy-quinoline	A12 5-Chloro-7-Iodo-8-hydroxy-quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Norfloxacin	B2 Norfloxacin	B3 Norfloxacin	B4 Norfloxacin	B5 Sulfanilamide	B6 Sulfanilamide	B7 Sulfanilamide	B8 Sulfanilamide	B9 Trimethoprim	B10 Trimethoprim	B11 Trimethoprim	B12 Trimethoprim
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Dichlofluamid	C2 Dichlofluamid	C3 Dichlofluamid	C4 Dichlofluamid	C5 Prolamine sulfata	C6 Prolamine sulfata	C7 Prolamine sulfata	C8 Prolamine sulfata	C9 Cetylpyridinium chloride	C10 Cetylpyridinium chloride	C11 Cetylpyridinium chloride	C12 Cetylpyridinium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 1-Chloro -2,4-dinitrobenzene	D2 1-Chloro -2,4-dinitrobenzene	D3 1-Chloro -2,4-dinitrobenzene	D4 1-Chloro -2,4-dinitrobenzene	D5 Diamide	D6 Diamide	D7 Diamide	D8 Diamide	D9 Cinoxacin	D10 Cinoxacin	D11 Cinoxacin	D12 Cinoxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Streptomycin	E2 Streptomycin	E3 Streptomycin	E4 Streptomycin	E5 S-Azacytidine	E6 S-Azacytidine	E7 S-Azacytidine	E8 S-Azacytidine	E9 Rifamycin SV	E10 Rifamycin SV	E11 Rifamycin SV	E12 Rifamycin SV
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Potasium tellurita	F2 Potasium tellurita	F3 Potasium tellurita	F4 Potasium tellurita	F5 Sodium selenite	F6 Sodium selenite	F7 Sodium selenite	F8 Sodium selenite	F9 Aluminum sulfata	F10 Aluminum sulfata	F11 Aluminum sulfata	F12 Aluminum sulfata
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chromium chloride	G2 Chromium chloride	G3 Chromium chloride	G4 Chromium chloride	G5 Ferric chloride	G6 Ferric chloride	G7 Ferric chloride	G8 Ferric chloride	G9 L-Glutamic-g-hydroxamate	G10 L-Glutamic-g-hydroxamate	G11 L-Glutamic-g-hydroxamate	G12 L-Glutamic-g-hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Glycine hydroxamate	H2 Glycine hydroxamate	H3 Glycine hydroxamate	H4 Glycine hydroxamate	H5 Chloroxyfenol	H6 Chloroxyfenol	H7 Chloroxyfenol	H8 Chloroxyfenol	H9 Sorbic acid	H10 Sorbic acid	H11 Sorbic acid	H12 Sorbic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

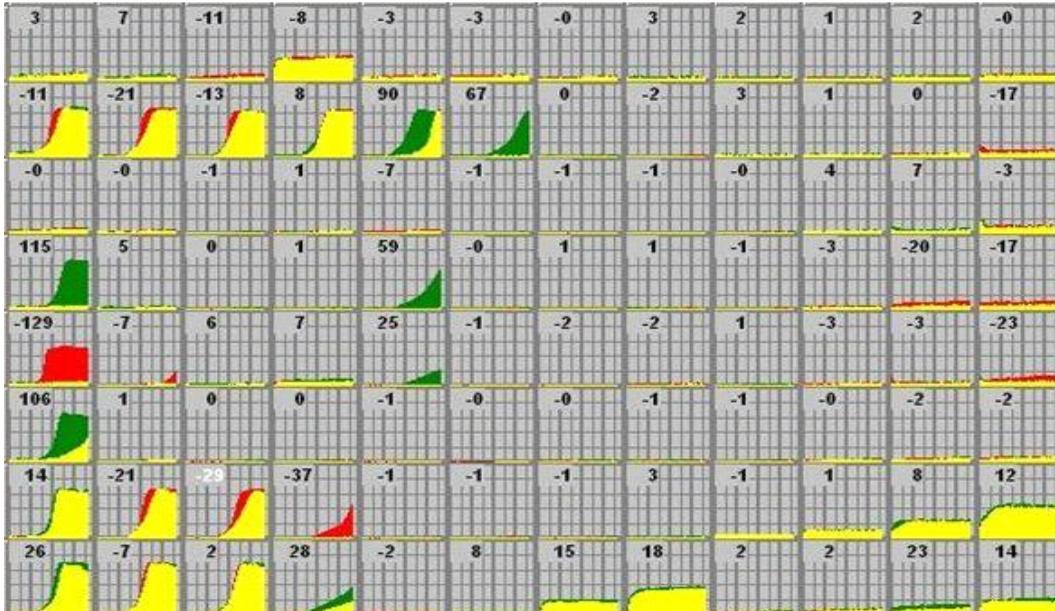
Resultado PM17 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM17

A1 D-Serine	A2 D-Serine	A3 D-Serine	A4 D-Serine	A5 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A6 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A7 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A8 β-Chloro-L-alanine hydrochloride	A9 Thiosalicylic acid	A10 Thiosalicylic acid	A11 Thiosalicylic acid	A12 Thiosalicylic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Sodium salicylate	B2 Sodium salicylate	B3 Sodium salicylate	B4 Sodium salicylate	B5 Hygromycin B	B6 Hygromycin B	B7 Hygromycin B	B8 Hygromycin B	B9 Ethionamide	B10 Ethionamide	B11 Ethionamide	B12 Ethionamide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 4-Aminopyridine	C2 4-Aminopyridine	C3 4-Aminopyridine	C4 4-Aminopyridine	C5 Sulfachloropyridazine	C6 Sulfachloropyridazine	C7 Sulfachloropyridazine	C8 Sulfachloropyridazine	C9 Sulfamonomethoxine	C10 Sulfamonomethoxine	C11 Sulfamonomethoxine	C12 Sulfamonomethoxine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Oxycarboxin	D2 Oxycarboxin	D3 Oxycarboxin	D4 Oxycarboxin	D5 3-Amino-1,2,4-triazole	D6 3-Amino-1,2,4-triazole	D7 3-Amino-1,2,4-triazole	D8 3-Amino-1,2,4-triazole	D9 Chlorpromazine	D10 Chlorpromazine	D11 Chlorpromazine	D12 Chlorpromazine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Niaproof	E2 Niaproof	E3 Niaproof	E4 Niaproof	E5 Compound 48/80	E6 Compound 48/80	E7 Compound 48/80	E8 Compound 48/80	E9 Sodium tungstate	E10 Sodium tungstate	E11 Sodium tungstate	E12 Sodium tungstate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Lithium chloride	F2 Lithium chloride	F3 Lithium chloride	F4 Lithium chloride	F5 DL-Methionine hydroxamate	F6 DL-Methionine hydroxamate	F7 DL-Methionine hydroxamate	F8 DL-Methionine hydroxamate	F9 Tannic acid	F10 Tannic acid	F11 Tannic acid	F12 Tannic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Chlorambucil	G2 Chlorambucil	G3 Chlorambucil	G4 Chlorambucil	G5 Cefamandole nafate	G6 Cefamandole nafate	G7 Cefamandole nafate	G8 Cefamandole nafate	G9 Cefoperazone	G10 Cefoperazone	G11 Cefoperazone	G12 Cefoperazone
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cefsulodin	H2 Cefsulodin	H3 Cefsulodin	H4 Cefsulodin	H5 Caffeine	H6 Caffeine	H7 Caffeine	H8 Caffeine	H9 Phenylarsine oxide	H10 Phenylarsine oxide	H11 Phenylarsine oxide	H12 Phenylarsine oxide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

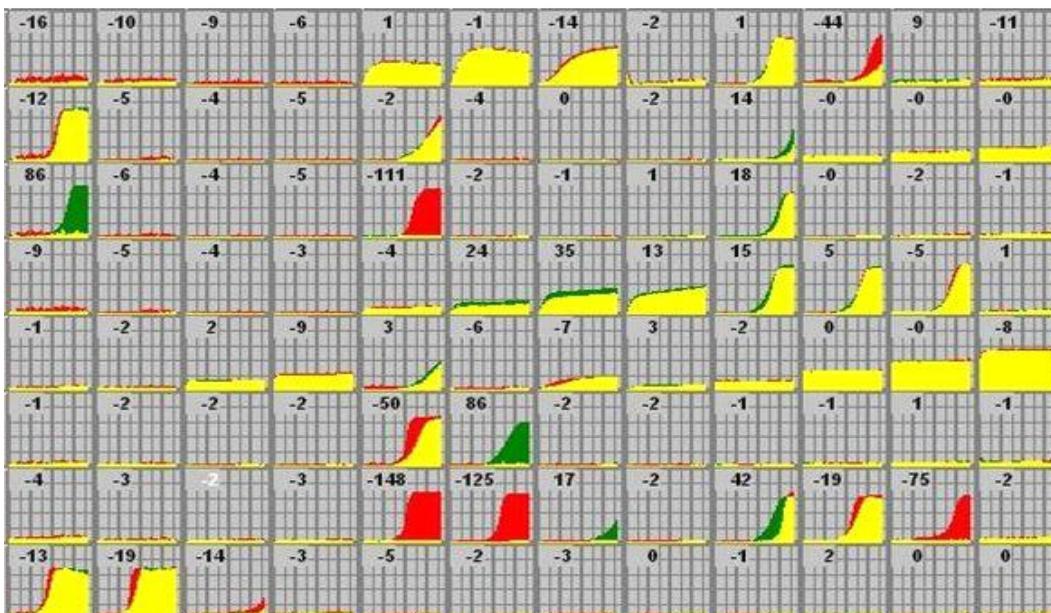
Resultado PM18 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM18

A1 Ketoprofen	A2 Ketoprofen	A3 Ketoprofen	A4 Ketoprofen	A5 Sodium pyrophosphate dodecahydrate	A6 Sodium pyrophosphate dodecahydrate	A7 Sodium pyrophosphate dodecahydrate	A8 Sodium pyrophosphate dodecahydrate	A9 Thiamphenicol	A10 Thiamphenicol	A11 Thiamphenicol	A12 Thiamphenicol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Trifluorothymidine	B2 Trifluorothymidine	B3 Trifluorothymidine	B4 Trifluorothymidine	B5 Pipemidic Acid	B6 Pipemidic Acid	B7 Pipemidic Acid	B8 Pipemidic Acid	B9 Azathioprine	B10 Azathioprine	B11 Azathioprine	B12 Azathioprine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Poly-L-lysine	C2 Poly-L-lysine	C3 Poly-L-lysine	C4 Poly-L-lysine	C5 Sulfisoxazole	C6 Sulfisoxazole	C7 Sulfisoxazole	C8 Sulfisoxazole	C9 Pentachlorophenol	C10 Pentachlorophenol	C11 Pentachlorophenol	C12 Pentachlorophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sodium m-arsenite	D2 Sodium m-arsenite	D3 Sodium m-arsenite	D4 Sodium m-arsenite	D5 Sodium bromate	D6 Sodium bromate	D7 Sodium bromate	D8 Sodium bromate	D9 Lidocaine	D10 Lidocaine	D11 Lidocaine	D12 Lidocaine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Sodium metasilicate	E2 Sodium metasilicate	E3 Sodium metasilicate	E4 Sodium metasilicate	E5 Sodium m-periodate	E6 Sodium m-periodate	E7 Sodium m-periodate	E8 Sodium m-periodate	E9 Antimony (III) chloride	E10 Antimony (III) chloride	E11 Antimony (III) chloride	E12 Antimony (III) chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Semicarbazide	F2 Semicarbazide	F3 Semicarbazide	F4 Semicarbazide	F5 Tinidazole	F6 Tinidazole	F7 Tinidazole	F8 Tinidazole	F9 Aztreonam	F10 Aztreonam	F11 Aztreonam	F12 Aztreonam
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Triclosan	G2 Triclosan	G3 Triclosan	G4 Triclosan	G5 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole)	G6 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole)	G7 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole)	G8 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole)	G9 Myrtoetin	G10 Myrtoetin	G11 Myrtoetin	G12 Myrtoetin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 5-fluoro-5'-deoxyuridine	H2 5-fluoro-5'-deoxyuridine	H3 5-fluoro-5'-deoxyuridine	H4 5-fluoro-5'-deoxyuridine	H5 2-Phenylphenol	H6 2-Phenylphenol	H7 2-Phenylphenol	H8 2-Phenylphenol	H9 Plumbagin	H10 Plumbagin	H11 Plumbagin	H12 Plumbagin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

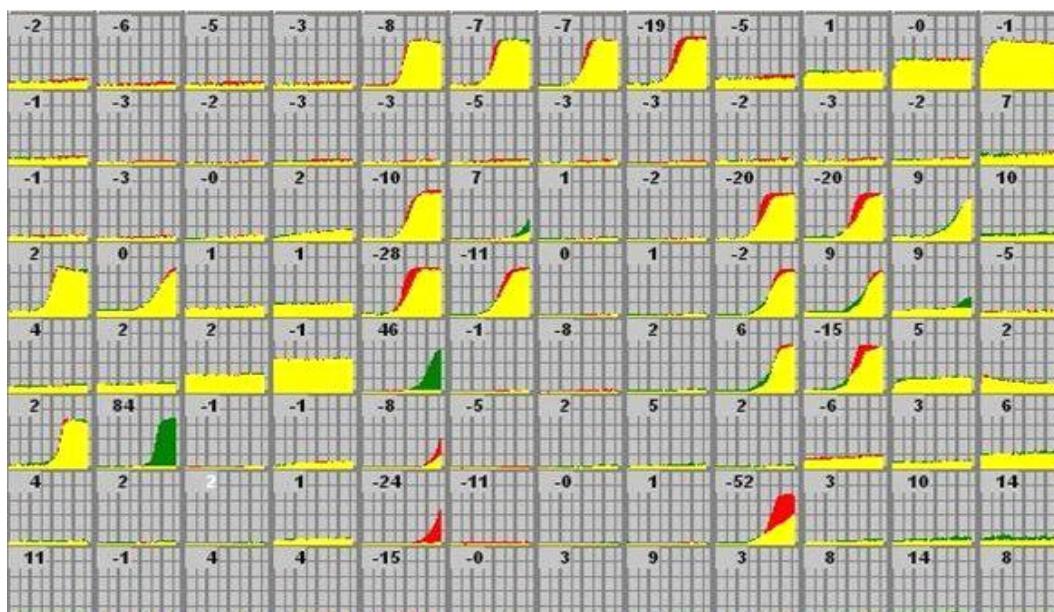
Resultado PM19 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM19

A1 Josamycin	A2 Josamycin	A3 Josamycin	A4 Josamycin	A5 Gallic acid	A6 Gallic acid	A7 Gallic acid	A8 Gallic acid	A9 Coumarin	A10 Coumarin	A11 Coumarin	A12 Coumarin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Methylthioctylammonium chloride	B2 Methylthioctylammonium chloride	B3 Methylthioctylammonium chloride	B4 Methylthioctylammonium chloride	B5 Harmane	B6 Harmane	B7 Harmane	B8 Harmane	B9 2,4-Dinitrophenol	B10 2,4-Dinitrophenol	B11 2,4-Dinitrophenol	B12 2,4-Dinitrophenol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Chlorhexidine	C2 Chlorhexidine	C3 Chlorhexidine	C4 Chlorhexidine	C5 Umbelliferone	C6 Umbelliferone	C7 Umbelliferone	C8 Umbelliferone	C9 Cinnamic acid	C10 Cinnamic acid	C11 Cinnamic acid	C12 Cinnamic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Disulphiram	D2 Disulphiram	D3 Disulphiram	D4 Disulphiram	D5 Iodonitro Tetrazolium Violet	D6 Iodonitro Tetrazolium Violet	D7 Iodonitro Tetrazolium Violet	D8 Iodonitro Tetrazolium Violet	D9 Phenyl- methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)	D10 Phenyl- methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)	D11 Phenyl- methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)	D12 Phenyl- methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 FCCP	E2 FCCP	E3 FCCP	E4 FCCP	E5 D,L-Thioctic Acid	E6 D,L-Thioctic Acid	E7 D,L-Thioctic Acid	E8 D,L-Thioctic Acid	E9 Lawsone	E10 Lawsone	E11 Lawsone	E12 Lawsone
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Phenethicillin	F2 Phenethicillin	F3 Phenethicillin	F4 Phenethicillin	F5 Blastocidin S	F6 Blastocidin S	F7 Blastocidin S	F8 Blastocidin S	F9 Sodium caprylate	F10 Sodium caprylate	F11 Sodium caprylate	F12 Sodium caprylate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Lauryl sulfobetaine	G2 Lauryl sulfobetaine	G3 Lauryl sulfobetaine	G4 Lauryl sulfobetaine	G5 Dihydro-streptomycin	G6 Dihydro-streptomycin	G7 Dihydro-streptomycin	G8 Dihydro-streptomycin	G9 Hydroxylamine	G10 Hydroxylamine	G11 Hydroxylamine	G12 Hydroxylamine
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Hexamine cobalt (III) chloride	H2 Hexamine cobalt (III) chloride	H3 Hexamine cobalt (III) chloride	H4 Hexamine cobalt (III) chloride	H5 Thioglycerol	H6 Thioglycerol	H7 Thioglycerol	H8 Thioglycerol	H9 Polymyxin B	H10 Polymyxin B	H11 Polymyxin B	H12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Resultado PM20 (Sensibilidad a compuestos químicos)



Clave PM20

A1 Amiriptryline	A2 Amiriptryline	A3 Amiriptryline	A4 Amiriptryline	A5 Apramycin	A6 Apramycin	A7 Apramycin	A8 Apramycin	A9 Benserazide	A10 Benserazide	A11 Benserazide	A12 Benserazide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Orphenadrine	B2 Orphenadrine	B3 Orphenadrine	B4 Orphenadrine	B5 D,L-Propranolol	B6 D,L-Propranolol	B7 D,L-Propranolol	B8 D,L-Propranolol	B9 Tetrazolium violet	B10 Tetrazolium violet	B11 Tetrazolium violet	B12 Tetrazolium violet
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Thioridazine	C2 Thioridazine	C3 Thioridazine	C4 Thioridazine	C5 Atropine	C6 Atropine	C7 Atropine	C8 Atropine	C9 Ornidazole	C10 Ornidazole	C11 Ornidazole	C12 Ornidazole
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Proflavine	D2 Proflavine	D3 Proflavine	D4 Proflavine	D5 Ciprofloxacin	D6 Ciprofloxacin	D7 Ciprofloxacin	D8 Ciprofloxacin	D9 18-Crown-6 ether	D10 18-Crown-6 ether	D11 18-Crown-6 ether	D12 18-Crown-6 ether
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Crystal violet	E2 Crystal violet	E3 Crystal violet	E4 Crystal violet	E5 Dodine	E6 Dodine	E7 Dodine	E8 Dodine	E9 Hexa-chlorophene	E10 Hexa-chlorophene	E11 Hexa-chlorophene	E12 Hexa-chlorophene
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 4-Hydroxy-coumarin	F2 4-Hydroxy-coumarin	F3 4-Hydroxy-coumarin	F4 4-Hydroxy-coumarin	F5 Oxytetracycline	F6 Oxytetracycline	F7 Oxytetracycline	F8 Oxytetracycline	F9 Pridinol	F10 Pridinol	F11 Pridinol	F12 Pridinol
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Captan	G2 Captan	G3 Captan	G4 Captan	G5 3,5-Dinitro-benzene	G6 3,5-Dinitro-benzene	G7 3,5-Dinitro-benzene	G8 3,5-Dinitro-benzene	G9 8-Hydroxy-quinoline	G10 8-Hydroxy-quinoline	G11 8-Hydroxy-quinoline	G12 8-Hydroxy-quinoline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Patulin	H2 Patulin	H3 Patulin	H4 Patulin	H5 Tolyfluamid	H6 Tolyfluamid	H7 Tolyfluamid	H8 Tolyfluamid	H9 Troleandomycin	H10 Troleandomycin	H11 Troleandomycin	H12 Troleandomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Figura S1. Resultados y claves de la comparación del microarray fenotípico (PM01-PM20) de la cepa mutante FP35^{hanI} y la cepa silvestre FP35^T de *H. anticariensis*.

Capítulo IV.

Detección de sistemas quorum sensing en la familia

Halomonadaceae

RESUMEN

El análisis de la producción de moléculas señal de los sistemas quorum sensing (QS) en una colección de 42 especies pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* indicó que todas ellas producían *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs) lo que sugiere que el sistema QS está ampliamente distribuido en este grupo taxonómico. El análisis de los extractos de AHLs mediante cromatografía en capa fina (TLC) mostró diferentes patrones de moléculas mediante el uso de la cepa biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) lo que indicó la diversidad en la producción de moléculas AHLs que no parece depender del hábitat de aislamiento. Para confirmar la producción de AHLs se estudió la distribución del gen sintasa en las especies analizadas mediante PCR y secuenciación. Posteriormente se hizo un análisis filogenético con los datos de las secuencias obtenidas. Los resultados pusieron de manifiesto que la mayoría de las especies de la familia *Halomonadaceae* poseían el gen sintasa y al realizar un análisis filogenético basado en la secuencia de este gen, estas bacterias quedaban agrupadas en un mismo cluster, claramente separado de otras especies de la clase *Gammaproteobacteria* y por supuesto de la clase *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*.

ABSTRACT

An analysis of the production of quorum-sensing (QS) signal molecules in 42 species belonging to the *Halomonadaceae* family revealed that all of them produced *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), which suggests that the QS system is widespread throughout this group of bacteria. Thin-layer chromatography analysis of crude AHL extracts, using *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) as biosensor strain, resulted in different profiles, thus indicating that the diversity of AHL production would seem to have little to do with the habitat of the species. To confirm AHL production we studied the distribution of the synthase gene in the species in question by PCR and sequencing followed by a phylogenetic analysis undertaken on the basis of the the sequence data. The results showed that most species belonging to the *Halomonadaceae* family bear the autoinducer synthase gene. Phylogenetic analysis showed that all the sequences from this group of bacteria grouped together to form a cluster within the *Gammaproteobacteria* class, clearly separate from other species in this class and obviously so from species belonging to the *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*.

La familia *Halomonadaceae* fue creada en 1988 para englobar los géneros *Deleya* y *Halomonas* (Franzmann y col., 1988). Esta familia pertenece al orden *Oceanospirillales* y a la clase *Gammaproteobacteria* (Garrity y col., 2005). Este grupo de bacterias es uno de los tipos taxonómicos más abundantes de bacterias cultivables en los suelos salinos. Hoy en día esta familia agrupa más de 100 especies clasificadas en una decena de géneros (*Aidingimonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas*, *Halotalea*, *Kushneria*, *Modicisalibacter*, *Salinicola* y *Zymbacter*), de entre los cuales, el más representativo es el género *Halomonas*. En la actualidad *Halomonas* contiene más de 70 especies (www.bacterio.cict.fr), muchas de las cuales han sido descritas por nuestro grupo de investigación (Euzéby, 2012). Las especies de *Halomonas* son bacilos Gram negativos aerobios, quimioheterótrofos y muy versátiles desde el punto de vista ecológico, fisiológico y metabólico, al menos en el laboratorio. La mayoría de los representantes de la familia *Halomonadaceae* son halófilos moderados, aunque también existen algunos halófilos débiles y halotolerantes.

En este capítulo se pretende por un lado detectar y estudiar la diversidad de las moléculas señal tipo AHL y por otro lado determinar la distribución del gen sintasa responsable de la producción de autoinductores en las bacterias halófilas particularmente en miembros de la familia *Halomonadaceae*.

RESULTADOS

1. Detección de moléculas señal QS en especies de la familia *Halomonadaceae*

Un total de 42 especies pertenecientes a siete géneros de la familia *Halomonadaceae* (*Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas*, *Halotalea*, *Kushneria*, *Modicisalibacter* y *Salinicola*) fueron ensayadas para la detección de moléculas señal tipo AHL (véase Tabla 6 en el apartado de Material y Métodos). En la Tabla 20 se muestran los hábitats de los que se aislaron las especies estudiadas incluyéndose suelos salinos, ambientes marinos, lagos salinos templados y antárticos, alimentos salados, aguas saladas de yacimientos petrolíficos, etc.

Debido a los altos requerimientos salinos de las bacterias halófilas no pudimos utilizar un ensayo en placa para la detección de autoinductores ya que requiere el crecimiento de las bacterias biosensoras junto a las bacterias halófilas en un mismo medio de cultivo en condiciones óptimas. Para paliar este problema decidimos extraer las moléculas señal de todas las cepas halófilas según la metodología descrita en el apartado 2.1 de Material y Métodos. A continuación mediante un ensayo de difusión en placas de agar empleando los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) determinamos la presencia o

ausencia de las AHLs en los extractos obtenidos. La cepa *Halomonas anticariensis* FP35^T se utilizó como control positivo.

Los resultados se muestran en la Tabla 20. Todos los extractos de moléculas señal analizados fueron capaces de inducir una respuesta en el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) mientras que en el biosensor *C. violaceum* CV026 todas las cepas dieron una respuesta negativa a excepción de la cepa *Halomonas rifensis* HK31^T. En un principio, estos resultados sugieren que la mayoría de las cepas ensayadas son capaces de producir autoinductores.

Tabla 20. Activación de las cepas biosensoras por las especies de la familia *Halomonadaceae*.

Especies bacterianas	Origen	CV026	NTL4
<i>Chromohalobacter</i>			
1. <i>Chr. salexigens</i> DSM3043 ^T	Salinas solares (Holanda)	-	+
<i>Cobetia</i>			
2. <i>Cob. marina</i> DSM4741 ^T	Agua de mar (EE. UU.)	-	+
<i>Halomonas</i>			
3. <i>H. alimentaria</i> YKJ-16 ^T	Jeotgal (comida tradicional coreana fermentada)	-	+
4. <i>H. almeriensis</i> M8 ^T	Salina solar (España)	-	+
5. <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	Suelo salino (España)	+	+
6. <i>H. aquamarina</i> DSM 30161 ^T	Océano Pacífico	-	+
7. <i>H. campaniensis</i> 5AG ^T	Estanque de agua mineral (Italia)	-	+
8. <i>H. cerina</i> SP4 ^T	Suelo salino (España)	-	+
9. <i>H. denitrificans</i> M29 ^T	Agua salina (Corea)	-	+
10. <i>H. desiderata</i> FB2 ^T	Aguas residuales municipales (Alemania)	-	+
11. <i>H. elongata</i> ATCC 33173 ^T	Salinas solares (Holanda)	-	+
12. <i>H. eurihalina</i> ATCC 49336 ^T	Hábitats hipersalinos (Lagunas y suelos salinos) y agua de mar (España y Chile)	-	+
13. <i>H. fontilapidosi</i> 5CR ^T	Laguna salina (España)	-	+
14. <i>H. gudaonensis</i> SL014B-69 ^T	Suelo salino contaminado con crudo de petróleo (China)	-	+
15. <i>H. halmophila</i> ATCC 19717 ^T	Mar Muerto	-	+

16. <i>H. halodenitrificans</i> DSM 5160 ^T	Carne en salmuera	-	+
17. <i>H. halodurans</i> DSM 5160 ^T	Agua de estuario (EE. UU.)	-	+
18. <i>H. koreensis</i> SS20 ^T	Salina solar (Corea)	-	+
19. <i>H. magadiensis</i> 21 MI ^T	Sedimentos litorales de lagos salinos y alcalinos de África oriental	-	+
20. <i>H. maura</i> S-31 ^T	Salina solar (Marruecos)	-	+
21. <i>H. meridiana</i> DSM 5425 ^T	Lagos salinos antárticos	-	+
22. <i>H. mongoliensis</i> Z-7009 ^T	Sedimentos de un lago salino y alcalino de Mongolia	-	+
23. <i>H. nitroreducens</i> 11S ^T	Salina solar (Chile)	-	+
24. <i>H. organivorans</i> G-16.1 ^T	Suelos salinos (España)	-	+
25. <i>H. pacifica</i> DSM 4742 ^T	Océano Pacífico	-	+
26. <i>H. pantelleriensis</i> AAP ^T	Arena de la Isla Pantelleria (Italia)	-	+
27. <i>H. ramblicola</i> RS-16 ^T	Suelos salinos (España)	-	+
28. <i>H. rifensis</i> HK31 ^T	Salina solar (Marruecos)	+	+
29. <i>H. saccharevitans</i> AJ275 ^T	Ambiente hipersalino (Chile)	-	+
30. <i>H. salina</i> F8-11 ^T	Suelos hipersalinos, estanques y lagos salados, agua de mar (España)	-	+
31. <i>H. shengliensis</i> SL014B-85 ^T	Suelo salino contaminado con crudo de petróleo (China)	-	+
32. <i>H. stenophila</i> N12 ^T	Suelos salinos	-	+
33. <i>H. subglaciescola</i> DSM 4683 ^T	Lago salino antártico (Lago orgánico).	-	+
34. <i>H. variabilis</i> DSM 3051 ^T	Brazo norte del Gran Lago Salado (EE. UU.)	-	+
35. <i>H. ventosae</i> AI12 ^T	Suelos salinos (España)	-	+
<i>Halotalea</i>			
36. <i>Halot. alkalilenta</i> AW-7 ^T	Desecho alcalino de aceituna molida (alpeorujo)	-	+
<i>Kushneria</i>			
37. <i>K. avicanniae</i> MW2a ^T	Hoja de <i>Avicennia germnans</i> (Puerto rico)	-	+
38. <i>K. indalinina</i> CG2.1 ^T	Salina solar (España)	-	+
39. <i>K. marisflavi</i> SW3a ^T	Agua de mar (Corea)	-	+

Modicisalibacter

40. <i>M. tunisiensis</i> LIT2 ^T	Inyección de agua en yacimientos petrolíferos (Túnez)	-	+
---	---	---	---

Salinicola

41. <i>S. halophilus</i> CG4.1 ^T	Salina solar (España)	-	+
42. <i>S. salaria</i> M27 ^T	Agua salina (Corea)	-	+

2. Caracterización de las moléculas señal producidas por las especies de la familia *Halomonadaceae*

La producción de autoinductores en las especies de la familia *Halomonadaceae* fue confirmada mediante TLC empleando para el revelado la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Esta cepa fue elegida en base a su capacidad de responder a una amplia gama de moléculas señal AHLs (Véase Tabla 8 en el apartado de Material y Métodos). El análisis de los patrones obtenidos mediante TLC mostraron que la mayoría de las cepas producían de una a tres manchas de diferentes intensidades; la cepa *Halomonas rifensis* HK31^T presentó un patrón de AHLs similar al de la cepa *H. anticariensis* FP35^T (Figura 60).

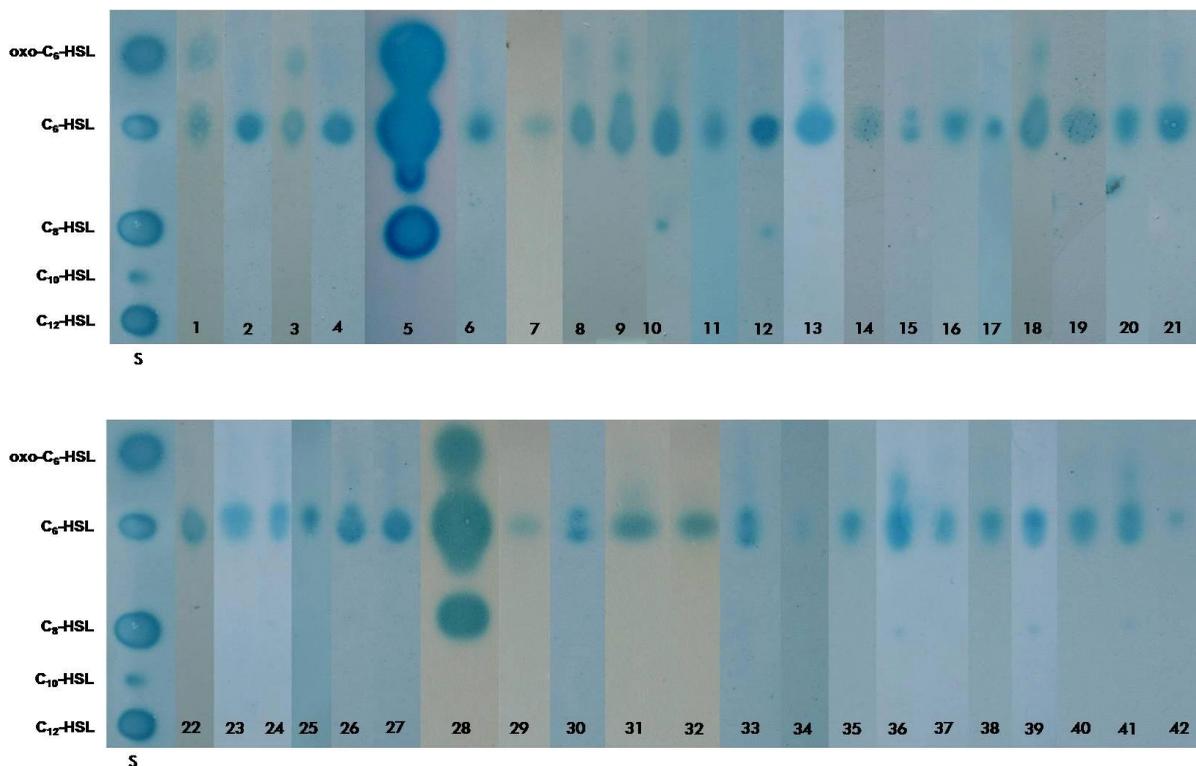


Figura 60. Análisis TLC de las AHLs producidas por las 42 especies de la familia *Halomonadaceae*. Carril 1, *Chromohalobacter salexigens* DSM3043^T; Carril 2, *Cobetia marina* DSM4741^T; carril 3, *Halomonas alimentaria*

YKJ-16^T; carril 4, *H. almeriensis* M8^T; carril 5, *H. anticariensis* FP35^T; carril 6, *H. aquamarina* DSM 30161^T; carril 7, *H. campaniensis* 5AG^T; carril 8, *H. cerina* SP4^T; carril 9, *H. denitrificans* M29^T; carril 10, *H. desiderata* FB2^T; carril 11, *H. elongata* ATCC 33173^T; carril 12, *H. eurihalina* ATCC 49336^T; carril 13, *H. fontilapidosi* 5CR^T; carril 14, *H. gudaonensis* SL014B-69^T; carril 15, *H. halmophila* ATCC 19717^T; carril 16, *H. halodenitrificans* ATCC 13511^T; carril 17, *H. halodurans* DSM 5160^T; carril 18, *H. koreensis* SS20^T; carril 19, *H. magadiensis* 21 MI^T; carril 20, *H. maura* S-31^T; carril 21, *H. meridiana* DSM 5425^T; carril 22, *H. mongoliensis* Z-7009^T; carril 23, *H. nitroreducens* 11S^T; carril 24, *H. organivorans* G-16.1^T; Carril 25, *H. pacifica* DSM 4742^T; carril 26, *H. pantelleriensis* AAP^T; carril 27, *H. ramblicola* RS-16^T; carril 28, *H. rifensis* HK31^T; carril 29, *H. saccharevitans* AJ275^T; carril 30, *H. salina* F8-111^T; carril 31, *H. shengliensis* SL014B-85^T; carril 32, *H. stenophila* N12^T; carril 33, *H. subglaciescola* DSM 4683^T; carril 34, *H. variabilis* DSM 3051^T; carril 35, *H. ventosae* Al12^T; carril 36, *Halotalea alkalilenta* AW-7^T; carril 37, *Kushneria avicenniae* MW2a^T; carril 38, *K. indalinina* CG2.1^T; carril 39, *K. marisflavi* SW3a^T; carril 40, *Modicisalibacter tunisiensis* LIT2^T; carril 41, *Salinicola halophilus* CG4.1^T; carril 42, *S. salarius* M27^T. Carril S; AHLs comerciales que se utilizaron como referencia: oxo-C₆-HSL (4,7pmol), C₆-HSL (804pmol), C₈-HSL (31,6pmol), C₁₀-HSL (2nmol), C₁₂-HSL (4.8nmol).

La Tabla 21 muestra un resumen de las AHLs detectadas según su migración en la placa TLC (Figura 60). Todas las especies de la familia *Halomonadaceae* producen la molécula señal C₆-HSL.

Tabla 21. Caracterización de AHLs en los miembros de la familia *Halomonadaceae* mediante TLC empleando el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

Cepas productoras	Número de manchas	Identificación de las AHLs en función de su migración en la TLC
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM3043 ^T	2-3	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>Cobetia marina</i> DSM4741 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 ^T	2-3	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. almeriensis</i> M8 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. aquamarina</i> DSM 30161 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. campaniensis</i> 5AG ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. cerina</i> SP4 ^T	2-3	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. denitrificans</i> M29 ^T	2-3	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. desiderata</i> FB2 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>H. elongata</i> ATCC 33173 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. eurihalina</i> ATCC 49336 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>H. fontilapidosi</i> 5CR ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. gudaonensis</i> SL014B-69 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. halmophila</i> ATCC 19717 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. halodenitrificans</i> ATCC 13511 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. halodurans</i> DSM 5160 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. koreensis</i> SS20 ^T	2-3	C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. magadiensis</i> 21 MI ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. maura</i> S-31 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>H. meridiana</i> DSM 5425 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. mongoliensis</i> Z-7009 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. nitroreducens</i> 11S ^T	1-2	C ₆ -HSL

<i>H. organivorans</i> G-16.1 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. pacifica</i> DSM 4742 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. pantelleriensis</i> AAP ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. ramblicola</i> RS-16 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. rifensis</i> HK31 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL
<i>H. saccharevitans</i> AJ275 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. salina</i> F8-11 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. shengliensis</i> SL014B-85 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. stenophila</i> N12 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. subglaciescola</i> DSM 4683 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. variabilis</i> DSM 3051 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>H. ventosae</i> AI12 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>Halotalea alkalilenta</i> AW-7 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>Kushneria avicenniae</i> MW2a ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>K. indalinina</i> CG2.1 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>K. marisflavi</i> SW3a ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>Modicisalibacter tunisiensis</i> LIT2 ^T	1-2	C ₆ -HSL
<i>Salinicola halophilus</i> CG4.1 ^T	2-3	C ₈ -HSL, C ₆ -HSL
<i>S. salarius</i> M27 ^T	1-2	C ₆ -HSL

3. Distribución del gen sintasa de las AHLs en las especies de la familia *Halomanadaceae*

Para determinar si el gen sintasa responsable de la producción de AHLs está ampliamente distribuido en las bacterias objeto de este estudio, y que se detallan en la Tabla 20, se llevaron a cabo reacciones de PCR empleando cebadores diseñados a partir de la secuencia del locus *hanR/hanI* QS de la cepa *H. anticariensis* FP35^T caracterizado en el capítulo I de la presente Tesis Doctoral. Los cebadores fueron diseñados con la idea de amplificar un fragmento del gen sintasa que se corresponde con una parte conservada en los genes de la familia *luxI*. Para las reacciones de PCR se emplearon los cebadores LuxIsub-Ha-F (5'-CATTGTTGTTGAGACAG-3') y LuxIsub-Ha-R (5'-CTCTTCCCTTATGAACGA-3').

En las condiciones ensayadas logramos amplificar el fragmento esperado (aproximadamente 350pb) en 32 de las 42 especies estudiadas. En las 10 restantes no descartamos la presencia del gen sintasa ya que existen otras familias de proteínas diferentes a LuxI que también sintetizan AHLs.

La secuenciación de los fragmentos amplificados y el posterior análisis mediante el programa MEGA usando el método Neighbour-Joining nos permitieron establecer la distribución filogenética del gen sintasa de AHLs en las cepas ensayadas (Figura 61).

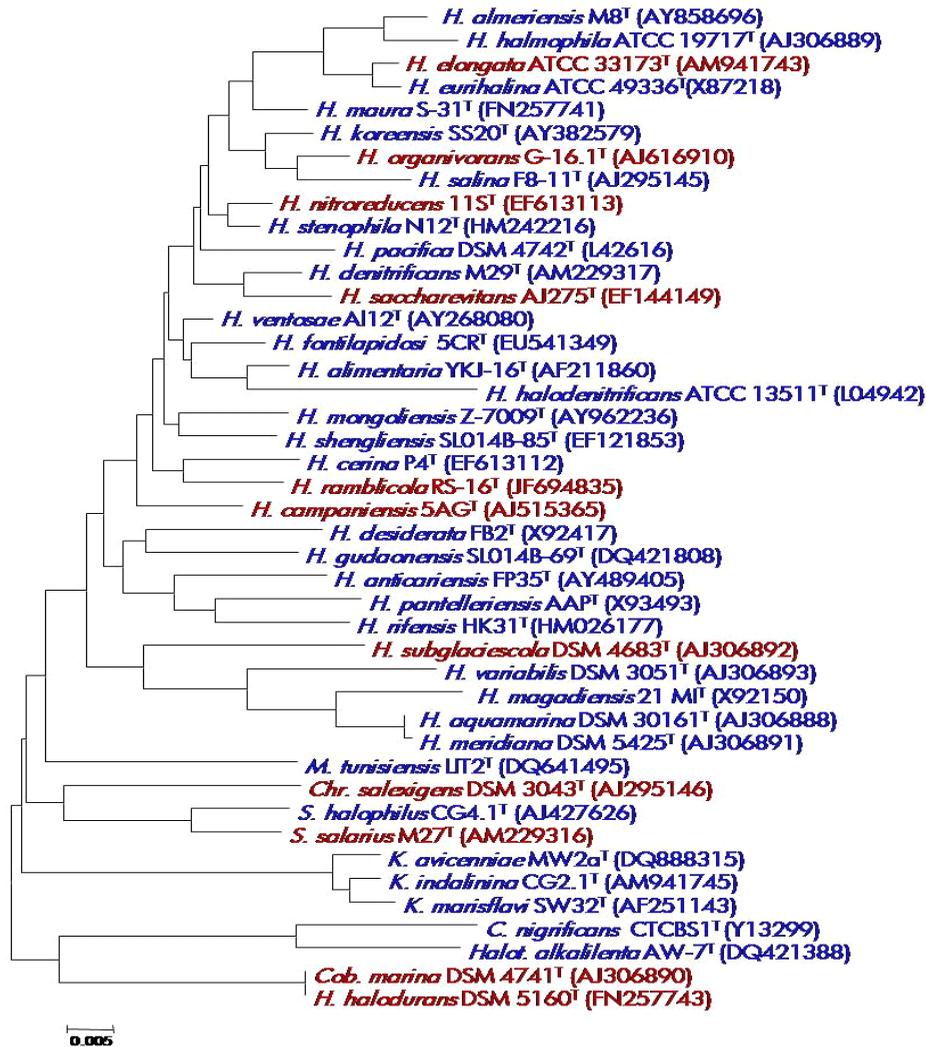


Figura 61. Distribución del gen sintasa en los miembros de la familia *Halomonadaceae* con respecto a su distribución taxonómica. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S que muestra la relación entre los miembros de la familia *Halomonadaceae* obtenido mediante el método de neighbour-joining (NJ). Los números de acceso de las secuencias en la base de datos GenBank se indican entre paréntesis. En color azul muestra la presencia y en color rojo la ausencia de producto de PCR en los miembros de la familia *Halomonadaceae* estudiados.

En la Figura 62 se muestra un árbol filogenético de la distribución del gen *luxI* en las especies de la familia *Halomonadaceae* con respecto a otras especies de la clase *Gammaproteobacteria* y a miembros de las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. El árbol filogenético fue obtenido a partir de la secuencia del fragmento amplificado del gen sintasa mediante el programa MEGA usando el método Neighbour-Joining. En el árbol filogenético se puede observar que todas las secuencias correspondientes al gen sintasa de las especies de la familia *Halomonadaceae* se agrupan en un cluster separado de otras secuencias de genes sintasas de la clase *Gammaproteobacteria*. Este resultado refleja la posición taxonómica de este grupo de bacterias halófilas. Algunas de las secuencias de los genes sintasas de las clases

Alphaproteobacteria y *Betaproteobacteria* se encuentran entremezcladas lo que refleja la relación relativamente estrecha entre las dos clases de proteobacterias. Sin embargo, la mayoría de las secuencias de la clase *Alfaproteobacteria* se agruparon entre si formando un cluster separado.

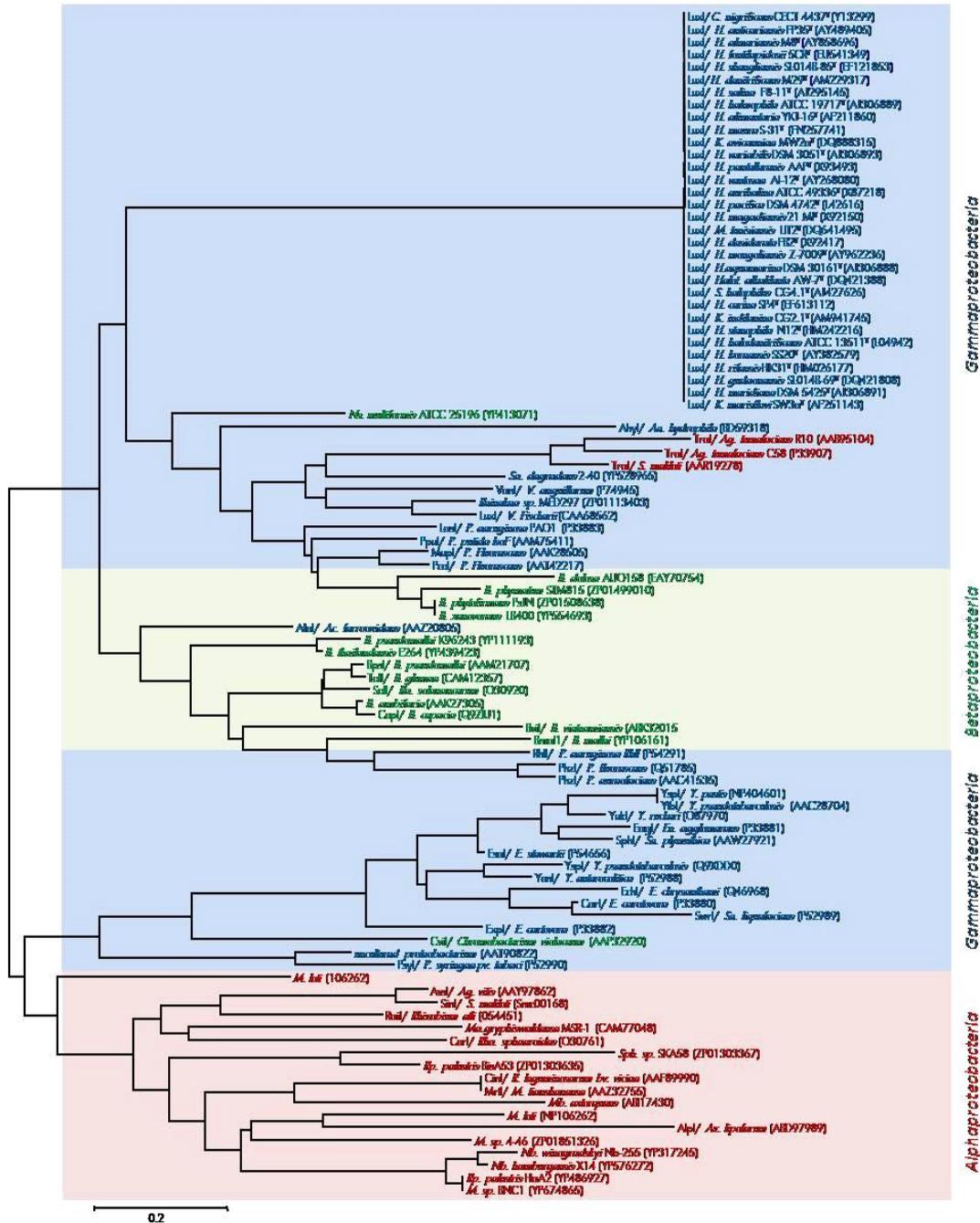


Figura 62. Árbol filogenético basado en un fragmento del gen *luxI*, obtenido mediante el método Neighbour-Joining. Los números de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias se encuentran entre paréntesis.

DISCUSIÓN

La ubiquidad de los miembros de la familia *Halomonadaceae* y su versatilidad metabólica sugiere que los comportamientos en comunidad basados en mecanismos de regulación complejos de comunicación intercelular son importantes para su adaptación a las condiciones fluctuantes del medio ambiente que habitan. Teniendo en cuenta la diversidad de las cepas objeto de estudio y de sus respectivos hábitats era interesante determinar si el sistema QS basado en las moléculas AHLs estaba conservado en las especies de la familia *Halomonadaceae*. Al inicio de este trabajo se había detectado la presencia de moléculas señal QS tipo AHLs en cuatro especies productoras de EPSs pertenecientes al género *Halomonas*, *H. anticariensis*, *H. eurihalina*, *H. maura* y *H. ventosae* mediante el uso de los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Llamas y col., 2005). Mediante el uso de los mismos biosensores hemos analizado un total de 42 especies que representan a siete géneros de la familia *Halomonadaceae*: *Chromohalobacter* (1 especie), *Cobetia* (1 especie), *Halomonas* (33 especies), *Halotalea* (1 especie), *Kushneria* (3 especies), *Modicisalibacter* (1 especie) y *Salinicola* (2 especies). El resultado de los ensayos de difusión en placas de agar de los extractos de AHLs indicó que todas las especies analizadas inducían una respuesta en el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Sin embargo sólo una especie (*Halomonas rifensis* HK31^T) dio respuesta en la cepa biosensora *C. violaceum* CV026, junto con la cepa *H. anticariensis* FP35^T que se utilizó como control. La no detección de autoinductores en las cepas restantes mediante la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 podría ser debido a que las cepas estudiadas no producen autoinductores en cantidades suficientes para poder ser detectados.

En resumen, estos resultados amplían la lista de las especies de la familia *Halomonadaceae* productoras de autoinductores e indican que el sistema QS basado en las moléculas AHLs está ampliamente distribuido en este grupo.

El análisis mediante TLC de las moléculas señal QS tipo AHLs de las especies de la familia *Halomonadaceae* mostró diferentes patrones lo que indicó una diversidad independientemente de su origen. Teniendo en cuenta los patrones obtenidos, la mayoría de las moléculas AHLs presentaron movilidades similares a las moléculas comerciales 3-oxo-C₆-HSL, C₆-HSL y C₈-HSL (Figura 60 y Tabla 21). Sin embargo para determinar la naturaleza e identificar la estructura de estas moléculas señal de forma adecuada es necesario un análisis mediante cromatografía de gases y espectroscopia de masas. Por otro lado, cabe destacar que no podemos excluir la producción de otras AHLs en las bacterias ensayadas debido a la limitación de las cepas biosensoras utilizadas. Cada cepa biosensora está basada en una proteína de la familia LuxR que detecta específicamente ciertas AHLs y puede ocurrir que las bacterias sintetizen nuevas AHLs

desde el punto de vista estructural y que no sean detectadas, o bien que la concentración de AHLs que produzcan esté por debajo del límite de detección de las cepas biosensoras.

Es interesante comentar que la mancha correspondiente a C₆-HSL, según su migración en la TLC, está presente en todas las especies analizadas y con una intensidad mayor que las otras AHLs lo que sugiere que tenga un papel importante en la comunicación bacteriana en esta familia. En *H. anticariensis* FP35^T se ha determinado que C₆-HSL es la molécula señal más abundante y HanI es la proteína sintasa (Capítulo I) (Llamas y col., 2005, Tahrioui y col., 2011).

Como hemos indicado anteriormente, todas las especies estudiadas fueron capaces de inducir la respuesta en la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Sin embargo, no conseguimos amplificar el gen sintasa de AHLs en todas ellas bajo las condiciones ensayadas. Entre las especies en las que no conseguimos amplificar el gen sintasa se encuentran *Chromohalobacter salexigens* y *Halomonas elongata* cuyos genomas completos están secuenciados y disponibles. El rastreo de ambos genomas en busca del gen sintasa tipo *luxI* fue negativo; esto quizá se deba a una anotación inadecuada. Otra teoría podría ser que estas especies, junto a las demás que dieron una amplificación negativa, utilicen otro tipo de sintasa de AHLs como la sintasa de AHLs de la familia LuxM o la sintasa HdtS (Laue y col., 2000; Milton y col., 2001).

Cabe destacar que la distribución del gen sintasa en las especies de la familia *Halomonadaceae* no parece ser dependiente de su posición filogenética ni tampoco del medio ambiente que habitan.

El análisis filogenético de las secuencias del gen sintasa de las especies analizadas indicó que están muy relacionadas entre ellas formando un cluster dentro de la clase *Gammaproteobacteria* (Figura 62) coincidente con su relación taxonómica.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. *Halomonas anticariensis* FP35^T posee un único sistema de regulación quorum sensing homólogo a *luxR/luxI*, cuyos genes *hanR/hanI* forman un operón con actividad promotora en ambos genes independiente de las moléculas señal *N*-acil homoserín lactonas o AHLs.
2. El sistema quorum sensing HanR/HanI está regulado a su vez por un sistema regulador de dos componentes compuesto por una proteína histidina quinasa híbrida (GacS) y un regulador de respuesta (GacA).
3. El sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla la producción de exopolisacárido, la movilidad y la formación del biofilm en *H. anticariensis* FP35^T. Sin embargo, el control de estos fenotipos no parece realizarse a través de las moléculas señal AHLs del sistema quorum sensing HanR/HanI.
4. El sistema quorum sensing HanR/HanI podría intervenir de forma directa o indirecta en el metabolismo de los carbohidratos, el nitrógeno y el fosfato de *H. anticariensis* FP35^T, posiblemente a través del control de los sistemas de transporte, y con ello influir también en la tolerancia o sensibilidad hacia ciertos compuestos químicos.
5. El análisis de moléculas señal AHLs de una colección de 42 especies de la familia *Halomonadaceae* sugiere que el sistema quorum sensing dependiente de estas moléculas se encuentra ampliamente distribuido en dicho grupo de bacterias.
6. Los tipos de AHLs producidos por los diferentes géneros difieren unos de otros e incluso entre diferentes especies del mismo género, lo que está en consonancia con la diversidad de la familia *Halomonadaceae*.

CONCLUSIONS

1. *Halomonas anticariensis* FP35^T possesses a unique quorum-sensing regulation system homologous to *luxR/luxI*, the *hanR/hanI* genes of which form an operon displaying promoter activity in both genes which functions independently of AHL signalling molecules.
2. The HanR/HanI quorum-sensing system is regulated in turn by a two-component system composed of a multisensory, hybrid, histidine kinase (GacS) and a response regulator (GacA).
3. The GacS/GacA two-component system controls exopolysaccharide production, motility and biofilm formation in *Halomonas anticariensis* FP35^T but this control does not take place via the AHL signal-molecule-based HanR/HanI quorum-sensing system.
4. In *Halomonas anticariensis* FP35^T the HanR/HanI quorum-sensing system seems to exert either a direct or indirect influence upon carbohydrate, nitrogen and phosphate metabolism, and also resistance or susceptibility to some chemical compounds, probably by controlling the expression of the genes involved in transport systems.
5. Screening for AHL signal molecules in 42 species belonging to the *Halomonadaceae* family revealed that the quorum-sensing system is widespread within this group of bacteria.
6. There is diversity within the AHL signalling molecules produced by the different genera and even between different species from the same genus consistent with the diversity to be found in the *Halomonadaceae* family.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- Afendra, A.S., Vargas, C., Nieto, J.J. y Drainas, C. (2004). Gene transfer and expression of recombinant proteins in moderately halophilic bacteria. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 267: *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*, 2nd ed. pp. 209–223. Edited by Balbás, P. & Lorence, A. (eds), Humana Press Inc.: Totowa, NJ.
- Aguilar, C., Friscina A., Devescovi, G., Kojic, M. y Venturi, V. (2003). Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* **185**, 6456–6462.
- Ahlgren, N. A., Harwood, C. S., Schaefer, A. L., Giraud, E. y Greenberg, E. P. (2011). Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 7183–7188.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffe, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J. y Llamas, I. (2011). *Halomonas rifensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing, halophilic bacterium isolated from Brikcha, a solar saltern in Chefchaouen, Morocco. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2600–2605.
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J., Sinquin, C., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S. y Llamas, I. (2012). Potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30, a moderately halophilic bacterium. *Molecules* (en revisión).
- Andersson, R. A., Eriksson, A. R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Köiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikala A. y Palva, E. T. (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR_(Ecc)*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 384–393.
- Andersen, J. B., Heydorn, A., Hentze, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B. B., Molin, S. y Givskov, M. (2001). gfp-based *N*-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol* **67**, 575–585.
- Arahal, D. R., García, M. T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J. J. y Ventosa, A. (2001). *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1457–1462.
- Arahal, D. R., Ludwig, W., Schleifer, K. H. y Ventosa, A. (2002). Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 241–249.
- Arahal, D. R. y Ventosa, A. (2006). The family *Halomonadaceae*. In *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria* Volume 6 3rd ed. pp. 811–835. Edited by: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. & Stackebrandt, E. Springer, NY.
- Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Béjar, V., Quesada, E. y Ventosa, A. (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2436–2446.
- Arco, Y., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Quesada, E. y del Moral, A. (2005). *epsABCJ* genes are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide mauran produced by *Halomonas maura*. *Microbiology* **151**, 2841–2851.
- Argandoña, M., Béjar, V., Quesada, E. y del Moral, A. (2001). Genome size and physical map of *Halomonas maura*, a new moderately halophilic microorganism. *International conference on halophilic microorganisms*. Comunicación personal.
- Argandoña, M., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Arco, Y., Quesada, E. y del Moral, A. (2006). A membrane-bound nitrate reductase encoded by the *narGHJ* operon is responsible for anaerobic respiration in *Halomonas maura*. *Extremophiles*. **10**, 411–419.
- Argandoña, M., Vargas, C., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Salvador, M. y Nieto, J. J. (2012). An extended suite of genetic tools for use in bacteria of the *Halomonadaceae*: an overview. *Methods Mol Biol* **824**, 167–201.
- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E. y Béjar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* **7**, 319–326.
- Atkinson, S., Throup, J. P., Stewart, G. S. y Williams, P. (1999). A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* **33**, 1267–1277.
- Atkinson, S., Chang, C. Y., Patrick, H. L. y otros autores (2008). Functional interplay between the *Yersinia pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI quorum sensing systems modulates swimming motility by controlling expression of *flhDC* and *fliA*. *Mol Microbiol* **69**, 137–151.

B

- Bainton, N. J., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R. y otros autores (1992). A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* **116**, 87–91.
- Baird-Parker, A. C. (1963). A classification of *Micrococci* and *Staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol* **30**, 409–427.
- Béjar, V., Calvo, C., Moliz, J., Diaz-Martínez, F. y Quesada, E. (1996). Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide. *App Biochem Biotechnol* **59**, 77–85.

- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. y Quesada, E. (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol* **61**, 135-141.
- Bejerano-Sagie, M. y Xavier, K. B. (2007). The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **10**, 189-198.
- Ben Ali Gam, Z., Abdelkafi, S., Casalot, L., Tholozan, J. L., Oueslati, R. y Labat, M. (2007). *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann y col. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias y col. 2007. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2307-2313.
- Berendes, F., Gottschalk, G., Heine-dobbernack, E., Moore, E.R.B. y Tindall, B.J. (1996). *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. *Syst Appl Microbiol* **19**, 158-167. Lista de validación n° 60. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 242.
- Bertani, I. y Venturi, V. (2004). Regulation of the *N*-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5493-5502.
- Bjarnason, J., Southward, C. M. y Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **185**, 4973-4982.
- Bochner, B.R. (1989a). "Breathprints" at the microbial level. *ASM News* **55**, 536-539.
- Bochner, B.R. (1989b). Sleuthing out bacterial identities. *Nature* **339**, 157-158.
- Bochner BR, Gadzinis P y Panomitros E (2001). Phenotype MicroArrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**, 1246-1255.
- Bohnert, H.J. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**, 1099-1111.
- Boltyanskaya, Y. V., Kevbrin, V. V., Lysenko, A. M., Kolganova, T. V., Tourova, T. P., Osipov, G. A. y Zhilina, T. N. (2007). *Halomonas mongoliensis* sp. nov. and *Halomonas kenyensis* sp. nov., new haloalkaliphilic denitrifiers capable of N₂O reduction, isolated from soda lakes. *Microbiology* (English translation of Mikrobiologiya) **76**, 739-747.
- Borchardt, S. A., Allain, E. J., Michels, J. J., Stearns, G. W., Kelly, R. F. y McCoy, W. F. (2001). Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3174-3179.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., Izquierdo, I., Rodríguez, M. y Béjar, V. (2000). Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *J Ind Microbiol & Biotechnol* **24**, 374-378.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I. y Béjar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1625-1632.
- Boyer, M. y Wisniewski-Dyé, F. (2009). Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* **70**, 1-19.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**, 803-846.
- Bullock, W. O., Fernández, J. M. y Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376.
- Burr, T., Barnard, A. M., Corbett, M. J., Pemberton, C. L., Simpson, N. J. y Salmond, G. P. (2006). Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Mol Microbiol* **59**, 113-125.

C

- Callahan, S. M. y Dunlap, P. V. (2000). LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-*lux* genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **182**, 2811-2822.
- Calvo, C., Ferrer, M. R., Martínez-Checa, F., Béjar, V. y Quesada, E. (1995). Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Appl Biochem Biotechnol* **55**, 45-54.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Béjar, V. y Quesada, E. (1998). Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J Ind Microbiol & Biotechnol* **20**, 205-209.
- Camilli, A. y Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113-1116.
- Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M. I., Ventosa, A. y Nieto, J. J. (1998). Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**, 487-497.
- Cánovas, D., Vargas, C., Kneip, S., Morón, M. J., Ventosa, A., Bremen, E. y Nieto, J. J. (2000). Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Microbiology* **146**, 455-563.
- Cantero, L., Palacios, J. M., Ruiz-Argueso, T. y Imperial, J. (2006). Proteomic analysis of quorum sensing in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. *Proteomics* **6**, S97-S106.
- Cantrell, S. A., Casillas-Martínez, L. y Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research* **110**, 962-970.
- Case, R. J., Labbate, M. y Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the *Proteobacteria*. *ISME J* **2**, 345 - 349.
- Castañeda, M., Guzman, J., Moreno, S. y Espin, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **182**, 2624-2628.

- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. y Espin G. (2001).** The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787-6793.
- Chan, Y. Y. y Chua, K. L. (2005).** The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *J Bacteriol* **187**, 4707-4719.
- Chan, Y. Y., Bian, H. S., Tan, T. M. C. y otros autores (2007).** Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **189**, 4320-4324.
- Chancey, S. T., Wood, D. W. y Pierson, L. S. (1999).** Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2294-2299.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R. y Chatterjee, A. K. (2003).** GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 1106-1117.
- Chen, J. H., Lion, L. W., Ghiorse, W. C. y Shuler, M. L. (1995).** Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res* **29**, 421-430.
- Chen, H., Teplitski, M., Robinson, J. B., Rolfe, B. G. y Bauer, W. D. (2003).** Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J Bacteriol* **185**, 5029-5036.
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P. y Nestor E. W. (1974).** *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci* **71**, 3672-3676.
- Christensen, W.B. (1946).** Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J Bacteriol* **52**, 461-466.
- Christensen, A. B., Riedel, K., Eberl, L., Flodgaard, L. R., Molin, S., Gram, L. y Givskov, M. (2003).** Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology* **149**, 471-483.
- Coronado, M. J., Vargas, C., Mellado, E., Tegós, G., Drainas, C., Nieto, J. J. y Ventosa, A. (2000).** The alpha-amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* **146**, 861-868.
- Cowan, S. T. y Steel, K.J. (1993).** Manual for the identification of medical bacteria, 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- Cui, Y., Chatterjee, A. y Chatterjee, A. K. (2001).** Effects of the two component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and hairpin_{ecc}. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 516-526.

D

- da Costa, M. S., Santos, H. y Galinski, E. A. (1998).** An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**, 117-153.
- Danino, V. E., Wilkinson, A., Edwards, A. y Downie, J. A. (2003).** Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRLJI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**, 511-525.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. y Greenberg, P. E. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- de Kievit, T. R. y Iglewski, B. H. (2000).** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**, 4839-4849.
- de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C. y Ventosa, A. (2011).** Taxonomy of halophiles. In: *Extremophiles Handbook*, vol. 1. pp: 256-283. Edited by Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb F. & Setter K. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. N. (1990).** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**, 6568-6572.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. y Bossier, P. (2008).** Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* **2**, 19-26.
- Dennis, G. C., Li Y. H. y Ellen, R. P. (2003).** Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest* **112**, 1626-1632.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., Kim, J., Hwang, I. y Venturi, V. (2007).** Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4950-4958.
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S. y West, S. A. (2007).** Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**, 411-414.
- Dobson S. J. y Franzmann P. D. (1996).** Unification of the genera *Deleya*, *Halomonas* and *Halovibrio* and the species *Paracoccus halodenitrificans* into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 550-558.
- Dong, Y. H. y Zhang, L. H. (2005).** Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* **43**, 101-109.
- Dong, Y. H., Wang, L. H. y Zhang, L. H. (2007).** Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil Trans R Soc B* **362**, 1201-1211.
- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H. y Surette, M. G. (2003).** Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol* **50**, 1477-1491.

- Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., Meijer, D., Márquez, M. C. y Ventosa, A. (2000). *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East African Rift Valley. *Extremophiles*, **4**, 53-60. Lista de validación N° 75. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1415-1417.
- Dunlap, P. V. y Greenberg, E. P. (1985). Control of *Vibrio fischeri* luminescence gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **164**, 45-50.
- Dunlap, P. V. (1989). Regulation of luminescence by cyclic AMP in *cya*-like and *crp*-like mutants of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **171**, 1199-1202.

E

- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. y Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-2449.
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C. y otros autores (1996). Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127-136.
- Edwards, A., Frederix, M., Wisniewski-Dyé, F., Jones, J., Zorreguieta, A. y Downie J. A. (2009). The *cin* and *rai* quorum-sensing regulatory systems in *Rhizobium leguminosarum* are coordinated by ExpR and CinS, a small regulatory protein coexpressed with CinI. *J Bacteriol* **191**, 3059-3067.
- Egland, K. A. y Greenberg, E. P. (1999). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* **31**, 1197-1204.
- Egland, K. A. y Greenberg, E. P. (2001). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. *J Bacteriol* **183**, 382-386.
- Engerbrecht, J. y Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci* **81**, 4154-4158.
- Euzéby, J. P. (2012). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. y Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 5443-5447.
- Evans, K. y Poole, K. (1999). The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 35-39.

F

- Farrand, S. K., Qin, Y. y Oger, P. (2002). Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymol* **358**, 452-484.
- Feazel, L. M., Spear, J. R., Berger, A. B., Kirk Harris, J., Frank, D. N., Ley, R. E. y Pace, N. R. (2008). Eukaryotic diversity in a hyperaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* **74**, 329-332.
- Ferluga, S. y Venturi, V. (2008). OryR is a LuxR-family protein involved in inter-kingdom signaling between pathogenic *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *J Bacteriol* **191**, 890-897.
- Fleming H. C., Neu, T. R. y Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**, 7945-7947.
- Franzmann, P. D., Burton, H. R. y McMeekin, T. A. (1987). *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 27-34.
- Franzmann, P. D., Wehmeyer, U. y Stackebrandt, E. (1988). *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 16-19.
- Frazier, W. C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J Infect Dis* **39**, 302.
- Fuqua, C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Fuqua, C., Burbea, M. y Winans, S.C. (1995). Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J Bacteriol* **177**, 1367-1373.
- Fuqua, C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu rev microbiol* **50**, 727-751.
- Fuqua, C. y Eberhard, A. (1999). Signal generation in autoinduction systems: synthesis of acylated homoserine lactones by LuxI-type proteins. In: *Cell-Cell Communication in Bacteria*. pp: 211-230. Edited by Dunny, G. & Winans S. C. (ed.). ASM press: Washington, DC.
- Fuqua, C., Parsek, M. R. y Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.
- Fuqua, C. y Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 685-695.

G

- Galinski, E. A. y Trüper, H. G. (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 95-108.

- Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**, 4169-4182.
- Gao, M., Chen, H., Eberhard, A., Gronquist, M. R., Robinson, J. B., Rolfe, B. G. y Bauer, W. D. (2005). *sinI* and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**, 7931-7944.
- Gao, R., Mack, T. R. y Stock, A. M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**, 225-234.
- Gao, R. y Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**, 133-154.
- García, M. T., Mellado, E., Ostos, J. C. y Ventosa, A. (2004). *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1723-1728.
- García-Estepa, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J. y Vargas, C. (2006). The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* **188**, 3774-3784.
- Garriga, M., Ehrmann, M. A., Arnau, J., Hugas, M. y Vogel, R. F. (1998). *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 677-686.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., y Lilburn, T. (2005). Class III. *Gammaproteobacteria* class. nov. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd (ed.), vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*). Edited by Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. M. (eds.) Springer, NY.
- Göller, K., Ofer, A. y Galinski, E. A. (1998). Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 293-300.
- González-Domenech, C. M., Martínez-Checa, F., Quesada, E. y Béjar, V. (2008a). *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 803-809.
- González-Domenech, C. M., Béjar, V., Martínez-Checa, F. y Quesada, E. (2008b). *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate- and nitrite-reducing species. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 872-876.
- González-Domenech, C. M., Martínez-Checa, F., Quesada, E. y Béjar, V. (2009). *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1290-1296.
- González, J. E. y Keshavan, N. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 859-875.
- González, J. E. y Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 574-592.
- Goo, E., Kang, Y., Kim, H. y Hwang, I. (2010). Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*. *J Proteome Res* **9**, 3184-3199.
- Gordon, R. E. y Smith, M. M. (1953). Rapidly growing, acid-fast bacteria. I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J Bacteriol* **66**, 41.
- Gould, T. A., Schweizer, H. P. y Churchill, M. E. (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acylhomoserine lactone synthase LasI. *Mol Microbiol* **53**, 1135-1146.
- Gram, L., Grossart H. P., Schlingloff A. y Kiorboe. T. (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4111-4116.
- Grammann, K., Volke, A. y Kunte, H. J. (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *Bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581. *J Bacteriol* **184**, 3078-3085.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. y Ventosa, A. (2001). Class III. *Halobacteria* class. nov. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd (ed.), vol. 1. pp 294-301. Edited by Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. (eds.) Springer, New York.
- Greenberg, E.P. (1997). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News* **63**, 371-377.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A. y Plemenitaš, A. (2005). Mikrosafari. The Beautiful World of Microorganisms in the Salterns. Drzavna Založba Slovenije, Ljubljana.

H

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanzelka, B. L. y Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J Bacteriol* **178**, 5291-5294.
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J. y Greenberg, E. P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**, 4882-4887.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E. y Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**, 5766-5770.
- Hastings, E. G. (1903). Milchagar als medium zur demonstration der erzeugung proteolytischer enzyme. *Zentbl Bakt ParasitKde Abt. II*, **10**, 384.
- Hastings, E. G. (1904). The action of various classes of bacteria on casein as shown by milk-agar plates. *Zentbl Bakt ParasitKde Abt II*, **12**.
- Hastings, J. W. y Nealson, K. H. (1977). Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* **31**: 549-595.

- Hebert, A. M. y Vreeland, R. H. (1987).** Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov. norn. rev. comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **347**-350.
- Heeb, S. y Haas, D. (2001).** Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1351-1363.
- Heeb, S., Blumer, C. y Haas, D. (2002).** Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J Bacteriol* **184**, 1046-1056.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B. y otros autores (2003).** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**, 3803-3815.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557-6567.
- Hoang, H. H., Becker, A. y González, J. E. (2004).** The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* **186**, 5460-5472.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. y Eberl, L. (2001).** The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517-2528.
- Hwang, I., Cook D. M. y Farrand, S. K. (1995).** A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J Bacteriol* **177**, 449-458.

I

- Inouye, M., (2006).** Signaling by transmembrane proteins shifts gears. *Cell* **126**: 829-831.

J

- James, S. R., Dobson, S. J., Franzmann, P. D. y McMeekin, T. A. (1990).** *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Syst Appl Microbiol* **13**, 270-277. Lista de validación N° 35. *Int J Syst Evol Microbiol* **40**, 470-471.
- Jeffries, C. D., Holtman, D.F. y Guse, D.G. (1957).** Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* **70**, 591.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J. y otros autores (1993).** The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* **12**, 2477-2482.

K

- Kalb, V. J. y Bernlohr, R. W. (1977).** A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem* **82**, 362-371.
- Kalogeraki, V. S. y Winans, S. C. (1997).** Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* **188**, 69-75.
- Kaplan, H. B. y Greenberg E. P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**, 1210-1214.
- Kaurichev, I. S. (1980).** Prácticas de Edafología. Mir, Moscow.
- Khan, S. R., Herman, J., Krank, J., Serkova, N. J., Churchill, M. E. A., Suga, H. y Farrand, S. K. (2007).** *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-L-homoserine lactone is the biologically relevant quorumone that regulates the *phz* operon of *Pseudomonas chlororaphis* Strain 30-84. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7443-7455.
- Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C. y Lee, S. T. (2007).** *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 675-681.
- Kinscherf, T. G. y Willis, D. K. (1999).** Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahII*. *J Bacteriol* **181**, 4133-4136.
- Kitten, T., Kinscherf, T. G., McEvoy, J. L. y Willis, D. K. (1998).** A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **28**, 917-929.
- Kleerebezem, M., Quadri L. E., Kuipers O. P. y de Vos. W. M. (1997).** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**, 895-904.
- Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzhepour, M. M. y Pechere, J. C. (2001).** Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 5213-5222.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P. y Winn, W.C. (1999).** In: *Diagnóstico microbiológico*, 5a ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Koser, S.A. (1923).** Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol.* **8**, 493-520.
- Kushner, D. J. y Kamekura, M. (1988).** Physiology of halophilic eubacteria. In: *Halophilic bacteria* vol. 1. pp. 109-138. Edited by Rodríguez-Valera, F. (ed.). CRC Press: Boca Raton.

L

- Lacks, S. y Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* **114**, 153-168.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T. y Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of *γ-proteobacteria*: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**, 241-253.
- Larpent, J. P. y Larpent-Gourgand, M. (1957). Mémento technique de microbiologie. Technique et documentation, Paris.
- Latifi, A., Wilson, M. K., Fogliano, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A. y Williams, P. (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**, 333-343.
- Latifi, A., Fogliano, M., Tanaka, K., Williams, P. y Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-1146.
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. y Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** (Pt 10), 2469-2480.
- Lerat, E. y Moran, N. A. (2004). The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Mol Biol Evol* **21**, 903-913.
- Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. y Bork, P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* **34**, D257-D260.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. y Sokol, P. A. (1999). Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**, 748-756.
- Lewenza, S. y Sokol, P. A. (2001). Regulation of ornibactin biosynthesis and *N*-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* **183**, 2212-2218.
- Lewenza, S., Visser, M. B. y Sokol, P. A. (2002). Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* **48**, 707-716.
- Licciardello, G., Bertani, I., Steindler, L., Bella, P., Venturi, V. y Catara, V. (2007). *Pseudomonas corrugata* contains a conserved *N*-acyl-homoserine-lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response. *FEMS Microbiol Ecol* **61**, 222-234.
- Licciardello, G., Strano, C. P., Bertani, I., Bella, P., Fiore, A., Fogliano, V., Venturi, V. y Catara, V. (2012). *N*-acyl-homoserine-lactone quorum sensing in tomato phytopathogenic *Pseudomonas* spp. is involved in the regulation of lipodepsipeptide production. *J Biotechnol* **159**, 274-282.
- Lida, A., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2008). Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via *N*-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius*. *J Bacteriol* **190**, 2546-2555.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. y Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**, 849-860.
- Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A. L. y otros autores (2011). Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *PNAS* **108**, 16765-16770.
- Lim, J. M., Yoon, J. H., Lee, J. C., Jeon, C. O., Park, D. J., Sung, C. y Kim, C. J. (2004). *Halomonas koreensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2037-2042.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. y Downie, J.A. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* **37**, 81-97.
- Llamas, I., del Moral, A., Béjar, V., Girón, M. D., Salto, R. y Quesada, E. (1997). Plasmids from *Halomonas eurihalina*, a microorganism which produces an exopolysaccharide of biotechnological interest. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 251-257.
- Llamas, I., Béjar, V., Argandoña, M., Quesada, E. y del Moral, A. (1999). Chemical mutagenesis of *Halomonas eurihalina* and selection of exopolysaccharide-deficient variants. *Biotechnol Lett* **21**, 367-370.
- Llamas, I., Argandoña, M., Quesada, E. y del Moral, A. (2000). Transposon mutagenesis in *Halomonas eurihalina*. *Res Microbiol* **151**, 13-18.
- Llamas, I., Suárez, A., Quesada, E., Béjar, V. y del Moral, A. (2003). Identification and characterization of the *carAB* genes responsible for encoding carbamoylphosphate synthetase in *Halomonas eurihalina*. *Extremophiles* **7**, 205-211.
- Llamas, I., Keshavan, N. y González, J. E. (2004). Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain *N*-acyl homoserine lactones. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3715-3723.
- Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M. J., Gronquist, M., Eberhard, A. y González, J. E. (2005). Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of *N*-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extremophiles* **9**, 333-341.
- Llamas, I., del Moral, A., Martínez-Checa, F., Arco, Y., Arias, S. y Quesada, E. (2006). *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 395-403.
- Llamas, I., Mata, J.A., Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C., Quesada, E. y Béjar, V. (2010). Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3^T, a halophilic species belonging to the *Alphaproteobacteria*, isolated on the Spanish Mediterranean seaboard. *Mar. Drugs* **8**, 2240-2251.

- Llamas, I., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Martínez-Canovas, M. J., Molina, I. y Quesada, E. (2011). *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2508-2514.
- Luque, R., Béjar, V., Quesada, E., Martínez-Checa, F. y Llamas, I. (2012). *Halomonas ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from Rambla Salada, a Mediterranean hypersaline rambla in south-east Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* (en prensa).

M

- Malott, R. J., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E. y Sokol, P. A. (2005). Characterization of the *ccilR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **73**, 4982-4992.
- Margesin, R. y Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**, 73-83.
- Marketon, M. M. y González, J. E. (2002). Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 3466-3475.
- Marketon, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A. y González, J. E. (2003). Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **185**, 325-331.
- Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A., y González, J. E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* **184**, 5686-5695.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**, 207-208.
- Marra, A., Asundi, J., Bartilson, M., Lawson, S., Fang, F., Christine, J., Wiesner, C., Brigham, D., Schneider, W. P. y Hromockyj, A. E. (2002). Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infect Immun* **70**, 1422-1433.
- Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Álvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 430-449.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M. y Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal Biochem* **366**, 102-104.
- Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F. y Quesada, E. (2004a). *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland, wildfowl reserve in Málaga, Southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1329-1332.
- Martínez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I. y Béjar, V. (2004b). *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 733-737.
- Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Paez, R. y Quesada, E. (2004c). *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1793-1797.
- Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Del Moral, A. y Bejar, V. (2004d). *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the α -proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1735-1740.
- Martínez-Checa, F., Béjar, V., Llamas, I., del Moral, A. y Quesada, E. (2005a). *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2385-2390.
- Martínez-Checa, F., Béjar, V., Martínez-Canovas, M. J., Llamas, I. y Quesada, E. (2005b). *Halomonas almeriensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Cabo de Gata (Almería, South-East, Spain). *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2007-2011.
- Martínez-Checa, F., Béjar, V., Llamas, I., del Moral, A. y Quesada, E. (2005c). *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2385-2390.
- Martínez-Checa, F., Quesada, E., Martínez-Canovas, M. J., Llamas, I. y Béjar, V. (2005d). *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2525-2530.
- Marutani, M., Taguchi, F., Ogawa, Y., Hossain, M. M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraiishi, T. y Ichinose, Y. (2008). Gac two-component system in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is required for virulence but not for hypersensitive reaction. *Mol Genet Genomics* **4**, 313-22.
- Mata, J. A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. y Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol* **157**, 827-835.
- Mata, J. A., Béjar, V., Bressollier, P., Tallón, R., Urdaci, M.C., Quesada, E. y Llamas, I. (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 521-528.
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. y Nomura, N. (2004). Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a *quorum-sensing* autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* **48**, 1320-1328.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L. y otros autores (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. *Microbiology* **143**, 3703-3711.

- McGowan, S., Sebaiha, M., Jones, S. y otros autores (1995). Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology* **141**, 541–550.
- McGowan, S. J., Barnard, A. M., Bosgelmez, G. y otros autores (2005). Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol* **55**, 526–545.
- McIntosh, M., Meyer, S. y Becker, A. (2009). Novel *Sinorhizobium meliloti* quorum sensing positive and negative regulatory feedback mechanisms respond to phosphate availability. *Mol Microbiol* **74**, 1238–1256.
- Meighen, E. A. y Sztitner, R. B. (1992). Multiple repetitive elements and organization of the *lux* operons of luminescent terrestrial bacteria. *J Bacteriol* **174**, 5371–5381.
- Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J. y Ventosa, A. (1995). Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 712–716.
- Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Martín, S. y Ventosa, A. (2004). Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. In *Halophilic microorganisms*. pp. 285–295. Edited by Ventosa, A. (ed.). Springer-Verlag: Berlin
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor: NY.
- Miller, V. L. y Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**, 2575–2583.
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M. y Williams, P. (2001). The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl) homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. *J Bacteriol* **183**, 3537–3547.
- Milton, D. L. (2006). Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* **296**, 61–71.
- Minogue, T. D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F. y von Bodman, S. B. (2002). The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol* **44**, 1625–1635.
- Moraine, R. A. y Rogovin, P. (1966). Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol Bioeng* **8**, 511–524.
- Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. y Winans, S.C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**, 1655–1658.
- Moreno, M. d. L., Sánchez-Porro, C., Piubeli, F., Frias, L., García, M. T. y Mellado, E. (2011). Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the Ppenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans*. *PLoS ONE* **6**, e21049.
- Morohoshi, T., Nakamura, Y., Yamazaki, G., Ishida, A., Kato, N. y Ikeda, T. (2007). The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J Bacteriol* **189**, 8333–8338.

N

- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A. y Foster, K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* **6**, e14.
- Nasser, W. y Reverchon, S. (2007). New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387**, 381–390.
- Nasser, W., Bouillant, M. L., Salmond, G. y Reverchon, S. (1998). Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expl-expr* locus directing the synthesis of two *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* **29**, 1391–1405.
- Newman, J. R. y Fuqua, W. C. (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* **227**, 197–203.
- Ng, W. L. y Bassler, L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197–222.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G. y otros autores (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 12176–12181.
- Nieto, J. J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E. y Ruíz-Berraquero, F. (1989). A survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2385–2390.
- Ntougias, S., Zervakis, G. I. y Fasseas, C. (2007). *Halotalea alkalilenta* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline olive mill wastes, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann y col. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1975–1983.

O

- Ochman, H., Gerber, A. S. y Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621–623.
- Oren, A. (2002a). Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers: London.
- Oren, A. (2002b). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 56–63.
- Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems* **1**, 2.
- Oren, A. (2006). The order *Halobacteriales*. In: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* vol. 3 3rd (ed.). pp. 113–164. Edited by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. & Stackebrandt, E. Springer: NY.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2.

- Oren, A., Arahal, D. R. y Ventosa, A. (2009). Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evo Microbiol* **59**, 637-642.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* **31**, 825-834.
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* **13**, 1908-1923.
- Ortori, C. A., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P. y Barrett, D. A. (2007). Comprehensive profiling of *N*-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **387**, 497-511.
- O'Toole G. A. y Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.

P

- Paggi, R. A., Martone C. B., Fuqua C. y De Castro. R. E. (2003). Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 49-52.
- Pappas, K. M., Weingart, C. L. y Winans, S. C. (2004). Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol* **53**, 755-769.
- Park, S. Y., Kang, H. O., Jang, H. S., Lee, J. K., Koo, B. T. y Yum, D.Y. (2005). Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2632-2641.
- Parsek, M. R., Schaefer, A. L. y Greenberg, E. P. (1997). Analysis of random and site-directed mutations in *rhlI*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol Microbiol* **26**, 301-310.
- Patankar, A. V. y González, J. E. (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 739-756.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. y Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. y Greenberg, E. P. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 1490-1494.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. y Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. y Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.
- Peck, R. F., DasSarma, S. y Krebs, M. P. (2000). Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarium* with *ura3* as a counterselectable marker. *Mol Micro* **35**, 667-676.
- Pedrés-Alió, C. (2004). Trophic ecology of solar salterns. In: *Halophilic Microorganisms*. pp 33-48. Edited by Ventosa, A. (ed). Springer: Berlin.
- Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. y Walker, G. C. (2002). A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 5067-5076.
- Pessi, G. y Haas, D. (2000). Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 6940-6949.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Cámara, M., Haas, D. y Williams, P. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 6676-6683.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. y Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, 9.
- Piper, K.R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S.K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**, 448-450.
- Pirhonen, M., Flegel, D., Heikinheimo, R., y Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* **12**, 2467-2476.
- Porter, K., Kukkaro, P., Bamford, J. K., Bath, C., Kivela, H. M., Dyall-Smith, M. L. y Bamford, D. H. (2005). SH1: a novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake. *Virology* **335**, 22-33.
- Pothier, J. F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëne-Loccoz, Y. y Prigent-Combaret, C. (2007). Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* **153**, 3608-3622.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. y Wexler, H. (2008). Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol* **56**, 412-419.
- Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S. y Schaefer, A. L. (1997). A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **179**, 7530-7537.

Q

- Quandt, J. y Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21.

Quesada, E., Valderrama, M. J., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M. C., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos Cormenzana, A. (1990). *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic non motile gram-negative rod. *Int J Syst Evol Microbiol* **40**, 261-267.

Quesada, E., Béjar, V., y Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* **49**, 1037-1041.

Quesada, E., Béjar, V., Ferrer, M. R. y otros autores (2004). Moderately halophilic bacteria which produce exopolysaccharides. In: *Halophilic Microorganisms*. pp 297-314. Edited by Ventosa, A. (ed). Springer: Berlin.

Quillaguamán, J., Guzmán, H. Van-Thouc, D. y Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxycanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1687-1696.

R

Ramos-cormenzana, A. (1989). Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. In: *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. pp. 289-309. Edited by Da Costa, M. S., Duarte, J. C. & Williams, R. A. D. (ed). Elsevier Applied Science: London.

Regine, H. A. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNAPolymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 373-93.

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. y Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**, 309-319.

Roberts, M. (2000). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci* **5**, 796-812.

Roberts, M. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**, 5.

Roebler, M. y Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**, 743-754.

Rodelas, B., Lithgow, J. K., Wisniewski-Dyé, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P. y Downie, J. A. (1999). Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* **181**, 3816-3823.

Rodríguez-Moya, J., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J., Iglesias-Guerra, F., Jebbar, M. y Vargas, C. (2010). Involvement of EupR, a response regulator of the NarL/FixJ family, in the control of the uptake of the compatible solutes ectoines by the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *BMC Microbiol* **10**, 256.

Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* **7**, 235-243.

Romano, I., Nicolaus, B., Lama, L., Manca, M. C. y Gambacorta, A. (1996). Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria Island. *Syst Appl Microbiol* **19**, 326-333. Lista de validación n° 61. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 601-602.

Romano, I., Giordano, A., Lama, L., Nicolaus, B. y Gambacorta, A. (2005). *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *Syst Appl Microbiol*. **28**, 610-618. Lista de validación n° 106. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2235-2238.

Romero, M., Diggle, S. P., Heeb, S., Cámara, M. y Otero, A. (2008). Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett* **280**, 73-80.

Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, G. K., Carranza, D., Mata, J. A., Llamas, I., Santamaría, M., Quesada, E. y Molina, I. J. (2011). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B-100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 345-355.

S

Sakurai, N. y Sakurai, T. (1998). Genomic DNA cloning of the region encoding nitric oxide reductase in *Paracoccus halodenitrificans* and a structure model relevant to cytochrome oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 400-406.

Salmond, G. P., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. y Williams, P. (1995). The bacterial enigma: cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol* **16**, 615-624.

Sambrook, J. y Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY.

Sánchez-Díaz, P. (2003). Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioter* **16**, 172-187.

Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M. C., Montalvo-Rodríguez, R. y Ventosa, A. (2009). Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 397-405.

Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Parsek, M. R. y Greenberg, E. P. (2000). Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol* **305**, 288-301.

Schaefer, A. L., Greenberg, E. P., Oliver, C. M. y otros autores (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* **454**, 595-599.

- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. y Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066-2079.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. y Greenberg, E. P. (2004a). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 15833-15839.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. y Greenberg, E. P. (2004b). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973-985.
- Seaman, P. F. y Day, M. J. (2007). Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 1-13.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L. y Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 6036-6041.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **23**, 15.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P. y Quax, W. J. (2006). Quorum quenching by an *N*-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* **74**, 1673-1682.
- Sneath, P. H. A. y Collins, V. G. (1974). A study in test reproducibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek* **40**, 481-527.
- Southern, E. (1975). Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503.
- Spaink H. P., Wijffelman C. A., Pees E., Okker R. J. H. y Lugtenberg B. J. J. (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**, 337-340.
- Sripo, T., Phongdara, A., Wanapu, C. y Caplan, A. B. (2002). Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. *J Biotechnol* **95**, 171-179.
- Steindler, L. y Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 1-9.
- Stevens, A.M. y Greenberg, E.P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* **179**, 557-562.
- Stock, A. M., V. L. Robinson y Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Stockwell, V. O. y Loper, J. E. (2005). The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Microbiology* **151**, 3001-3009.
- Subramoni, S. y Venturi, V. (2009). LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* **155**, 1377-1385.
- Subsin, B., Chambers, C. E., Visser, M. B. y Sokol, P. A. (2007). Identification of genes regulated by the *cepIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia* by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **189**, 968-979.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.

T

- Taga, M. E. y Bassler, B. L. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14549-14554.
- Tahrioui, A., Quesada, E. y Llamas, I. (2011). The *hanR/hanI* quorum-sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology* **157**, 3378-3387.
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y. y otros autores (2000). Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**, 4317-4331.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tang, M. S., Nazimiec, M., Ye, X. C., Iyer, G. H., Eveleigh, J., Zheng, Y., Zhou, M. J. y Tang, Y. Y. (2001). Two forms of UvrC protein with different double-stranded DNA binding affinities. *J Biol Chem* **276**, 3904-3910.
- Teplitski, M., Eberhard, A., Gronquist, M. R., Gao, M., Robinson, J. B. y Bauer, W. D. (2003). Chemical identification of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Arch Microbiol* **180**, 494-497.
- Throup, J. P., Cámara, M., Briggs, G., Winson, M. K., Bycroft, B. W., Williams, P. y Stewart, G. S. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two quorum sensing signal molecules. *Mol Microbiol* **17**, 345-356.
- Timmermans, J. y Van Melderen, L. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell & Mol Life Sci* **67**, 2897-2908.
- Trüper, H.G. y Galinski E.A. (1986). Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* **42**, 1182-1186.

U

- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. y Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2823-2829.

- Urbanowski, M. L., Lostroh, C. P. y Greenberg, E. P. (2004). Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* **186**, 631-637.
- Uroz, S., Chhrabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P. y Dessaux, Y. (2005). *N*-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology* **151**, 3313-3322.
- Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M. T., Faure, D. y Dessaux, Y. (2008). A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1357-1366.

V

- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. y Marco, S. D. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J* **21**, 4393-4401.
- Vargas, C. y Nieto, J. J. (2004). Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae*. *Methods Mol Biol* **267**, 183-208.
- Vasil, M. L. (2003). DNA microarrays in analysis of quorum sensing: strengths and limitations. *J Bacteriol* **185**, 2061-2065.
- Ventosa, A. y Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. y Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 504-544.
- Ventosa, A. y Arahál, D. (2002). Physico-Chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. In: *Encyclopedia of Life Support System*. pp. 10020-10031. Eolss Publishers Co. Ltd.: París.
- Ventosa, A. (2004). *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag: Heidelberg.
- Ventosa, A., Sánchez-Porro, C., Martín, S. y Mellado, E. (2005). Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In: *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. pp 339-354. Edited by Gunde-Cimerman, N., Oren, A. & Plemenitas, A. (eds.). Springer: Dordrecht.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C. y Márquez, M. C. (2008). Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In: *Microbiology of Extreme Soils*. pp: 87-115. Edited by Dion, P. & Nautiyal, C. S. (eds), Springer, NY.
- Vieira, J. y Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-68.
- Visick, K. L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M. y Ruby, E. G. (2000). *Vibrio fischeri lux* Genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J Bacteriol* **182**, 4578-4586.
- Viti C., Decorosi F., Mini A., Tatti E. y Giovannetti L. (2009). Involvement of the *osCA* gene in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance in *Pseudomonas corrugata* 28. *Microbiology* **155**, 95-105.
- Von Bodman, S. B., Majerczak, D. R. y Coplin, D. L. (1998). A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 7687-7692.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L. y Elliot, E. (1980). *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 485-495.
- Vreeland, R. H. (1987). Mechanisms of Halotolerance in Microorganisms. *Crit Rev Microbiol* **14**, 311-356.

W

- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. y Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**, 2080-2095.
- Wang, Y. N., Cai, H., Chi, C. Q., Lu, A. H., Lin, X. G., Jiang, Z. F. y Wu, X. L. (2007a). *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1222-1226.
- Wang, Y. N., Cai, H., Yu, S. L., Wang, Z. Y., Liu, J. y Wu, X. L. (2007b). *Halomonas gudaonensis* sp. nov., isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 911-915.
- Waters, C.M. y Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B. y Churchill, M. E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* **9**, 685-694.
- West, A. H. y Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. y Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
- Whiteley, M., Parsek, M. R. y Greenberg, E. P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 4356-4360.
- Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**, 3923-3938.
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dyé, F., Lithgow, J. K. y Downie, J. A. (2002). *N*-acylhomoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* **184**, 4510-4519.

-
- Winson, M. K., Cámara, M., Latifi, A. y otros autores (1995). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 9427-9431.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M.T., Linforth, R., Cornell, K.A., Taylor, A.J. y otros autores (2002). LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**, 909-922.
- Wisniewski-Dyé, F. y Downie, J. A. (2002). Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 397-407.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.
- Wolanin, P., Thomason, P. y Stock, J. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**, 3011-3018.
- Wu, Q. L., Chatzinotas, A., Wang, J. y Boeigk, J. (2009). Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. *Microb Ecol* **58**, 569-581.

X

-
- Xavier, J. B. y Foster, K. R. (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. *PNAS* **104**, 876-881.
- Xu, X. W., Wu, Y. H., Zhou, Z., Wang, C. S., Zhou, Y. G., Zhang, H. B., Wang, Y. y Wu, M. (2007). *Halomonas saccharovitans* sp. nov., *Halomonas arcis* sp. nov. and *Halomonas subterranea* sp. nov., halophilic bacteria isolated from hypersaline environments of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1619-1624.

Y

-
- Yan, Q., Wu, X. G., Wei, H. L., Wang, H. M. y Zhang, L. Q. (2009). Differential control of the Pcol/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by sigma factor RpoS and the GacS/GacA two-component regulatory system. *Microbiol Res* **164**, 18-26.
- Yang, S., Lopez, C. R. y Zechiedrich, E. L. (2006). Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichiacoli*. *PNAS* **103**, 2386-2391.
- Yim, G., Huimi Wang, H. y Davies FRS, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Phil Trans E Soc B* **362**, 1195-1200.
- Yoon, J.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H., Kim, C.J. y Park, Y.H. (2002). *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol*. **52**, 123-130.

Z

-
- Zhang, W. y Shi, L. (2005). Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* **151**, 2159-2173.
- Zheng, H., Zhong, Z., Lai, X., Chen, W. X., Li, S. y Zhu, J. (2006). A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium thianshanense*, controls symbiotic nodulation. *J Bacteriol* **188**, 1943-1949.
- Zhu, J. y Winans, S.C. (1999). Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 4832-4837.
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L. y Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 3129-3134.

ANEXOS

ANEXOS

1. Composición de los medios de cultivo

- **Medio MY** (Moraine y Rogovin, 1966)

Glucosa (Panreac®)	1,0g
Extracto de levadura (Panreac®)	0,3g
Proteosa-peptona (Panreac®)	0,5g
Extracto de malta (Panreac®)	0,3g
Sales de Subow al 30% (p/v) c.s.p.	100ml

- **Medio SWYE** (Nieto y col., 1989)

Extracto de levadura (Panreac®)	5g
Sales de Subow al 30% (p/v) c.s.p.	1,000ml

- **Medio MM** (Argandoña y col., 2001)

Proteosa-peptona (Panreac®)	2,0g
Extracto de levadura (Panreac®)	0,4g
Sales de Subow al 30% (p/v) c.s.p.	1,000ml

- **Medio de Koser** (Koser, 1923)

NaCl (Panreac®)	50,0g
KCl (Panreac®)	2,0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Panreac®)	0,2g
KNO ₃ (Panreac®)	1,0g
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Panreac®)	1,0g
KH ₂ PO ₄ (Panreac®)	0,5g
Agua destilada c.s.p.	1.000ml

- **Medio TSA** (Panreac®)

Triptona	15g
Soja	5g
NaCl	5g
Agar	15,0g
Agua destilada c.s.p.	1,000ml

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Sambrook y Russell, 2001)

Tryptone (Panreac®)	10g
Extracto de levadura (Panreac®)	5g
NaCl (Panreac®)	10g
Agar (Panreac®)	15g
Agua destilada c.s.p.	1,000ml

- **Medio SOB** (Sambrook y Russell, 2001).

Glucosa (Panreac®)	3,6g
Proteosa-peptona (Panreac®)	20g
Extracto de levadura (Panreac®)	5g

NaCl (Panreac®)	0,5g
Agua destilada c.s.p.	1,000ml
▪ Medio MGM	
Na ₂ HPO ₄ (Panreac®)	11 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac®)	3 g
NaCl (Panreac®)	0,5 g
Glutamato (Panreac®)	1 g
Manitol (Sigma®)	10 g
Biotina (Sigma®)	1 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Panreac ®)	27,8 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O(Panreac ®)	246 mg
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
▪ Medio AB (Chilton y col., 1974)	
Manitol (Panreac®)	0,2 %
Tampón fosfato 20X	50 ml
Solución de sales 20X	50 ml
Bacto-Agar (Difco®)	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
▪ Medio de Christensen (Scharlau®) (Christensen, 1946)	
Peptona	1,0g
Dextrosa	1,0g
NaCl	5,0g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Rojo fenol	0,012g
Agar	15,0g
Sales de Subow al 7,0% (p/v) c.s.p.	1,000ml
▪ Agar DNasa (ADSA®)	
Triptona	20,0g
ADN	2,0g
NaCl	5,0g
Agar	13,6g
Sales de Subow al 7,0% (p/v) c.s.p.	1,000ml

2. Soluciones

▪ Sales de Subow al 30% (p/v) (Rodríguez-Valera y col., 1981)	
NaCl (Panreac®)	234,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Panreac ®)	41,6g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac ®)	59,8g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Panreac ®)	1,1g
KCl (Panreac ®)	6,0g
NaHCO ₃ (Panreac ®)	0,2g
NaBr (Panreac ®)	0,7g

- | | |
|--|---------|
| Solución 0,5% (p/v) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,65ml |
| Agua destilada c.s.p. | 1.000ml |
- **Tampón fosfato 20X**

K_2HPO_4	60 g
NaH_2PO_4	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml.

 - **Tampón de sales 20X**

NH_4Cl	20 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 g
KCl	3 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml.

 - **Reactivo de Frazier (Frazier, 1926)**

Cloruro de mercurio (Sigma®)	12,0g
HCl concentrado (Panreac®)	16ml
Agua destilada c.s.p.	80ml

Preparación: Se mezcló el cloruro mercúrico con el agua y a continuación se añadió el ácido agitando hasta su completa disolución.

 - **Solución de lugol (Cowan y Steel, 1993)**

I ₂ (Panreac®)	3,0g
KI (Panreac®)	6,0g
Agua destilada c.s.p.	1.000ml

Preparación: Se mezclaron todos los reactivos. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas y se filtró.

 - **Purificación de ADN**

Solución TE: Tris HCl 10mM (pH= 7,4); EDTA 1mM
Solución 1: Sacarosa 0,2% (p/v); Tris-HCl 25mM (PH= 8)
Solución 2: Tris-HCl 100mM (pH= 8); EDTA 100mM; NaCl 2mM; SDS 0,2% (p/v)
Solución 3: Solución de acetato sódico 3M (pH= 5,2)
Fenol saturado
Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1)
Solución de acetato sódico 3M (pH= 5,2)
Etanol absoluto
Etanol 70°
Isopropanol

 - **Electroforesis en geles de agarosa**

Muestras de ADN
Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 10x). Tris 0,89M; ácido bórico 0,89M; EDTA 20mM (pH= 8)
Tampón de carga para muestras de ADN 6x. Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)
Bromuro de etidio. Solución stock de 10mg/ml

Muestras de ARN

Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 50x). Tris-acetato 2M; EDTA 50mM (pH= 8)

H₂O DEPC. Solución de dipirocarbonato (DEPC) (Sigma) 1/1000 (v/v)

Tampón de carga para muestras de ARN 6x. Azul de bromofenol 0,25% (p/v); 50% (p/v) formamida; 15% (p/v) formaldehído; 2% TAE 50x; 13% (v/v) glicerol

Bromuro de etidio. Solución stock de 10mg/ml

- **Actividad β -galactosidasa**

Tampón Z. Na₂HPO₄ 0,06M; NaH₂PO₄ 0,04M; KCl 0,01M; MgSO₄ 0,001M; β -mercaptoetanol 0,05M

SDS 0,1%. Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) al 0,1% (p/v) en agua destilada estéril.

Na₂CO₃ 1M. Solución 1M de Na₂CO₃ en agua destilada estéril (10,6g de Na₂CO₃ para 100ml de solución).

Reactivo ONPG. Solución de α -nitrofenil- β -D-galactopiranosido a 4mg/ml en Tampón Z.

- **X-gal.** Solución de 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido a 20mg/ml en dimetilformamida

- **Antimicrobianos**

Antimicrobiano*	Disolvente	Conc. stock (mg/ml)	Conc. final <i>E. coli</i> (μ g/ml)	Conc. final <i>H. anticariensis</i> (μ g/ml)
Ampicilina (Ap)	Agua destilada estéril	100	100	ND
Estreptomicina (Sm)	Agua destilada estéril	100	20	ND
Gentamicina (Gm)	Agua destilada estéril	50	20	50
Kanamicina (Km)	Agua destilada estéril	50	50	50
Rifampicina (Rf)	Dimetil sulfoxido	50	ND	50
Tetraciclina (Tc)	50% Agua destilada estéril + etanol absoluto 96°	15	15	30

* Las soluciones de antimicrobianos se esterizaron por filtración a través de un filtro millipore de 0,22 μ m y se almacenaron a -20°C en alícuotas.

3. Preparación de células competentes

- **Preparación de células competentes con CaCl₂ para choque térmico**

1. Siembre las cepas DH5a o S17- λ pir de *E. coli* en un tubo con 5ml de medio LB e incube a 37°C durante una noche en agitación.
2. Inocule un matraz con 100ml de medio LB con el cultivo bacteriano en una proporción 1:100 e incube a 37°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,35-0,5.

Nota: A partir de este paso todo el protocolo debe realizarse en condiciones estériles y en hielo. Asimismo todos los reactivos deben mantenerse en hielo.

3. Centrifugue el cultivo a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
4. Elimine el sobrenadante y resuspenda suavemente las células en un volumen de 20ml de CaCl₂ 100mM e incube a 4°C durante 20 horas.
5. Centrifugue el cultivo a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

6. Elimine el sobrenadante y resuspenda suavemente las células en un volumen de 4ml de una solución compuesta por 2ml CaCl_2 100mM y 2ml de glicerol al 40% (v/v).
7. Reparta la suspensión de células en alícuotas de 40 μl y congele a -80°C .

▪ **Preparación de células competentes para choque eléctrico**

1. Siembre la cepa *E. coli* XL1-Blue en un tubo con 5ml de medio LB adicionado de tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incube a 37°C durante una noche en agitación.
2. Inocule un matraz con 100ml de medio LB adicionado de tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con el cultivo bacteriano ajustado a una D.O._{600nm} de 0,1 e incube a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,7-0,8.

Nota: A partir de este paso todo el protocolo debe realizarse en condiciones estériles y en hielo. Asimismo todos los reactivos deben mantenerse en hielo.

3. Centrifugue el cultivo a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C .
4. Elimine el sobrenadante y resuspenda suavemente las células en un volumen de agua bidestilada estéril.
5. Repita los pasos 3 y 4.
6. Repita los pasos 3 y 4 pero en este caso las células se resuspenden en la mitad del volumen de agua bidestilada estéril.
7. Centrifugue el cultivo a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C .
8. Elimine el sobrenadante y resuspenda suavemente las células en un volumen de 2ml de glicerol al 10%.
9. Repita los pasos 7 y 8 y en este caso las células se resuspenden en un volumen de 200 μl de glicerol al 10%.
10. Reparta la suspensión de células en alícuotas de 40 μl y congele a -80°C .

4. Secuencias

>gi|385258613|gb|JQ437497.1| *Halomonas anticariensis* strain FP35 cysteine synthase B (*cysM*), multi-sensor hybrid histidine kinase (*gacS*), 4'-phosphopantetheinyl transferase (*acpS*), and pyridoxine 5'-phosphate synthase (*pxc*) genes, complete cds

```
GTCGACGCTTGCCAGCATGGCCATCTCAATACTCCGGTGCGAACAGGCCAGTGGACAGGTAACGGTCAC
CACGATCACAGACGATGAATACGATCACGGCATTCTCGACGTCTTCCGCGATGCGTAACGCCCCGGCCAA
GGCACC GCCAGACGATAACCAGCGAGAATACCCTCTTACGTCGCCAGGCGGCGCATATGCTCCTCGGCT
TCGAACTGACCGATGTCAGCACCCCTGTCAACCCGGAAGCATCGAAGATGCTAGGCAGATATTCGGGAG
GCCAGCGGGGGATGCCAGCGATGCTGGCGCCATCCTCGGGTTGCAACCCACGATTTGAACCTCGGGCTT
GCGCTCCTTGAGGTAGCTCGACACGCCATGATCGTACCGGTCGTTCCCATGGAAGTGAACAAAGTGGGTG
ATGCTGCCACCGGTCTGCTCCACAACCTCGGGGCCGGTGGTGCGAAAATGAGCCAAATGGGTTATCGGGGT
TGGCGAAGTATTGAGTGGCTTTCCCTCGCCACGAGCGATCATGGTATCGGCAAGGTCACGCGCACCTTC
CATGCCGGCTTCCTTGGTCACTGTGATCAGCTTGGCCCCGTAAGCTGCCATGGCCTGCTTGGCGCTCGTTG
GAAGCGCTTCGGGCATGATCAGCACCATGCGATAGCCTTTGATGGCTGCAGCCATGGCCAGTGCAGTAC
CGGTATTGCCGGAAGTCGCTTCGATCAAGGTATCCCCAGGGCGGATCTCGCCACGGGCTCTGCCTCGGC
CAGCATCGACAGCGCCCGCGGCTCCTTACCGAGCCAGCTGGATTGTTGCCTTCGAGCTTGGCCAAACAAC
ACATTGTTGCGCCCCGAGTAATGCGTTTCAGGCGCACTAGGGGAGTATTGCCGACCACATCCTCGAGCG
TTGGAAAAAGCATCTAACCTTCCTTCTGAAAAGCCTGTGCGCATTATATCCGTGCCGGACGACAGGTGA
CAGGTATTGCACCTCCCTATGGCATACTGGGAACCTTCGATCGTCTACTGGATATCCGCGATGCCGAT
GAGAACGCGCCTATTGTTACTGCTGCTGGGTGCTCCCTGGTTGTGATGCTGTTGCTCTCCTTTTCAGTCG
ATCCGGCACGATGCCAGGTTTCGCAAGGCTGCCTTGGAAACACGCCCTGACCACGAGTGCCGAAC TAGTAG
CACCGGCATTGGCTGGTGCCTTGTCCGAAGCGATTTCGGCCGCTTTGCACAGCTTGGCTCAGAGACTGCT
```

GAATATCGACGAAGTCCGCTCACTTCGCATTCACGACACACGAGGCCGGACGCTACTACATCTTGGCCAA
CAGCATATGGGCGTCAATCACCGAGGGGAACCGATGCCCCCTTGCTCGGCAGCAACGACCCTGGCATA
TGAGCGTGCCCATCCCCCAGGGACACGAAACAATGAACCTAACCGATGGCTGACGCTGACGGCTGACAC
CACCTCATTGGCATTGGGAACCTATCGTCAACTGGCCATTACCTCACTGATAGGCTTGGTCATTGGGCTA
TTGCTTTTCTGGTAGCCTATCTCGCCAGTCGCCACCTGACTCGCCCCCTACTCGAGGCCCAGCAAACCC
TGCTGCGCCTCAATGCCGCGACTACCAGCACCGCATGTCCAGCCGAGGTGCTAAAGAGGTGAAGCAACT
TGCCTCCAGCATCAACGCACTGGCCGAGCACCTCAGCCATGCCCATGACGATATGCAGCGCCATATCGAG
CAGACGACTCAGGACCTCAAGAGTCGATGGAGACGATCGAGATCAAGAACATCGAACTCGACATGGCTC
ACCGCCGAGCTCTTGAGCCAACCGCATCAAGACCGAGTTCTGGCCAAACATGAGCCATGAGATTGCGAC
GCCTCTGAACGGCATCATCGGTTTCTGCCAGCTATTGGGGCGCTCGTCCCTGGACACACGCCAACGGGAA
TGGCTGCAACATGTGCACAAGGCATCTGATAGTCTGTTGTCGCTGATCAACGATATTCTTGATTTTTCCA
AGATGGAGGCTGGCAAGCTCGAACTCGAGGCCGTCGATCTCGACATGGTGGCATTGGTGGACGAAGTGCT
CGGTCTGCAGGCCCTCAGGCACACCAGAAGCGGTTGCATTTGCTGGCCTTGGTCTACGACGATGTTCCG
GTACAATTGAAGGTGACCCCTGCGCATCAAGCAAGTGTGACCAATCTGGTTCACAACGCTGTCAAGT
TCACGGAAACAAGGCGAGGTGATCGTCAAGTCAAGTGGTGAAGAGTGCCAGCAGGGCCCTGGTCACCTTGAA
GGTTAGTGTGACGACACCGGCATCGGCCCTCGATCCCGAATATCGGGACCGACTTTTCAAAGCTTTTCAGC
CAAGCCAGTGTGACGATACTCGGCAATACGGCGGTACCGCCCTGGGCCTGATGATCTGCCGTCAACTCG
TCGAACAGATGGGTGGCGAGATTGGTGTGAAAGCCAACCGGGGAAGGGGACGACTTTCGCTTTCACTCT
CTCCCTGTTGGCTCGAAGCTTCGAGGAACGCCCTCCAGAAGTGTGTTGCCCGGCACCCACATCGCCTTG
TACGAACCCCAACGCACCGACTCGCCATGCACTACTGCATCTGCTGAAGCGTTGGGGGGTCCAAGTGACAT
CGCTCGGGACACCATCGATTGTGATATCGAGCCTCCAGCCCTGCTACTGGCCGGCTTGGAAAACGATGG
GCTCTCGAATTGATCGAATATCGAATTTGGCAGGAATGCCTCGATAAACCGGATTGCTCCGCTTCTGCTG
GTCAATGCCAGCTCCCTCGATATTCCCGACCTACATCTACCCCATGGTGGCGAAATTTGACCCGCCCT
TGTCACGTCAGCCTTGGCCACGACGCTGGACAATCTTCTCCACTCGCGCTCGCCACAGTCCCAACATGA
CTTGCCAGCACCGCGACACTCCTCGGCAAAGGTGCTGGTGTGATGACACGGCATCGAATCGCTTGTG
ATCAAGGAACTGCTCGCCGATCTGGGGCTGACCACATGTTGGCCACCAGTGGCGAGGAAGCCCTGGCAC
TGGCGCAAAGCGAGTGGCCGACCTGGTCTTGATGGACATCCGCCTGCCCGCATGGATGGCGTCCGCAC
TACCCACTCCCTACGCAAACCTGGGCGGTTCCCTGGAGGAGTTGTCCCATCATCGCCGTCACGGCGCACGCC
CTGGAAGAGGAGCGCCATAGACTCCTGCAACATGGCCTGCATGATGTACTCATCAAGCCGCTCGATAGCC
AGGCATTGACGCGACTGCTTAGCCAACATCTCAACATGCCACTGACACCGTCTCCGTCAGCGCACGGTGC
TGATTCCCTGGAAGGTGGAAGAGCAAGAAGGCCAACTGCCGATCGTTGACATGGCCCTTGGCACCACG
TTGGCTGGCGGCCACGAGTTCGCTGGCCGAAAGAAACCCCTGGACCGCTTGCTGGATAGCCTCGACGATAGTG
ATGCAGCACTGCGTCAAGCATGGCAGGACAACGACGACGAGGCAATTTCTGGATGCCATTACGCGCTCAA
TGGACCTGTGCTATTGTGGGTACCACAACCTGGCACTGGTTCGCTGAAACATTGGAGACACGCTTACGC
ACACGTGGCCTGGCCAAAGTGGAGCCTTTGCTCATCGAACTCTTTGATGCCATGGCAGCCTTGGCGGCT
GGCGGACAACGAATCAGCCGCCCTCCAGCACAACGAAAGCGCAAGCCAGATCGTCCCTCATCGCTCAACGA
CAGATGAATGCAACGCACTCCTGCTGCGTCTGCCAACGCTTGGCCCGGCCGATAGCATTAACGATGGT
TGGCCCAACGCATCGTTGGCGACTTGGATCTCGGTCCAACGCATGCCATGACGCAAGCCGGTACCCAGTG
CCTTGACGAAGGCCTCCTTGGCAGCAAAGCGCTTGGCCAGATAGGCCGCGCGGATGGATGTCCGATCAA
GCGCTCACGCTCCACGTCCTCCAGTAAGCGCAATCGAGACGCTCACCATGCCGCCCCATGGCAGTGGCA
AAACGCTCGATGCTCGCCAGATCGGTTGCCGATGCCGATGATCATGAACAACAACCACCGCTGGAGCCGTG
TTCGTGGTCATCGAGCGCTGCGACCAGGCTGCTTCTGACCGGCAATGGCGAGACGCTTTCATCTCCGCCA
CAGCCTCCTTGAGTCCCACGAACAATGCCCTGGCAATGATGGCATGGCCAATGTTGAGCTCATGCAACCC
AGGAATCGCGGCGATGGCTCGACATTAATGGTAATTAACCCATGACCCGATGACCGTCACTGCTCCAAT
TCCCCAGCCAGTTCCGCTGCAGCGGCGATTTCTCGCATGCTCAAGACAAGCGGCTGCTCCCTCGCCTCCG
CATAGGCCCGGATGCAACTCGATCACCGGTGCTCCACGGCATAGGCCGACGGATCTGCTCGGGCTC
CGGGTCGATGAACAGCGAGACTTACAACCCCGCCGCGCCAGTCTGCTACAAGCCATCGTAATGATCTCA
CGATTACCCACTACATCCAGGCCACCCCTCGGTCGTCAATTCTCAGCTTTTTCAGGCACCAGACAGACAT
GGGGCGGACATACTCCTCGCCAGAGCGATCATCTCTTCCGTCACGGCCATTTCCAGGTTTCATGCGGGT
ATTGAGCACTTCTGAAGCAAACGCACGTCACGTTCTGGATATGCCGACGGTCTTCGCGCAGATGCACG
GTAATGCCATCGGCACCGGCTTCTCAGCCAGTAAGCCGCTTGCACCGGATCGGGATAACGTGTGCCAC
GTGACTGACGCGAGTAGCAACATGATCGATATTGACACCGAGCA

>gi|161221611|gb|EF070731.2| *Halomonas anticariensis* strain FP35T transcriptional regulator (*gntR*) gene, partial cds; chromate transporter (*chrA*), chromate transporter (*chrB*), and transcriptional regulator (*gacA*) genes, complete cds; and exonuclease (*uvrC*) gene, partial cds

GAATTCNTCCGCGCCAGGGNAAAGATAGCGGTGCAACTGATCATGTAAGTGTTCGATGAATCGGAGC
AACCATGCAGATCCACAGGACGCCACCAAGGTTTGTAGAAAGCGGCCATGGGTATGCTCCCAATGTTCGA
CATCTTACCAGTGGCTCGCCTGAGGCGATGCGCAGCTGCCAAGAGTTCGGATTCCCATTGGCCATCGCC
ATAGCGAATCGCCTGAGTGCATGCACTTCCAACCTGCGACGCATCTGGGCAATATCATCCAGTTCG
CTTCGATCAAGCGGGGAATACGAAAGCCGCGCTGGTTCTCTTGGGTCGGAAGTCCATAGGCCCGCAGCT
TGTTGAGTGCTTACGCGAGCGGGCTGAGTCTGCGCAATAACGTTCTTTTCGGCGCATTGATGGCGATCTT
CTCACCCGCTGGAAGCACCCATTGACGATATCGCGACGCAAGATCTCATAGATTGCGCTGGCATGAGTT
GCATTACCAGCCCGAGTCTGTCTTGTTCATGAACAACTCCTTATGAGCTCAGCTTTCATCCCTGCGAT
GAGCCGAGCTTGACCTGATACTTCAAGCAACCTTATTTTATGATAATCGATTTTCTTTCCAGATTGCGAT
ATTGGTAGCAATGATCGCAGATTGCTTTCAGACAGGGAGTCCACCATGCCAAGCCCCCTCACCCGCCCAT
GCGCCTGCCACTGTTCTGGCCCTTCCCTGCGCATCGGGCTATTGGGTTTCGGAGGTGGCCCATCGATGATT
CCGCTCATTCAGCAAGAAGTCGTCAAGCGCCATGCGCTGGATGGATGAGGAAACGTTCCGGTGATGTCTGG
CCATCGCAATACCCTACCCTGGTCCCATTGCCACCAAGATGCCGGGATACATTGGTTACCGGGTTGCCGG
GATAAGTGGATGCCTCATCGCCGTGGCCGCTGTGATCATACCGATGATCCTGGNCATGATGGCGCTTCTC
GGCGTGTTCAGCCGTTACCCTGAAATGGCCTGGATCCAAGGCATGAGCCATGGCGTGATAACCGTTGTGA
TCGTATGATGGTGCAGTTGACGCTGGATTTCTGGAACAAGTCGCGGGTAGCACTGGGCTGGTGGATCAG
CCTACCATGGCGGCAGTCTCGGGAGGTTGATCTATTGGCTCGGTGTACACCCAGGTTGGGTCTGTCGGC
AGCCTGTTGCTTGGCGCAATGCTTCTACCCTGGGAGCTCGCCGCAAGGAGGCACCCCGGTGATCTACTG
GCAGCTGTTCTGGCCCTTCCCTCATCCCCAACATCATCGGCTATGGCGGGGGCCGGCCATCATCCCTTA
ATCGAAGCGGAAGTGGTCGGGCGCCATGGCTGGATGACGGCACAGAGCTTTGCGGAAACCCTGGCACTCG
GCAATGCCCTGCCAAGCCCATCGCCACCAAGATGGCAGGTTATATCGGTTTCGAGGTGGCGGGTTGGGG
TGGTGCCGTGCTGCGGGTACTCGCCACAGTCTGTTCCCTTCCCTGCTACTTATGCTTGGCGCCCTGGGTGTC
TTGTATGTCATCGTGAATCGCCCCGTGTCAAACGCATGAGTCAGTGGNACGCCCGGTGATCGCGATGA
TGATGGCTTGGCTTGCCTTGAGCTTTCTGGAGACTGGTGTGAGAGTGGCGGANTATGGCACACCTTGGG
AATCGCGTCCGTANCCGCCGTGGCCTTGTGCGATTTNCNGTGCATCCCGCACTGGTGGTTGCTGGAGGA
CTGCTATATGGCGCCCTCTTCCCTCGGCGGAAGTTGAAACCATTAGTCGCGCAAGGTTTACTTTTTGTTA
CCAATGCAAGAAAAGCCGCTTGGCGGGTACGCCAAGCGGCTAATTCATCTAAACTTTTTGGTGGAGCC
TAGCGGGATCGAACCCTGACCTCAACACTGCCAGTGTTCGCTCTCCAGCTGAGCTAAGGCCCCACGA
CGGTGCTGCACCATTTTATATACAGTACGCAACAGCTACTAAATGACTCCTAGGTTTGGGCTGCCAGA
AGCGATGGCAGTGTAGCAACGACTTCCCTGCTAGTCAAGTATTTGCAATTACAACGCCAATAGGAAA
ATGCAGCTGACAACCAACGCTGGATTAGAGAGACTATTCCCNCTAAGCTTAGGGAANTAGATTAACCAT
ACCTAATTTTTTCCCCCTCTAATNANAANCACCCATGATCAAGGTCCTTGTGCGAGATGACCATCACTT
GGTACGCACCAGTATCGCCGTATGCTGGATGCCAAGAAGGCTTCGCAAGTATGTCGCGAGGCTGCCGAT
GGAGAAGAAGCCATTGCCTTGGCTCGCAGGCATCGCCCGGATATCGTGCTGATGGACATTGCGATGCCGTG
GTGTCAGCGGACTCGAGGCGACCCGTAAGATCACCAAGGATGTCGCGATATCAAGGTCGTGGTGTAAAC
GGCATTCTCGAGGAAAACCTTGGCGAACGCTTACTCAATGCCGGTGGCAGCGGCTTCATCAGCAAGGCG
ACCGAACTTGGTGATATGGTGGCCGCTCTGCGAGCCGTTTTCTCCGGACAGCGTTATATCAGTCCGAAA
TCGCCAACCGGGTGGTTCTGGCCAAGGTGGATGCCAGGACAACCCCTTCGACACTCTTTCGCATCGGGA
GCTGCAAGTGGCGATGATGATCGTCAACTGCCAACGGTTAGCGACATCTCTGACCCGCTGTTTCTGAGC
CCAAAGACCGTCAATACTTATCGCTACCCTATTTTTGAAAAGCTCGCGGTACATTCTGACGTCGAATTGA
CCCATTGGGACTGCGCCATGGATTGGTAGACGGCTATCGACGCGAGGAAGAAGCCTGATCAACCATGAG
TTTGACGCCAAGCAATTCTCAAGACCGAAGTGCAGCACCCGGCGTCTATCGCATGCTCGACGACCGAGGC
GACACGCCCTTATATCGGCAAGGCCAAGCGCCTCAAAATCCCGCTTGGCTAGCTATTTCCGTGGCGCTCA
ATACCAAGACCCAGGCCCTTGGTGGCAGCTATCGCCGATATCGAAGTACGCTAACCCGACGCGAGACAGA
AGCCCTGTTGATGGAACAGGCGCTGATCAAGGAGCTCCGGCCGCTTACAACATTTTGTGCGTGTGATGAC
AAATCCTACCCTTTCGTATTCGTGAGGATCGTTCATCCTTATCCAGCACTAGAGCATTAAGCGAGCGCGCA
ATCGGCGCAGCGACGGTCTACCTGGGCCCTACCCAGCAGCGGTGCCGTGCGGAAAACCCCTGCTACT
GATGCAAAAGATCTTTCGCATCCGCAACTGCGAGGACAGTGTCTTCGGAAATCGCACCCGGCCATGCCGTG
CNTTTCAAAATCGAGGGAGANCAGCGCACCCCTGCGTCGAC

