

**Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología**



# **Comunicación intercelular bacteriana y su inhibición en ambientes salinos**

**Marta Torres Béjar  
Tesis Doctoral, 2017**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Marta Torres Béjar  
ISBN: 978-84-9163-504-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48125>

Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Marta  
Torres Béjar para aspirar al grado de Doctor

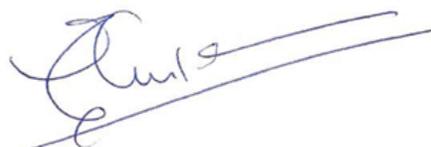
Granada, 2017

VºBº Las directoras



Fdo.: **Dra. Inmaculada Llamas  
Company**

Profesora Titular de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada



Fdo.: **Dra. Emilia Quesada  
Arroquia**

Catedrática de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada



**La doctoranda**

Fdo.: Marta Torres Béjar



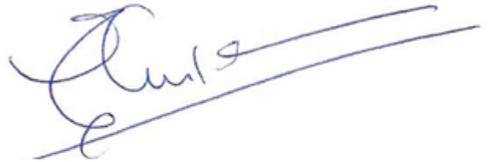
Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología

Las directoras de esta tesis y la doctoranda garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo nuestra dirección y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 2017



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



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



**La doctoranda**  
Fdo.: Marta Torres Béjar



Esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por las siguientes ayudas de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad:

Título: **Alternativa ecológica y sostenible para combatir la vibriosis en acuicultura: quorum sensing versus quorum quenching.** AGL2015-68806-R.

Investigadores principales: Inmaculada Llamas Company y Fernando Martínez-Checa Barrero.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional I+D+I.

Título: **Nueva estrategia para controlar las enfermedades infecciosas bacterianas en criaderos de moluscos: quorum sensing y quorum quenching.** AGL2009-07656.

Investigador principal: Inmaculada Llamas Company.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional I+D+I.

Título: **Nuevas estrategias para el cultivo y la caracterización de las bacterias que pueblan Rambla Salada (Murcia) y que no han podido ser aún cultivadas por métodos clásicos.** CGL2011-25748.

Investigador principal: Fernando Martínez-Checa Barrero.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional I+D+I.

Asímismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, la doctoranda ha disfrutado de las siguientes becas:

Beca: **Formación de Profesorado Universitario.**

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Duración: 15/09/2014-01/04/2017.

Beca: **Formación de Profesorado Universitario.**

Entidad financiadora: Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada.

Duración: 01/04/2013-14/09/2014.

Beca: **Estancias breves en centros extranjeros.**

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Duración: 01/04/2016-04/07/2016.

Lugar: Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Francia

Beca: **Movilidad Internacional para Jóvenes Investigadores de Doctorado.**

Entidad financiadora: CEIBioTic y Universidad de Granada.

Duración: 01/03/2015-01/06/2015.

Lugar: Université de Montpellier, Montpellier, Francia

Beca: **Movilidad Internacional para Estudiantes de Doctorado.**

Entidad financiadora: CEIBioTic y Universidad de Granada.

Duración: 01/05/2014-01/08/2014.

Lugar: Institut National de la Recherche Agronomique, Nancy, Francia

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones:

**Torres, M.,** Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Quesada, E., Llamas, I. 2016. **HqiA, a novel quorum-quenching enzyme expanding the family of AHL lactonases.** *Scientific Reports* (aceptado).

**Torres, M.,** Reina, J.C., Izquierdo, P., Fuentes-Monteverde, J.C., Fernández, G., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Quesada, E., Jiménez, C., Llamas, I. 2016. **The characterization of quorum sensing signal molecules and their correlation with virulence of three coral *Vibrio* pathogens is essential for understanding and controlling coral diseases.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Spec No: Quorum network (sensing/quenching) in multidrug-resistant pathogens* (en preparación).

**Torres, M.,** Rubio-Portillo, E., Antón, J., Quesada, E., Llamas, I. 2016. **Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture.** *Frontiers in Microbiology* 7: 646.

**Torres, M.,** Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., Llamas, I. 2013. ***N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures.** *Microbiological Research* 169: 547-554.

Y las siguientes comunicaciones orales en congresos:

**Torres, M.,** Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Llamas, I. **A novel quorum-quenching enzyme identified in a hypersaline soil.** 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Valencia, 2017.

**Torres, M.,** Rubio-Portillo, E., Chong, T. M., Hong, K. W., Chan, K.G., Dessaux, Y., Antón, J., Quesada, E., Llamas, I. **Aplicación en acuicultura de la cepa PQQ-42 de *Alteromonas stellipolaris*.** XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Alicante, 2016.

**Torres, M.,** Uroz, S., Quesada, E., Llamas, I. **Screening of the quorum quenching activity in a metagenomic library from a hypersaline-soil sample taken in Rambla Salada (Murcia, Spain).** 1<sup>st</sup> International Symposium on Quorum Sensing Inhibition. Galicia, 2015.

**Torres, M.,** Uroz, S., Quesada, E., Llamas, I. **Búsqueda de genes implicados en la comunicación bacteriana mediante un estudio**

**metagenómico.** XII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Miraflores, Madrid, 2014.

**Torres, M.,** Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., Llamas, I. Una nueva alternativa para combatir enfermedades infecciosas en la acuicultura basada en la interrupción de la comunicación celular. XI Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Alpujarra, Granada, 2013.

**Torres, M.,** Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., Llamas, I. **El ambiente marino como fuente de bacterias con actividad quorum quenching sobre microorganismos patógenos de peces y moluscos.** XXIII Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. Salamanca, 2011.

Así como también las siguientes comunicaciones en panel:

**Torres, M.,** Chong, T. M., Hong, K. W., Chan, K.G., Dessaux, Y., Llamas, I. **Genome analysis of two *Alteromonas stellipolaris* strains with quorum quenching activity.** 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Valencia, 2017.

**Torres, M.,** Reina, J. C., Izquierdo, P., Llamas I. **Correlation between virulence factors and quorum sensing signal molecules in three marine *Vibrio* pathogens.** 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Valencia, 2017.

**Torres, M.,** Llamas, I., Quesada, E., Béjar, V. **Plant grow promoting properties of *Bacillus velezensis* XT1, an halotolerant bacteria isolated from a saline soil located in south of Spain.** 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Valencia, 2017.

Rodríguez, M., Marín, A., **Torres, M.,** Sampedro, I., Fernández, L., Campos, M., Béjar, V. **Biopesticide activity of *Bacillus atrophaeus* strain L193 against *Rhopalosiphum padi*.** 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. Valencia, 2017.

Sampedro, I., **Torres, M.,** Llamas, I., Quesada, E. **Influencia de la quimiotaxis en la colonización de plantas de *Salicornia* por bacterias halófilas.** XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Alicante, 2016.

Marín, A., Fernández, L., **Torres, M.,** Campos, M., Béjar, V. **Actividad insecticida de cepas bacterianas aisladas de medios hipersalinos.**

XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Alicante, 2016.

**Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Applications in agriculture of a N-acylhomoserine lactone-degrading *Alteromonas* spp.** COST Action FA1405. Malaga, 2016.

**Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Interrupción de la comunicación intercelular en especies patógenas de *Vibrio*.** XXV Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. Logroño, 2015.

Reina, J. C., **Torres, M.**, Jiménez, C., Fuentes, J. C. Rodríguez, J., Quesada, E., Llamas, I. **Estudio de los sistemas de comunicación celular quorum sensing en bacterias patógenas marinas.** XXV Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. Logroño, 2015.

Rodríguez, M., Llamas, I., **Torres, M.**, Béjar, V., Quesada, E. **Nuevas cepas de *Bacillus*, con potencial actividad antifúngica y estimuladora del crecimiento vegetal aisladas en las Tablas de Daimiel.** XXV Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. Logroño, 2015.

**Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Potential biotechnological applications of two strains of *Alteromonas* with high quorum quenching activity.** 1<sup>st</sup> International Symposium on Quorum Sensing Inhibition. Galicia, 2015.

**Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Una alternativa a los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas en la acuicultura.** II Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada. Granada, 2014.

Reina, J. C., **Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Detección de sistemas quorum sensing en especies patógenas de *Vibrio*.** XII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Miraflores, Madrid, 2014.

Llamas, I., Toral, L., **Torres, M.**, Amjres, H., Bleda, A., Quesada, E., Béjar, V. **Taxonomía de cepas PGPR aisladas de hábitats salinos.** XV Reunión de Taxonomía, Filogenia y Diversidad de la Sociedad Española de Microbiología. Alcalá de Henares, 2014.

Llamas, I., **Torres, M.**, Reina, J. C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Quesada, E. **Identificación taxonómica de bacterias que interrumpen la comunicación celular quorum sensing en los patógenos marinos.**

XV Reunión de Taxonomía, Filogenia y Diversidad de la Sociedad Española de Microbiología. Alcalá de Henares, 2014.

**Torres, M.**, Quesada, E., Llamas, I. **Bacterias con actividad quorum quenching: una alternativa a los antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la acuicultura.** I Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada. Granada, 2013.

**Torres, M.**, Tahrioui, A., Bejar, V., Quesada, E., Llamas, I. **Quorum sensing en los microorganismos que causan el “mal rojo” del bacalao.** XXIV Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. L’Hospitalet, 2013.

Béjar, V., Ramos, D., **Torres, M.**, Fuente, J. I., Martínez, O., Plata, P., Llamas, I. **Caracterización e identificación de la microbiota de bacalao en salazón afectados del mal rojo.** XXIV Congreso Nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología. L’Hospitalet, 2013.

**Torres, M.**, Tahrioui, A., Quesada, E., Llamas, I. **Interference in the quorum-sensing system of pathogenic vibrios for fish and mollusks.** 9<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles. Sevilla, 2012.





**A mis padres  
A mis hermanos  
A mis abuelos  
A Antoine  
Por estar siempre cerca**



**Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica, adquiere el aprendizaje preciso y, por todos los medios, hazlo. Dificilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobretodo, tal sentido de logro.**

Severo Ochoa, 1905-1993



## Índice

Índice de figuras	21
Índice de tablas	25
Abreviaturas	27
Resumen	29
Summary	31
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>33</b>
1.1. Sistemas de comunicación intercelular de tipo quorum sensing	35
1.1.1. Moléculas señal o autoinductores	37
1.1.2. Utilización de biosensores para determinar la producción de moléculas señal	39
1.1.3. Funciones celulares que controlan los sistemas quorum sensing	39
1.2. Mecanismos de interrupción de los sistemas quorum sensing	40
1.2.1. Interferencia con el receptor de las moléculas señal	41
1.2.2. Inhibición de la síntesis de las moléculas señal	41
1.2.3. Inactivación enzimática de las moléculas señal	42
1.3. Enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura	44
1.4. Blanqueamiento de los corales	47
1.5. Inhibición de la comunicación intercelular en bacterias patógenas marinas	48
1.6. Inhibición de la comunicación intercelular bacteriana en ambientes salinos	50
1.7. Otras aplicaciones de la inhibición de la comunicación intercelular bacteriana.	51
<b>2. OBJETIVOS/OBJECTIVES</b>	<b>57</b>
2.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de interferir o inhibir los sistemas quorum sensing	57
2.2. Búsqueda de enzimas quorum quenching en ambientes salinos mediante técnicas de ecología molecular	57
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
3.1. Cepas bacterianas y su conservación	63
3.2. Plásmidos y fósmidos	65
3.3. Suelos, aguas y sedimentos salinos	66
3.4. Medios de cultivo	70
3.5. Antimicrobianos	71
3.6. Moléculas AHLs	71
3.7. Otras soluciones	71
3.8. Técnicas para el estudio de la actividad quorum quenching	73
3.8.1. Ensayo de difusión en placa para la detección de moléculas AHLs	73
3.8.2. Ensayo de la actividad quorum quenching	73
3.8.3. Análisis de moléculas AHLs mediante TLC	75
3.8.4. Análisis de moléculas AHLs mediante HPLC/MS y HPLC/HRMS	76
3.8.5. Determinación de actividad enzimática tipo acilasa o lactonasa	77
3.8.6. Localización de la actividad quorum quenching	77

3.8.7. Ensayo de antagonismo	78
3.8.8. Cocultivos <i>in vitro</i> entre cepas QQ y bacterias patógenas	78
3.8.9. Caracterización y ensayos <i>in vitro</i> de la enzima de quorum quenching purificada	78
3.8.10. Evaluación fenotípica tras la pérdida de AHLs	79
3.8.11. Ensayos <i>in vivo</i> entre cepas QQ y bacterias patógenas	80
3.9. Técnicas moleculares	
3.9.1. Extracción de ADN y determinación de su concentración	82
3.9.2. Reacción de amplificación de ADN en cadena	82
3.9.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	83
3.9.4. Recuperación de ADN de geles de agarosa	
3.9.5. Digestión de ADN con enzimas de restricción	85
3.9.6. Reacción de ligación de ADN	85
3.9.7. Transformación de células	86
3.9.8. Conjugación	87
3.9.9. Construcción de una librería metagenómica y búsqueda de genes con actividad quorum quenching	87
3.9.10. Secuenciación, tratamiento y análisis de secuencias	92
3.9.11. Expresión y purificación de proteínas	93
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	97
4.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de interferir o inhibir los sistemas quorum sensing	99
4.1.1. Resumen	101
4.1.1. Summary	103
4.1.2. Resultados	105
4.1.2.1. Selección de bacterias con actividad quorum quenching en un criadero de moluscos de Lugo	105
4.1.2.2. Selección de bacterias con actividad quorum quenching en un criadero de peces y moluscos de Granada	115
4.1.3. Discusión	135
4.2. Búsqueda de enzimas quorum quenching en ambientes salinos mediante técnicas de ecología molecular	145
4.2.1. Resumen	147
4.2.1. Summary	149
4.2.2. Resultados	151
4.2.2.1. Búsqueda de genes de quorum quenching en ambientes salinos mediante PCR	151
4.2.2.2. Búsqueda de genes de quorum quenching mediante una aproximación metagenómica	151
4.2.3. Discusión	169
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b>	177
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	183

## Índice de figuras

Figura 1. Eupryma scolopes, organismo que vive en simbiosis con la bacteria <i>Aliivibrio fischeri</i> .	35
Figura 2. Esquema del sistema quorum sensing en <i>Aliivibrio fischeri</i> .	36
Figura 3. Estructura química y tipo de transporte a través de la membrana celular de algunas moléculas AHLs.	38
Figura 4. Tipos de inactivación enzimática de una molécula AHL.	42
Figura 5. Ejemplos de organismos criados por acuicultura: algas, moluscos, peces y corales.	44
Figura 6. Consumo anual <i>per capita</i> de pescado y contribución relativa de la acuicultura y la pesa de captura al pescado para consumo humano.	45
Figura 7. Enfermedades producidas por <i>Vibrio</i> spp.	46
Figura 8. Ensayo de difusión en placa microtiter de la actividad quorum quenching.	74
Figura 9. Ensayo de difusión en placa Petri de la actividad quorum quenching.	74
Figura 10. Detección de AHLs remanentes y realización de pruebas fenotípicas tras las realización de ensayos de cocultivo <i>in vitro</i> .	79
Figura 11. Larvas de <i>Venerupis corrugata</i> vivas (a) y muertas (b) observadas al microscopio óptico.	80
Figura 12. Esquema de la inoculación de corales en el ensayo <i>in vivo</i> con una cepa con actividad quorum quenching y <i>Vibrio</i> sp.	81
Figura 13. Separación de ADN en un gradiente de sacarosa mediante ultracentrifugación con un rotor de tipo swinging.	88
Figura 14. Perforación del tubo y recogida de fracciones de la muestra de ADN tras la ultracentrifugación.	89
Figura 15. Esquema de la construcción de la librería metagenómica.	89
Figura 16. Ensayo en placa microtiter de la actividad quorum sensing y quorum quenching de los clones de la librería metagenómica.	90
Figura 17. Esquema de la expresión y purificación de proteínas.	94
Figura 18. Ensayo de difusión en pocillos de la actividad degradadora de cepas marinas aisladas de un criadero de Lugo.	106
Figura 19. Evaluación de la producción y degradación de AHLs de la cepa PP2-663.	106
Figura 20. Cuantificación mediante HPLC de las AHLs remanentes tras los ensayos de quorum quenching con las cepas seleccionadas del criadero de Lugo.	109
Figura 21. Análisis por TLC de la actividad degradadora de PP2-459 frente a los extractos de AHLs de <i>Halomonas anticariensis</i> FP35 <sup>T</sup> y de <i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264 <sup>T</sup> .	111
Figura 22. Ensayo de la actividad QQ del sobrenadante y extracto celular crudo de la cepa PP2-459.	111
Figura 23. Cuantificación mediante HPLC de AHLs tras la acidificación de las reacciones quorum quenching con las cepas seleccionadas en el criadero de Lugo.	112
Figura 24. Ensayo de antagonismo de las cepas PP2-459 y PP2-663 sobre cepas patógenas de <i>Vibrio</i> spp.	113
Figura 25. Porcentajes de mortalidad larvaria registrados a las 48 horas en los ensayos <i>in vivo</i> .	114

Figura 26. Ensayo en placas microtiter de la actividad degradadora de AHLs de las cepas marinas aisladas de un criadero de Granada.	115
Figura 27. Ensayo de difusión en placa Petri de la actividad degradadora de AHLs de las cepas marinas aisladas de un criadero de Granada.	116
Figura 28. Distinta morfología de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 de <i>Alteromonas stellipolaris</i> en medio sólido y líquido.	117
Figura 29. Confirmación mediante HPLC de la actividad degradadora de AHLs de las cepas seleccionadas en un criadero de Granada.	119
Figura 30. Actividad degradadora de AHLs en las cepas PQQ-42 (a) y PQQ-44 (b) a las 15, 24 y 48 h de incubación mediante un ensayo de difusión en placa Petri.	120
Figura 31. Análisis por TLC de las moléculas señal producidas por las cepas patógenas de <i>Vibrio</i> spp.	121
Figura 32. Degradación <i>in vitro</i> de extractos de moléculas AHLs de cepas patógenas de <i>Vibrio</i> spp. por parte de las cepas PQQ-42 y PQQ-44.	123
Figura 33. Ensayo de la actividad quorum quenching del sobrenadante y extracto celular de la cepa PQQ-42.	124
Figura 34. Determinación de AHLs remanentes en las reacciones de quorum quenching de la cepa PQQ-42 con y sin acidificación.	125
Figura 35. Estructura tridimensional de la enzima PvdQ.	126
Figura 36. Comparación de los genomas de las cepas PQQ-42 y PQQ-44.	126
Figura 37. ORFs del clúster de síntesis un péptido no ribosomal encontrado en el genoma de la cepa PQQ-42.	127
Figura 38. Predicción de la estructura del péptido no ribosomal encontrado en el genoma de la cepa PQQ-42.	127
Figura 39. Ensayo de antagonismo de la cepa PQQ-42 sobre cepas patógenas de <i>Vibrio</i> spp.	129
Figura 40. Morfología de colonias de <i>Vibrio</i> sp. en medio TCBS y AM y de la cepa PQQ-42 en medio AM.	130
Figura 41. Disminución de algunos fenotipos en <i>Vibrio mediterranei</i> VibC-Oc-097 tras el cocultivo con la cepa PQQ-42.	130
Figura 42. Fragmentos del coral <i>Oculina patagonica</i> con distinta extensión de blanqueamiento tras 10 días de tratamiento.	132
Figura 43. Niveles de clorofila <i>a</i> en el coral <i>Oculina patagonica</i> a los 5 y 10 días de inoculación con los distintos tratamientos.	133
Figura 44. Recuentos de <i>Vibrio mediterranei</i> VibC-Oc-097 en el tejido del coral <i>Oculina patagonica</i> a los 5 y 10 días de inoculación con los distintos tratamientos.	134
Figura 45. Recuentos de <i>Vibrio mediterranei</i> VibC-Oc-097 en el agua de los acuarios con <i>Oculina patagonica</i> con los distintos tratamientos.	134
Figura 46. Determinación de la actividad quorum quenching conferida por el fósido f10/17.1H.	152
Figura 47. Confirmación de la actividad quorum quenching del fósido f10/17.1H.	153
Figura 48. Distribución de ORFs en el inserto del fósido f10/17.1H.	154
Figura 49. Análisis filogenético del ORF6 del fósido f10/17.1H.	157
Figura 50. Análisis filogenético y agrupación de <i>hqiA</i> en el clúster de las enzimas cisteína hidrolasas con otras proteínas hipotéticas (HYPO), isocorismatasas (ISO) y N-carbamoylsarcosina amidasas (NCAR).	159
Figura 51. Expresión y purificación de HqiA.	160

Figura 52. Determinación de la actividad degradadora de la enzima purificada HqiA.	161
Figura 53. Detección por HPLC/MS del producto C <sub>12</sub> -HS tras el ensayo de degradación de la proteína purificada HqiA con la molécula C <sub>12</sub> -HSL.	162
Figura 54. Estructura tridimensional de enzimas quorum quenching de tipo lactonasa.	163
Figura 55. Influencia de la expresión de <i>hqiA</i> en algunos fenotipos de <i>Vibrio coralliilyticus</i> VibC-Oc-193.	164
Figura 56. Influencia de la expresión de <i>hqiA</i> sobre la virulencia de <i>Pectobacterium carotovorum</i> CECT 225 <sup>T</sup> sobre patatas.	165
Figura 57. Influencia de la expresión de <i>hqiA</i> en algunos fenotipos de <i>Pectobacterium carotovorum</i> CECT 225 <sup>T</sup> .	166
Figura 58. Influencia de la expresión de <i>hqiA</i> sobre la virulencia de <i>Agrobacterium fabrum</i> C58 sobre plantas de lechuga.	167



## Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de tipos de moléculas señal o autoinductores.	37
Tabla 2. Moléculas señal AHLs y funciones celulares que regulan en bacterias Gram negativas.	40
Tabla 3. Sistemas quorum sensing de bacterias patógenas del medio acuático.	49
Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características.	63
Tabla 5. Plásmidos y fósmidos utilizados en este trabajo y sus características.	65
Tabla 6. Muestras de suelos, aguas y sedimentos salinos usados en este trabajo.	66
Tabla 7. Primers utilizados en este trabajo y su función.	84
Tabla 8. Actividad quorum quenching frente AHLs sintéticas de las cepas seleccionadas en el criadero de Lugo e identificación taxonómica.	108
Tabla 9. Actividad quorum quenching frente AHLs sintéticas de las cepas seleccionadas en el criadero de Granada e identificación taxonómica.	118
Tabla 10. Cuantificación mediante HPLC/HRMS de las AHLs de las tres cepas de <i>Vibrio</i> spp. seleccionadas.	122
Tabla 11. Identificación de la función hipotética de los ORFs del clúster de síntesis de PNR de la cepa PQQ-42.	128
Tabla 12. Fenotipos de <i>Vibrio</i> spp. en cultivo puro y tras el cocultivo con la cepa PQQ-42.	131
Tabla 13. Homología de las proteínas codificadas por los ORFs del fosmido f10/17.1H.	155



## Abreviaturas

<b>AI-1</b>	autoinductor tipo 1
<b>AI-2</b>	autoinductor tipo 2
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>Ap</b>	ampicilina
<b>AHLs</b>	acilhomoserin lactonas
<b>AM</b>	agar marino
<b>CLB</b>	tampón de lisis celular
<b>CM</b>	caldo marino
<b>CCE</b>	extracto celular crudo
<b>Cm</b>	cloranfenicol
<b>CShasas</b>	cisteína hidrolasas
<b>DKPs</b>	diketopiperazinas
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>EMBL</b>	laboratorio europeo de biología molecular
<b>FAO</b>	Organización para la Agricultura y Alimentación de la ONU
<b>Gm</b>	gentamicina
<b>HGT</b>	transferencia horizontal de genes
<b>HqiA</b>	isocorismatasa QQ de un ambiente hipersalino
<b>HRMS</b>	espectrometría de masas de alta resolución
<b>HSL</b>	homoserín lactona
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -galactopiranosido
<b>kD</b>	kilodalton
<b>Km</b>	kanamicina
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MBP</b>	proteína de unión a maltosa
<b>Mpb</b>	mega pares de bases
<b>MCS</b>	sitio multi-clonación
<b>MS</b>	espectrometría de masas
<b>MTAN</b>	5'-metiltioadenosina nucleotidasa
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para Información Biotecnológica
<b>O-CAS</b>	sobrecapa de cromoazurol sulfonato
<b>ORF</b>	marco abierto de lectura
<b>PBS</b>	buffer fosfato
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PNR</b>	péptido no ribosomal
<b>p/v</b>	relación peso/volumen
<b>QQ</b>	quorum quenching
<b>QS</b>	quorum sensing
<b>QSI</b>	inhibidor de quorum sensing
<b>RAST</b>	anotación rápida de genomas con tecnología subsistema
<b>Rif</b>	rifampicina
<b>RT-PCR</b>	PCR con transcriptasa inversa
<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>SFSW</b>	agua de mar filtrada y esterilizada

<b>SFSWYE</b>	agua de mar filtrada y esterilizada con extracto de levadura
<b>SIM</b>	monitorización selectiva de iones
<b>Sm</b>	estreptomicina
<b>SMRT</b>	secuenciación a tiempo real de una única molécula
<b>SPE</b>	extracción en fase sólida
<b>Tc</b>	tetraciclina
<b>TCBS</b>	tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
<b>TE</b>	tris-ácido etilendiaminotetraacético
<b>TEV</b>	virus del mosaico del tabaco
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colonias
<b>v/v</b>	relación volumen/volumen
<b>wt</b>	cepa silvestre
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Resumen

Las enfermedades infecciosas bacterianas que afectan a la acuicultura constituyen un serio problema en todo el mundo y causan enormes pérdidas económicas en el sector. Para su prevención se han usado durante muchos años los antibióticos, lo que ha provocado la aparición de muchas resistencias y con ello, que los tratamientos no sean efectivos. Se ha demostrado que un gran número de especies patógenas bacterianas poseen sistemas de comunicación intercelular de tipo quorum sensing (QS) mediados por moléculas señal, con las que regulan distintas funciones celulares, entre las que se encuentran la producción de factores de virulencia. Debido a ello, hoy en día la alternativa más novedosa para tratar las enfermedades infecciosas en la acuicultura es la interrupción de los mecanismos QS de las bacterias patógenas. Entre las distintas estrategias que existen para interferir los sistemas QS se encuentra la degradación de las moléculas señal, lo que se conoce como quorum quenching (QQ).

En este estudio presentamos la selección y caracterización de cepas con actividad QQ a partir de dos colecciones de 146 y 450 aislados marinos procedentes de criaderos de peces y moluscos de Lugo y Granada. Las cepas de mayor actividad QQ han dado muy buenos resultados en ensayos *in vivo* en moluscos y corales frente a patógenos marinos cuyas moléculas señal han sido caracterizadas por primera vez y de forma paralela en este trabajo.

En esta tesis también se ha abordado la búsqueda de nuevas enzimas de QQ en suelos salinos utilizando técnicas de ecología molecular. Así, a partir de una librería metagenómica de un suelo salino constituida por 250.000 clones se ha identificado un único clon con capacidad de degradar moléculas señal. La caracterización genética y química de este clon ha permitido la identificación de una nueva clase de enzima QQ no relacionada con otros tipos de enzimas descritos previamente. Esta enzima ha sido probada *in vivo* frente a bacterias patógenas tanto del sector de la acuicultura como de la agricultura, y se han obtenido resultados muy prometedores. Se reivindica así la interferencia de la comunicación intercelular bacteriana como una estrategia eficaz para combatir las enfermedades en la acuicultura.



## Summary

***Bacterial infectious diseases affecting aquaculture are a serious problem worldwide and cause enormous economic losses in the sector. For their prevention, antibiotics have been used during many years, which has resulted in the emergence of many resistances and in treatments becoming ineffective. It has been demonstrated that a large number of bacterial pathogenic species have quorum sensing intercellular communication systems (QS) mediated by signal molecules, with which they regulate different cellular functions, among which are the production of virulence factors. Because of this, today the most novel alternative to treat infectious diseases in aquaculture is the interruption of the QS mechanisms of pathogenic bacteria. Among the different strategies that exist to interfere with QS systems are the degradation of signal molecules, known as quorum quenching (QQ).***

***In this study we present the selection and characterization of strains with QQ activity from two collections of 146 and 450 marine isolates from Lugo and Granada fish and mollusk hatcheries. The strains with higher QQ activity have shown very good results in vivo on molluscs and corals against marine pathogens whose signal molecules have been characterized for the first time and in a parallel manner in this work.***

***This thesis has also addressed the search for new QQ enzymes in saline soils using molecular ecology techniques. Thus, a single clone capable of degrading signal molecules has been identified in a metagenomic library of saline soil of 250,000 clones. The genetic and chemical characterization of this clone has allowed the identification of a new class of QQ enzyme unrelated to other types of enzymes previously described. This enzyme has been tested in vivo against pathogenic bacteria both of the aquaculture and agriculture sectors, and very promising results have been obtained. The interference of bacterial intercellular communication is thus advocated as an effective strategy to combat diseases in aquaculture.***



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Sistemas de comunicación intercelular de tipo quorum sensing

“Un grupo o asociación de bacterias es más fuerte que una bacteria sola y por tanto, es capaz de superar obstáculos impensables para la bacteria aislada”. En 1905, el pionero patólogo de plantas E. F. Smith se arriesgó al hacer esta afirmación, ya que en esa época la mayoría de los microbiólogos consideraban que las bacterias eran organismos unicelulares que vivían aislados unos de otros. Hoy en día se sabe que las células bacterianas están continuamente interactuando entre ellas y que poseen mecanismos de comunicación para llevar a cabo un comportamiento social y coordinar muchas de sus funciones celulares (Williams *et al.*, 2007).

Existen distintos tipos de comunicación entre las bacterias y entre éstas y los organismos eucariotas. El primer mecanismo de comunicación intercelular descrito se conoce como quorum sensing (QS). Este término fue acuñado por primera vez en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994), aunque fue previamente descrito en 1970 (Nealson *et al.*, 1970). El mecanismo QS se puede definir como una modalidad de comunicación intercelular bacteriana en la que la expresión de ciertos genes depende de los valores de densidad celular presentes en el medio, y está mediada por la difusión de moléculas señales o autoinductores. Este fenómeno se basa en la acumulación de moléculas señal en el medio extracelular que, al alcanzar un valor crítico, controlan la expresión de numerosos genes (González y Keshavan, 2006; Jayaraman y Wood, 2008).

El primer organismo donde se describió esta forma de regulación de genes fue *Aliivibrio fischeri*, una bacteria marina luminiscente que vive en simbiosis con varios hospedadores marinos como el calamar *Eupryma scolopes* (Fig. 1). Curiosamente la bacteria se acumula por la noche en los órganos visuales de este animal y cuando alcanza una población suficiente se activa el gen de la luciferasa que produce luz. El calamar proporciona nutrientes a la bacteria y ésta a cambio genera luz que le sirve al calamar para atraer presas o alejar depredadores.



Figura 1. *Eupryma scolopes*, organismo que vive en simbiosis con la bacteria *Aliivibrio fischeri*.

Hoy en día se ha descrito la existencia de sistemas de comunicación intercelular en numerosos microorganismos, muchos de ellos patógenos, y también las funciones celulares que regulan. Un ejemplo lo encontramos en el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, en el que la capacidad de formación de biofilms sobre catéteres o implantes médicos no tiene lugar hasta que la bacteria se encuentra en alta concentración, siendo el biofilm la causa de la resistencia de muchas infecciones al tratamiento con antimicrobianos (Popat *et al.*, 2012).

A nivel molecular los sistemas de quorum sensing se componen generalmente de dos genes. Uno de ellos es el gen que codifica la enzima sintasa, que sintetiza las moléculas señal, y el otro es un gen regulador transcripcional, que actúa como receptor de las moléculas y regula la expresión de otros genes.

El organismo modelo de estudio ha sido *A. fischeri*, cuyos genes sintasa y regulador transcripcional se denominan *luxI* y *luxR* respectivamente. La síntesis de los niveles basales de moléculas tiene lugar a bajas densidades celulares, semejantes a las encontradas en el agua de mar. La mayoría de estos autoinductores pasan a través de la membrana celular mediante difusión, por lo que a medida que aumenta la densidad celular, durante la asociación de simbiosis con el hospedador, se acumulan estas moléculas en el interior y alrededor de las células. Cuando se alcanzan los niveles umbrales de autoinductores, el regulador transcripcional LuxR se activa presumiblemente por unión con el autoinductor y el complejo formado induce la expresión bidireccional del operón *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 feedback positivo, como la generación de luminiscencia (Fig. 2) (Fuqua *et al.*, 2001).

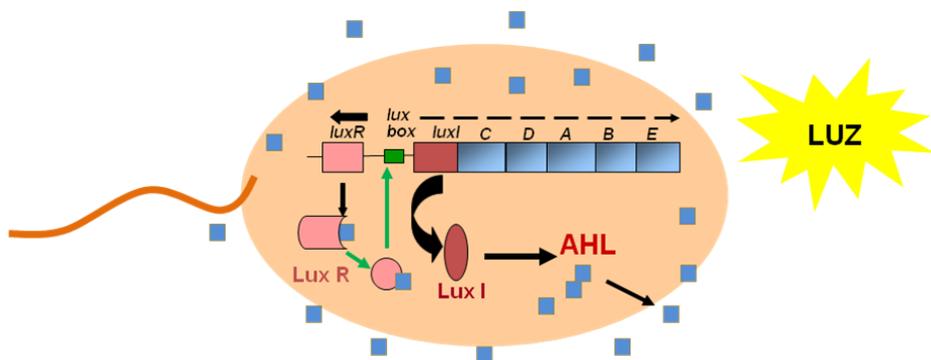
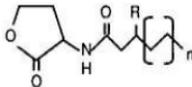
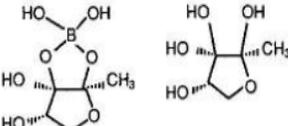
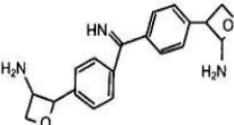
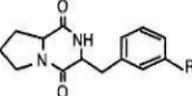
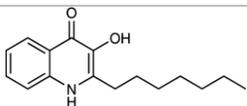


Figura 2. Esquema del sistema quorum sensing en *Aliivibrio fischeri*.

### 1.1.1. Moléculas señal o autoinductores

Existen distintos tipos de moléculas señal, como es el caso de las DKPs (diketopiperazinas), las AI-2 (de tipo furanosil borato diéster), las AI-1 (de tipo péptido, utilizadas por las bacterias Gram positivas) y las PQS (de tipo quinolona) (Tabla 1). Sin embargo, las más estudiadas hasta el momento son del tipo *N*-acil homoserin lactonas (AHLs) ya que son las más abundantes en las bacterias Gram negativas, y dentro de ellas, muchas bacterias patógenas (González y Keshavan, 2006).

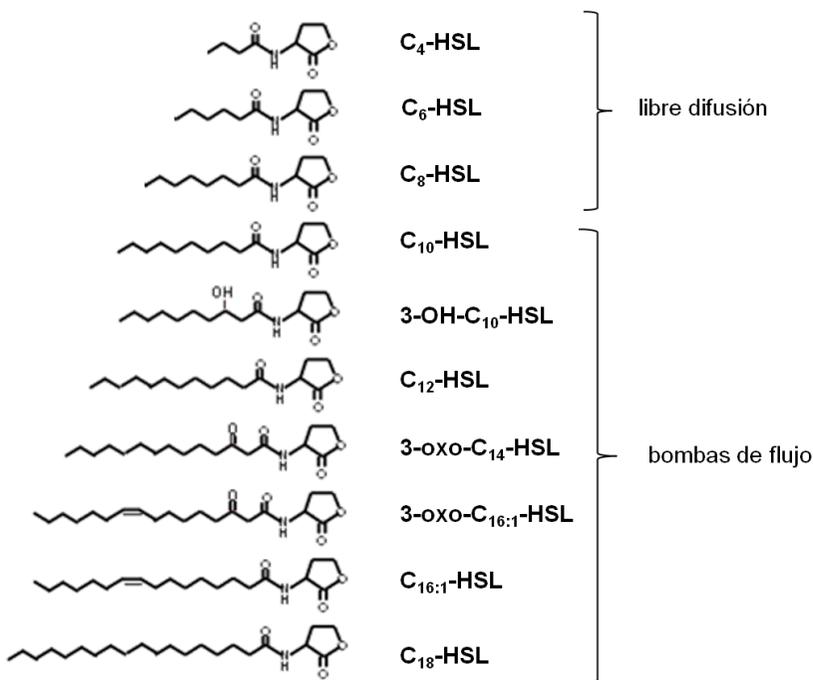
**Tabla 1. Ejemplos de tipos de moléculas señal o autoinductores.**

Autoinductor	Estructura general	Especies productoras
AHL		Numerosas bacterias Gram negativas
AI-2		<i>Vibrio harveyi</i> , <i>Salmonella enterica</i>
Bradioxetina		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
DKPs		<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. alkaligenes</i>
DSF		<i>Xanthomonas campestris</i>
PQS		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Las moléculas AHLs están compuestas por un anillo lactónico (parte hidrofílica) y un ácido graso (parte hidrofóbica) cuya cadena hidrocarbonada 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 (Fig. 3). La naturaleza de la estructura de los ácidos grasos determina la especificidad para ser reconocido por el regulador

transcripcional LuxR y condiciona su fluidez a través de la membrana celular. De forma general, las AHLs con más de 8 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada necesitan bombas de flujo para entrar y salir de la célula, mientras que las AHLs de menor número de átomos de carbono pueden pasar por libre difusión (Fuqua *et al.*, 2001).

Las moléculas AHLs intervienen en los procesos de comunicación de bacterias de la misma especie. De hecho, la especificidad en la interacción AHL-LuxR es fundamental para que la bacteria pueda distinguir los autoinductores producidos por células de su propia especie de los sintetizados por otras.



**Figura 3. Estructura química y tipo de transporte a través de la membrana celular de algunas moléculas AHLs.**

Por su parte, las moléculas de tipo furanosil borato diéster (AI-2) no son específicas y por ello intervienen en la comunicación entre especies diferentes (Lowery *et al.*, 2008). Se ha demostrado que estas moléculas controlan la producción de luz en *Vibrio harveyi*; la expresión de genes de virulencia en *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus pyogenes*; la adquisición de hierro en *Porphyromonas gingivalis*; la producción de antibióticos en *Photobacterium luminescens*; la motilidad en *Campylobacter jejuni* y la formación de biofilms en especies tan

diferentes como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus gordonii* (Xavier y Bassler, 2003).

### **1.1.2. Utilización de biosensores para determinar la producción de moléculas señal**

Para determinar si un microorganismo sintetiza moléculas señal, y por tanto si tiene sistemas de regulación de genes dependientes de la densidad celular, se utilizan microorganismos llamados biosensores. Son bacterias mutantes incapaces de producir moléculas señal pero que sí pueden detectar las producidas por otros microorganismos. En estas bacterias el gen sintasa está afectado mientras que el gen regulador transcripcional está intacto y lleva acoplado un sistema de detección por lo que reconoce las moléculas señal exógenas y genera una señal visible como un color o bioluminiscencia.

Los biosensores clásicos más utilizados para la detección de moléculas AHLs son cepas mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Chromobacterium violaceum*. La cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) tiene unido el gen *lacZ* a uno de los genes del operón *tra* (*traG::lacZ*), que codifica la transferencia de plásmidos en esta bacteria. Este operón es inducible por AHLs, por lo que en presencia de moléculas exógenas y el sustrato X-gal, la bacteria produce color azul. Esta cepa detecta moléculas AHLs de cadena media y larga (Shaw *et al.*, 1997).

Por su parte, las cepas CV026 y VIR07 de *C. violaceum* son mutantes *cvii* que han perdido la capacidad natural de producir un pigmento púrpura violáceo, que normalmente se sintetiza en respuesta a AHLs. Cuando estas cepas están en contacto con un organismo productor de dichas moléculas señal se visualiza de forma rápida por el color púrpura natural que producen. Las AHLs que detecta CV026 son C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL y 3-O-C<sub>6</sub>-HSL y las que detecta VIR07 son C<sub>10</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL (McClellan *et al.*, 1997; Morohoshi *et al.*, 2008).

### **1.1.3. Funciones celulares que controlan los sistemas quorum sensing**

Los sistemas QS se han estudiado en numerosas especies bacterianas y en muchas de ellas se han identificado las moléculas señal AHLs que producen. Además, en algunas de estas bacterias se han descrito las funciones celulares que controla el sistema QS: motilidad, producción de antibióticos y exoenzimas, formación de biofilms, producción de exopolisacáridos, etc., siendo muchas de estas funciones factores de virulencia (Tabla 2) (de Kievit e Iglewski, 2000; Quiñones *et*

*al.*, 2005). No obstante, aún hay un gran número de especies bacterianas en las que no se conoce aún las funciones reguladas por los sistemas de comunicación interceluar tipo QS.

**Tabla 2. Moléculas señal AHLs y funciones celulares que regulan en bacterias Gram negativas.**

Bacteria	Moléculas señal	Función regulada por QS
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-O-C <sub>8</sub> -HSL	Conjugación
<i>Aliivibrio fischeri</i>	3-O-C <sub>6</sub> -HSL	Bioluminiscencia
<i>Halomonas anticariensis</i>	C <sub>4</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL, C <sub>8</sub> -HSL, C <sub>12</sub> -HSL	Desconocida
<i>Pantoea stewartii</i>	3-O-C <sub>6</sub> -HSL	Producción de exopolisacáridos
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>8</sub> -HSL	Producción de exoenzimas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C <sub>4</sub> -HSL, 3-O-C <sub>12</sub> -HSL	Producción de exoenzimas y biofilms
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	3-O-C <sub>6</sub> -HSL	Síntesis del antibiótico fenacina
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3-OH-C <sub>14:1</sub> -HSL	Nodulación, producción de bacteriocinas
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C <sub>8</sub> -HSL, 3-O-C <sub>8</sub> -HSL, 3-OH-C <sub>8</sub> -HSL, 3-O-C <sub>14</sub> -HSL, C <sub>16</sub> -HSL, C <sub>16:1</sub> -HSL, C <sub>18</sub> -HSL	Producción de exopolisacáridos

Tal y como se muestra en la Tabla 2 una bacteria puede producir una o varias AHLs y distintas bacterias pueden producir la misma AHL. Esta propiedad es muy interesante para poder interrumpir la comunicación celular, como se explicará más adelante.

## 1.2. Mecanismos de interrupción de los sistemas quorum sensing

Como ya se ha expuesto anteriormente, los sistemas quorum sensing controlan numerosas e importantes funciones de los microorganismos en la naturaleza. Debido a ello, muchos de los organismos competidores, tanto procariotas como eucariotas, han desarrollado diferentes estrategias con el fin de interferir o interrumpir los sistemas de comunicación celular quorum sensing (Taga y Bassler, 2003; Defoirdt *et al.*, 2008; Uroz *et al.*, 2009). Se han descrito sistemas de

interrupción de QS en hongos, animales, plantas y bacterias (Dong *et al.*, 2000; Hentzer *et al.*, 2002; Uroz *et al.*, 2003; Uroz y Heinonsalo, 2008; Kalia y Purohit, 2011). Entre las posibles estrategias de interferencia de QS destacamos las que se describen en los siguientes apartados:

### **1.2.1. Interferencia con el receptor de las moléculas señal**

Algunos organismos producen compuestos de estructura similar a las moléculas señal que interfieren en su detección por parte del regulador transcripcional (LuxR). A estos compuestos se les denomina “inhibidores de quorum sensing” (QSI). La primera molécula inhibidora descrita fue una furanona halogenada producida por el alga marina *Delisea pulchra* (Manefield *et al.*, 1999), que protege a distintos organismos de infecciones por vibrios (Givskov *et al.*, 1996; Rasch *et al.*, 2004). Del mismo modo, la adición de otro tipo de furanona protege al alga roja *Gracilaria corticata* de la enfermedad de blanqueamiento producida por *Vibrio* spp. (Tanwar *et al.*, 2013). Sin embargo, la concentración necesaria de furanonas resulta tóxica y su uso está muy limitado. Posteriormente se ha demostrado que ciertos extractos de invertebrados marinos del Gran Arrecife de Coral (Skindersoe *et al.*, 2008) y cianobacterias halladas en aguas de Florida (Dobretsov *et al.*, 2009) contienen compuestos que inhiben también los sistemas QS. Asimismo, se ha demostrado que el 24 % de una colección de productos naturales procedentes de invertebrados marinos, plantas terrestres, hongos y cianobacterias actúan como antagonistas de los sistemas QS sin inducir toxicidad (Dobretsov *et al.*, 2011). Entre las bacterias, algunas producen dipéptidos con estructura similar a las moléculas AHLs y afectan la comunicación celular (Holden *et al.*, 1999).

### **1.2.2. Inhibición de la síntesis de las moléculas señal**

Otra forma de bloquear o interferir el mecanismo QS es inhibiendo la producción de las moléculas señal. El uso de moléculas análogas a la S-adenosil metionina (SAM), que es uno de los sustratos de la sintasa LuxI, inhibe la síntesis de moléculas AHLs (Parsek *et al.*, 1999). Posteriormente se han descrito una serie de compuestos análogos a la 5'-metiltioadenosina nucleotidasa (MTAN), que es una enzima involucrada en la síntesis de SAM. La utilización *in vitro* de uno de estos compuestos ha provocado la inhibición del sistema QS y la disminución de la producción de biofilm en el patógeno *Vibrio cholerae* (Gutierrez y Crowder, 2009).

### 1.2.3. Inactivación enzimática de las moléculas señal

Una tercera estrategia para interferir la comunicación bacteriana es la degradación o inactivación enzimática de los autoinductores o moléculas señal, con lo cual se impide que éstas se puedan unir a la proteína LuxR y la activen. Este tipo de mecanismo se conoce como quorum quenching (QQ), aunque algunos autores utilizan este término para referirse al conjunto de estrategias de interferencia de QS (Zhang, 2003). En este caso, la acción es a nivel extracelular y no intracelular, como en el caso de los QSI (Bzdrenga *et al.*, 2016).

Hasta la fecha se han identificado varios tipos de enzimas degradadoras de moléculas señal de tipo AHLs según su mecanismo de acción, como las oxidasas, oxidoreductasas, lactonasas y acilasas. Todas estas enzimas alteran la estructura de las AHLs de forma que éstas ya no son reconocidas por el regulador transcripcional LuxR y no pueden actuar como moléculas señal.

Las lactonasas pueden pertenecer a dos familias, las metalohidrolasas de zinc (que incluyen a las fosfotriesterasas) y las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (con un único miembro, AidH) (Mei *et al.*, 2010). Estas enzimas actúan rompiendo del anillo lactónico de las AHLs, dando lugar a una cadena *N*-acil homoserina. Las acilasas o amidasas hidrolizan irreversiblemente el enlace amido y desdoblan la molécula en el correspondiente ácido graso y la homoserin lactona. Las oxidoreductasas no degradan la molécula AHLs, sino que actúan oxidando o reduciendo su cadena acil, modificando su estructura química. En cuanto a las oxidasas, únicamente pueden oxidar la cadena acil, pero no tienen capacidad de reducirla (Fig. 4) (Dong *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2009) (Dong *et al.*, 2007).

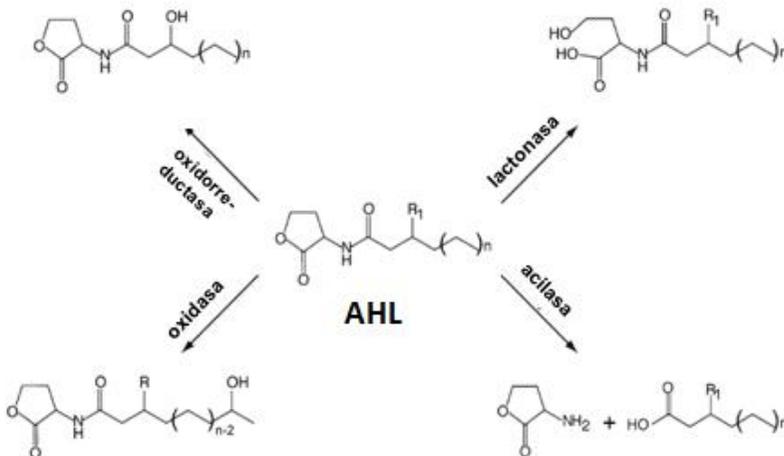


Figura 4. Tipos de inactivación enzimática de una molécula AHL.

A pesar de los distintos tipos de enzimas QQ descritos, las acilasas y las lactonasas son las más frecuentes. Las primeras tienen más especificidad de sustrato, según la longitud de la cadena acil de la molécula AHL (Sio *et al.*, 2006). Sin embargo, las lactonasas tienen un espectro de sustrato más amplio (Park *et al.*, 2003). La producción de lactonasas (Dong y Zhang, 2005; Uroz *et al.*, 2008) y acilasas (Huang *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Uroz *et al.*, 2005) se ha identificado mediante técnicas clásicas de cultivo en numerosas especies bacterianas terrestres, como es el caso de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Variovorax* (Leadbetter and Greenberg, 2000; Dong *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003; Dong and Zhang, 2005; Chong *et al.*, 2012). En el medio marino, estos datos son escasos y se refieren principalmente a *Tenacibaculum discolor*, así como a otras bacterias marinas con capacidad de degradar algunas AHLs, como *Salinicola* sp., *Olleya* sp., *Maribacter* sp., *Shewanella* sp. o la cianobacteria *Anabaena* sp. (Morohoshi *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2008, 2010, 2011). Recientemente, se han identificado diferentes especies bacterianas marinas con actividad degradadora de AHLs, como *Salinimonas* sp., *Muricauda* sp., *Thalassotalea* sp., *Colwellia* sp. y *Pseudoalteromonas* sp. (Tang *et al.*, 2013).

Aunque la mayoría de enzimas de QQ conocidas hasta el momento han sido descubiertas mediante técnicas clásicas de cultivo, en los últimos años también se han identificado enzimas degradadoras de AHLs mediante técnicas moleculares basadas en la construcción de librerías genómicas y metagenómicas de hábitats terrestres y marinos o la búsqueda de genes QQ en genomas bacterianos. Es el caso de la identificación de las lactonasas QlcA, BpiB05 y BpiB07 y la oxidorreductasa BpiB09 obtenida a partir del cribado de librerías metagenómicas de suelos agrícolas (Riaz *et al.*, 2008; Schipper *et al.*, 2009; Bijtenhoorn *et al.*, 2011); la identificación de las lactonasas QsdA y QsdH en las librerías genómicas de *Rhodococcus erythropolis* y *Pseudoalteromonas byunsanensis* (Uroz *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012) o las acilasas HacA y HacB en el genoma de *Pseudomonas syringae* (Shepherd y Lindow, 2009).

En los últimos años, la interferencia en la comunicación de los microorganismos patógenos y con ello la inhibición de la expresión de los genes de virulencia regulados por QS, se ha convertido en una estrategia muy prometedora en la lucha contra las enfermedades que afectan a la acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004; Skindersoe *et al.*, 2008; Bjarnsholt *et al.*, 2010; Natrah *et al.*, 2011). Mientras que los compuestos antimicrobianos originan la muerte celular del patógeno, la utilización de estrategias de QQ adopta una estrategia menos agresiva: atenuar la virulencia de las bacterias patógenas de forma que no puedan producir una enfermedad sobre un huésped y que así puedan ser eliminadas por las defensas de

éste. Por tanto, al no interferir en el crecimiento del patógeno, en principio no se desarrollarían resistencias, lo que sería una ventaja de estos tratamientos frente al uso de antibióticos. Actualmente existe un número considerable de patentes basadas en quorum quenching. De entre ellas, la mayoría de las aplicaciones son relativas a compuestos con estructuras similares a las moléculas autoinducidas de QS (QSI) y sólo un bajo número de ellas se basan en la degradación enzimática de las AHLs (Romero *et al.*, 2012).

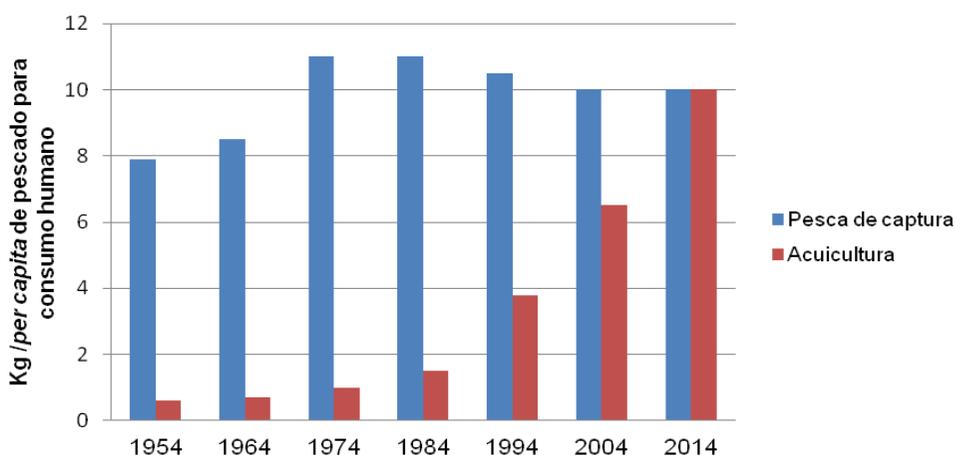
### 1.3. Enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura

Según definen la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Ley Estatal 23/1984) y la Comisión de la Unión Europea (Reglamento 1421/2004), la acuicultura es la cría o cultivo de organismos acuáticos (peces, moluscos, corales, algas, etc) con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión (Fig. 5).



**Figura 5. Ejemplos de organismos criados por acuicultura: algas, moluscos, peces y corales.**

En las últimas décadas, se ha duplicado el consumo anual per cápita de organismos acuáticos (20 kg/persona/año) (Fig. 6). Esta gran demanda de alimentos marinos ha potenciado el desarrollo de la acuicultura, la cual ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas y ya contribuye con un 50 % a la demanda humana de estas proteínas (Fig. 6) (Bostock *et al.*, 2010; FAO, 2016). Además, la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) vaticina que en el año 2030 más de la mitad de los productos marinos que se consuman procederán de la acuicultura. De hecho, se considera a la acuicultura como la industria alimentaria de mayor crecimiento anual a nivel global, con una media de un 9 % al año desde 1970. Actualmente, se considera que la acuicultura es la única salida para mantener los productos del mar en la dieta ante los problemas existentes en la pesca extractiva. Teniendo en cuenta que el 70 % de los caladeros internacionales están en sobreexplotación, y que el nivel de capturas actual es prácticamente el máximo, el consumo de estos productos se tiene que fundamentar en la acuicultura, con las expectativas que esto implica. Actualmente hay registradas 580 especies marinas que se cultivan mediante acuicultura (FAO, 2016), suponiendo su recolecta y venta un valor de 166.000 millones de euros. Esto permite hacerse una idea de la gran relevancia actual y futura que tendrá la acuicultura, y la necesidad de investigar en soluciones más innovadoras, sostenibles y responsables para su explotación.

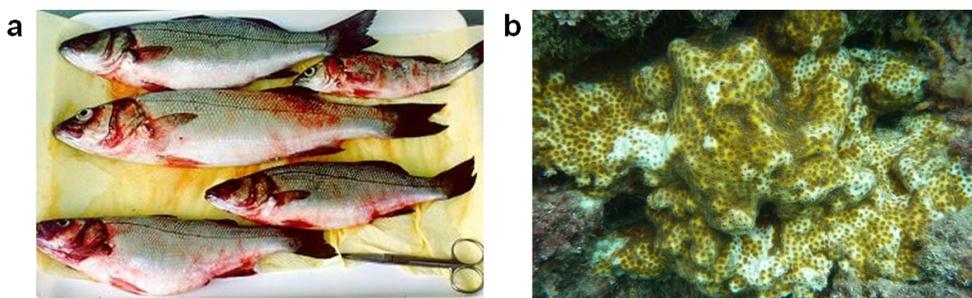


**Figura 6. Consumo anual *per capita* de pescado y contribución relativa de la acuicultura y la pesca de captura al pescado para consumo humano.**

Una de las dificultades con la que se enfrentan los criaderos comerciales y la principal causa de la baja rentabilidad económica de los mismos son las enfermedades infecciosas que afectan a los organismos acuáticos. Las comunidades bacterianas que viven de forma libre o

asociadas a los criaderos de peces, moluscos y corales sufren variaciones continuamente debido a factores ambientales. Las condiciones óptimas en los criaderos (elevados valores de densidad, temperatura, carga de materia orgánica y nutrientes inorgánicos, etc.) favorecen el crecimiento y proliferación de bacterias y la acumulación de sus metabolitos (Elston, 1984; Brown y Tettelbach, 1988; Hall-Spencer *et al.* 2007). Los factores de estrés, que incluyen variaciones en la calidad del agua y contaminación por exceso de restos orgánicos entre otros, pueden facilitar el crecimiento selectivo de bacterias patógenas, superando el umbral crítico para producir enfermedades infecciosas (Tubiash y Otto, 1986).

Los agentes responsables de las mortalidades masivas en los criaderos forman parte en muchas ocasiones de la microbiota normal asociada a estos cultivos. Muchas de estas bacterias son oportunistas y causan enfermedades cuando el organismo hospedador está inmunocomprometido o bajo condiciones de estrés. Son en su mayoría pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Edwardsiella*, entre otros. Los dos últimos afectan principalmente a peces, mientras que las especies del género *Vibrio* afectan a la mayoría de organismos acuáticos, causando vibriosis en peces y moluscos y enfermedades como el blanqueamiento en corales (Fig. 7) (Toranzo y Barja, 1990; Kushmaro *et al.*, 2001; Austin y Zhang, 2006). Las vibriosis producen úlceras cutáneas, hemorragias e infecciones sistémicas, y constituyen unas de las enfermedades más comunes y problemáticas en la acuicultura. En cuanto al blanqueamiento, que es una enfermedad que afecta a los arrecifes de corales de todo el mundo.



**Figura 7. Enfermedades producidas por *Vibrio* spp.** Vibriosis causada por *Vibrio anguillarum* en lubinas (a). Blanqueamiento producido por *Vibrio mediterranei* en corales (b).

Las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura constituyen un serio problema en todo el mundo y provocan grandes pérdidas económicas en el sector (Paillard *et al.*, 2004; Lafferty *et al.*,

2015). Además, disminuyen la calidad y reducen la producción de alimentos en muchos países en vías de desarrollo. Por esta razón se debe indagar en los mecanismos por los que se pueden prevenir y/o tratar las infecciones de los animales marinos. Solucionar este problema tiene gran trascendencia económica y social pues no sólo se evitarían grandes pérdidas económicas del sector sino que además se obtendrían alimentos de mayor calidad y seguridad sanitaria.

#### **1.4. Blanqueamiento de los corales**

Los arrecifes de corales son ecosistemas marinos que ocupan una superficie de 300.000 km<sup>2</sup> por todo el mundo. Su importancia es debida a numerosas razones, como la gran diversidad que albergan o la prevención de la erosión de las costas. Hasta la fecha, se ha perdido el 20 % de la superficie mundial de coral, un 24 % se encuentra bajo inminente riesgo de colapsar y otro 26 % está bajo una amenaza de colapso a largo plazo (Wilkinson, 2008).

Actualmente, la principal causa de muerte de los corales es el blanqueamiento o *bleaching*. Aunque algunas especies de coral cultivadas mediante acuicultura (con fines cosméticos, decorativos o de restauración de atolones) pueden sufrir blanqueamiento, este fenómeno afecta principalmente a los arrecifes de coral en mar abierto. El blanqueo del coral es debido a la salida de las algas unicelulares fotosintéticas (zooxantelas) que viven en simbiosis con el coral. Estas zooxantelas se encuentran dentro del tejido del coral, proporcionándole sus nutrientes. Cuando los simbiositos abandonan el coral, éste queda blanqueado, vulnerable, y en ocasiones al borde de la muerte.

La causa del blanqueamiento de los corales es el aumento de la temperatura del mar debido al calentamiento global (Bozec y Mumby, 2014), lo que hace proliferar las comunidades de bacterias patógenas oportunistas que se encuentran asociadas a los corales, como es el caso de las especies del género *Vibrio* (Rosenberg *et al.*, 2009). Actualmente, el modelo de estudio es el blanqueamiento producido por *Vibrio mediterranei* (anteriormente *V. shiloi*) sobre el coral *Oculina patagonica* (Kushmaro *et al.*, 2001; Rosenberg y Falkovitz, 2004). Otros ejemplos bien estudiados son el blanqueo de *Pocillopora damicornis* por la acción de *V. coralliilyticus* (Ben-Haim *et al.*, 2003) o de *Montipora capitata* por *V. owensii* (Ushijima *et al.*, 2012).

## 1.5. Inhibición de la comunicación intercelular en bacterias patógenas marinas

Para tratar las enfermedades en acuicultura se han empleado durante muchos años los antibióticos, lo que ha provocado la aparición de numerosas resistencias y con ello, que los tratamientos no resulten efectivos (Akinbowale *et al.*, 2006; Smith, 2008). El uso de antibióticos es mal aceptado por el consumidor y además cada vez está más restringido, como es el caso de Noruega o Canadá (Cabello *et al.*, 2013). Otras estrategias empleadas han sido la administración de vacunas (Toranzo *et al.*, 2005), inmunoestimulantes (Labh y Shakya, 2014) y probióticos (Verschuere *et al.*, 2000), aunque solo han dado buenos resultados con peces de gran tamaño, pero no en alevines ni en moluscos.

Sin embargo, la alternativa más novedosa y prometedora sobre la que se está investigando en los últimos años para combatir las enfermedades de los organismos acuáticos es la interrupción de los mecanismos de comunicación bacteriana quorum sensing (Defoirdt *et al.*, 2004, 2011; Natrah *et al.*, 2011).

En muchas especies de estos géneros de bacterias patógenas se ha demostrado que la producción de ciertos factores de virulencia, tales como exoenzimas o biofilms, está regulada por quorum sensing (Tabla 3) (Croxatto *et al.*, 2004; Rasch *et al.*, 2004; Bruhn *et al.*, 2005; Luppy y Ruby, 2005; Neilson y Hastings, 2006; Higgins *et al.*, 2007). Sin embargo, aún se desconoce la existencia de estos sistemas y su papel en muchos otros patógenos marinos, como es el caso de *Vibrio splendidus* o *V. tubiashii* (Yang *et al.*, 2011).

Hasta el momento, ya se han obtenido algunos resultados en patógenos de peces tras distintos ensayos de interrupción de sistemas QS. Se ha demostrado que cultivos enriquecidos de bacterias que degradan moléculas AHL favorecen la supervivencia de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y de gambas (*Macrobrachium rosenbergii*), protegiéndolas de infecciones por vibrios (Thin *et al.*, 2008; Nahn *et al.*, 2010). Del mismo modo, la aplicación por vía oral de enzimas QQ purificadas a cultivos de carpas comunes (*Cyprinus carpio*) y de langostinos (*Penaeus indicus*) disminuye la mortalidad por *Vibrio parahaemolyticus* (Chen *et al.*, 2010; Vinoy *et al.*, 2014). Recientemente, otro estudio ha demostrado que la administración oral de una lactonasa purificada (Cao *et al.*, 2012) o de un cultivo de una cepa de *Bacillus* con actividad QQ protege al pez cebra (*Danio rerio*) de la infección por *Aeromonas hydrophila* (Chu *et al.*, 2014).

**Tabla 3. Sistemas quorum sensing de bacterias patógenas del medio acuático.**

Bacteria patógena	Moléculas señal	Fenotipos y factores de virulencia regulados por QS
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C <sub>4</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL	Biofilm, enterotoxina, hemolisina, metaloproteasa, pigmento, sideróforos
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C <sub>4</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>6</sub> -HSL, C <sub>10</sub> -HSL	Enterotoxina, hemolisina, lipasa, pigmento, serina proteasa, sideróforos
<i>Edwardsiella tarda</i>	C <sub>4</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>6</sub> -HSL, C <sub>7</sub> -HSL, AI-2	Hemolisina, proteína virulenta específica de cepa
<i>Hafnia alvei</i>	3-O-C <sub>6</sub> -HSL	Fimbrias, sideróforos, resistencia a la acción bactericida del suero
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-O-C <sub>10</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL, 3-OH-C <sub>10</sub> -HSL, AI-2	Biofilm, exopolisacárido, lipasa, metaloproteasa, serina y glicina, pigmento melanina, sideróforos
<i>Vibrio alginolyticus</i>	AI-2	Biofilm, motilidad, exopolisacárido, proteasa
<i>Vibrio harveyi</i>	3-OH-C <sub>4</sub> -HSL, AI-2	Exopolisacárido, exotoxina T1, caseinasa, fosfolipasa, gelatinasa, hemolisina, lipasa, luminiscencia, sideróforos, sistema de secreción tipo III, quitinasa
<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	AHLs, AI-2	Biofilm
<i>Vibrio mimicus</i>	AI-2	Hemolisina, proteasa
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AI-2	Proteasa, sistema de secreción tipo III
<i>Vibrio sinaloensis</i>	C <sub>4</sub> -HSL	Biofilm
<i>Vibrio salmonicida</i>	3-O-C <sub>6</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL	Luminiscencia
<i>Vibrio scophthalmi</i>	3-OH-C <sub>10</sub> -HSL, AI-2	Biofilm
<i>Vibrio vulnificus</i>	C <sub>4</sub> -HSL, C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>6</sub> -HSL, C <sub>8</sub> -HSL, 3-O-C <sub>14</sub> -HSL, AI-2	Exopolisacáridos, citolisina, hemolisina, metaloproteasa, sideróforos, toxina RTX
<i>Yersinia ruckeri</i>	C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>6</sub> -HSL, 3-O-C <sub>7</sub> -HSL, 3-O-C <sub>8</sub> -HSL, 3-O-C <sub>9</sub> -HSL, 3-O-C <sub>10</sub> -HSL, 3-O-C <sub>12</sub> -HSL	Metaloproteasa, sideróforos

La interrupción de los mecanismos de comunicación bacteriana quorum sensing ha demostrado ser más efectiva y desarrollar menos mecanismos de resistencia que los tratamientos antimicrobianos, ya que aplican menos presión selectiva sobre los patógenos y disminuyen las infecciones bacterianas sin reducir su crecimiento, a diferencia de los antibióticos (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Rasko y Sperandio, 2010). No obstante, algunos autores han encontrado recientemente mecanismos de resistencia contra compuestos QSI (García-Contreras *et al.*, 2013, 2016; Kalia *et al.*, 2014), como es el caso de modificaciones en los transportadores transmembrana de moléculas y/o en el regulador LuxR (Maeda *et al.*, 2012) o la aparición de mutantes espontáneos que dejan de regular su virulencia mediante moléculas señal, haciéndose por tanto insensibles a la inhibición de QS (Sandoz *et al.*, 2007). A pesar de ello, muchos autores defienden que esto no quiere decir que éstas puedan extenderse, y además, esas resistencias serán mucho menores que las producidas por compuestos antimicrobianos convencionales (Defoirdt *et al.*, 2010; Rémy *et al.*, 2016). En cualquier caso, entre todas las estrategias de interferencia de QS existentes, la que menos resistencias podría producir es la degradación enzimática de las moléculas señal (QQ), ya que ésta tiene lugar a nivel extracelular y no en el interior de las células (Bzdrenga *et al.*, 2016). Además, los posibles mecanismos de resistencia propuestos (aumento de la producción de AHLs o aumento de la afinidad de éstas por el receptor regulador transcripcional) pueden ser contrarrestados con una mayor dosificación de las enzimas degradadoras de AHLs o modificando éstas mediante ingeniería genética (García-Contreras *et al.*, 2013; Bzdrenga *et al.*, 2016).

## **1.6. Inhibición de la comunicación intercelular bacteriana en ambientes salinos**

A pesar de que la interrupción de los sistemas QS se ha descrito en distintos ambientes marinos (Dobretsov *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2013), poco se sabe sobre este fenómeno en los ambientes salinos e hipersalinos.

Los hábitats salinos e hipersalinos son ambientes extremos que se caracterizan por presentar una elevada concentración de sal así como valores límite de uno o varios parámetros tales como la temperatura, el pH, la radiación solar, la concentración de nutrientes, la presión de oxígeno, la presencia de metales pesados y los compuestos tóxicos (Rodríguez-Valera, 1988). Estos hábitats están repartidos por todo el planeta y están representados por lagos salados, minas de sal, salinas, suelos salinos, etc. Algunos ejemplos en España son Rambla Salada (Murcia), Fuente de Piedra (Málaga), las salinas de Santa Pola (Alicante), etc.

La primera descripción de sistemas de comunicación intercelular QS en bacterias aisladas de hábitats hipersalinos la realizó nuestro grupo de investigación en 2005 (Llamas *et al.*, 2005). Posteriormente, se identificó la producción de moléculas señal AHLs en 43 especies de bacterias pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* aisladas de agua y suelos salinos, así como la presencia de los genes de QS *hanII/hanR* (Tahrioui *et al.*, 2013). También se ha descrito la síntesis de moléculas de tipo AI-2 en la bacteria halófila *Halobacillus halophilus* (Sewald *et al.*, 2007) y la producción de moléculas DKPs en otras especies halófilas, como *Haloterrigena hispanica* (Tommonaro *et al.*, 2012; 2015).

En lo referente a la inhibición de la comunicación QS en los ambientes salinos, se ha realizado un estudio sobre moléculas QSI en aguas hipersalinas de Omán y se ha encontrado que algunos aislados de *Marinobacter* sp. producen moléculas con estructura similar a las DKPs con capacidad de bloquear el mecanismo QS (Abed *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios de degradación enzimática de AHLs (QQ) en ambientes hipersalinos. Por tanto, la información que tenemos hoy en día sobre la función de la comunicación intercelular bacteriana y su inhibición en los hábitats extremos, y más concretamente en los ambientes hipersalinos, es aún muy escasa.

### **1.7. Otras aplicaciones de la inhibición de la comunicación intercelular bacteriana**

Además de la acuicultura, la inhibición de la comunicación tiene muchas otras aplicaciones biotecnológicas en áreas de gran importancia económica. Una de ellas es la lucha contra el biofouling, donde los biofilms que se forman sobre la cubierta de los barcos o en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales están controlados por mecanismos quorum sensing (Dobretsov *et al.*, 2011; Weerasekara *et al.*, 2016). Hoy en día se están utilizando nanopartículas y soportes plásticos tratados con enzimas QQ en los reactores de las plantas de tratamiento de agua para hacer frente a estos fenómenos, y se están obteniendo muy buenos resultados (Yeon *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Lade *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016). Estos tratamientos se presentan como una alternativa en el proceso de limpieza de los sistemas de filtrado en las plantas de aguas residuales o en el mantenimiento de los navíos, suponiendo una disminución considerable en la frecuencia y en el gran coste económico de dichos procesos (Schultz *et al.*, 2011; Bzdrenga *et al.*, 2016).

Otra importante aplicación de la estrategia de quorum quenching es en la agricultura, donde la mayoría de las principales bacterias fitopatógenas regulan la producción de sus factores de virulencia

mediante los sistemas QS (Mole *et al.*, 2007). Es el caso de *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Erwinia amylovora* o *Burkholderia glumae*, que regulan la síntesis de exoenzimas y su motilidad mediante dicho sistema de comunicación intercelular (Smadja *et al.*, 2004; Devescovi *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2010; Mansfield *et al.*, 2012; Pöllumaa *et al.*, 2012). Actualmente, ya se aplican cepas con actividad QQ directamente sobre los cultivos agrarios como una alternativa a los tratamientos fitoquímicos para inhibir la virulencia de los patógenos sobre los productos agrícolas (Molina *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2003; Cirou *et al.*, 2007; Barbey *et al.*, 2013; Helman y Chernin, 2015).

Otro campo de aplicación es en medicina, donde un gran número de importantes patógenos humanos regulan su virulencia mediante QS. Por ejemplo, en las bacterias oportunistas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o *Burkholderia cepacia*, la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilms sobre algunos órganos, catéteres e implantes médicos está regulada por moléculas señal (Eberl, 2006; Bhargava *et al.*, 2010; Kiran *et al.*, 2011; Barr *et al.*, 2015). También las bacterias patógenas bucales *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* regulan la producción de factores de virulencia como la síntesis de bacteriocinas o la formación de biofilms mediante QS (Chung *et al.*, 2001; Frias *et al.*, 2001; Ploeg, 2005; He *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015). Hoy en día se están ensayando distintas formas farmacéuticas (como suspensiones de polvo para inhalación, geles, catéteres, membranas porosas o vendas de poliuretano) con enzimas QQ inmovilizadas en su superficie o en nanopartículas para tratar las enfermedades producidas por estos patógenos a través de la inhibición de sus sistemas QS (Ng *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2014; Hraiech *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Ivanova *et al.*, 2015; Grover *et al.*, 2016).

Por último, una aplicación en la que recientemente se está investigando es la inhibición de la comunicación bacteriana QS en los envases alimentarios. Se ha demostrado que un gran número de bacterias responsables del deterioro de los alimentos, algunas de las cuales son patógenos humanos, poseen sistemas QS. Es el caso de *Campylobacter jejuni*, *Pectobacterium carotovorum*, *Salmonella enterica*, *Acidovorax citrulli*, *Cronobacter sakazakii* o *Hafnia alvei* (Xavier y Bassler, 2003; Bruhn *et al.*, 2004; Pöllumaa *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Por esta razón, se están realizando ensayos con envases plásticos y de cartón que llevan inmovilizadas sustancias que interfirieren los sistemas QS para evitar el deterioro de alimentos frescos (Naik y Kowshik, 2014; Brandwein *et al.*, 2016).





## **2. OBJETIVOS**



## **2. Objetivos**

Los objetivos de este trabajo forman parte de una de las líneas de investigación que desarrolla el grupo de investigación BIO 188 “Exopolisacáridos microbianos” de la Universidad de Granada. Dicha línea estudia la comunicación celular y su interferencia en microorganismos halófilos. En concreto, en esta tesis hemos investigado bacterias de origen marino, consideradas halófilas débiles poco estrictas y que requieren para su crecimiento óptimo alrededor del 3 % (p/v) de sales.

La finalidad de este estudio es caracterizar nuevas enzimas de quorum quenching mediante la selección tanto de bacterias marinas como de genes con dicha actividad con el fin de poder utilizarlos *in vivo* en los criaderos de peces y moluscos como una alternativa a los tratamientos antibióticos que se usan hoy en día. Por tanto, los objetivos concretos perseguidos son los siguientes:

**2.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de interferir o inhibir los sistemas quorum sensing.**

**2.2. Búsqueda de enzimas quorum quenching en ambientes salinos mediante técnicas de ecología molecular.**



## **2. Objectives**

*The objectives of this work belong to one of the research lines developed by the research group BIO 188 "Microbial Exopolysaccharides" of the University of Granada. This line studies cellular communication and its interference in halophilic microorganisms. Specifically, in this thesis we have investigated bacteria of marine origin, considered as weak halophiles and that require for their optimum growth around 3 % (w/v) of salts.*

*The aim of this study is to characterize new quorum quenching enzymes by selecting both marine bacteria and genes with this activity in order to be able to use them in vivo in fish and mollusc hatcheries as an alternative to the antibiotic treatments that are used nowadays. Therefore, the specific objectives pursued are the following:*

**2.1. Selection and characterization of marine bacteria capable of interfering with or inhibiting quorum sensing systems.**

**2.2. Search for quorum quenching enzymes in saline environments using molecular ecology techniques.**



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. Cepas bacterianas y su conservación

Las cepas objeto de estudio de esta tesis tienen distinta procedencia y se recogen en la siguiente tabla (Tabla 4).

**Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características.**

Cepa	Características	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>relA1, lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>supE44, thi-1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> S17 $\lambda$ <i>pir</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>recA1, <math>\lambda</math> pir, thi, pro</i>	Miller and Mekalanos, 1988
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44, recA1, hsdR17, gyrA46, thi, relA1, lac-F'</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> EPI300	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) (StrR) $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i>	Epicentre
<i>E. coli</i> RP437	<i>thiE1, xylA5, rpsL136</i> (StrR)	Parkinson, 1978
<i>E. coli</i> RP9335	<i>E. coli</i> RP437 $\Delta$ <i>cheA</i>	Parkinson, 1978
<i>E. coli</i> UU2871	<i>E. coli</i> RP437 $\Delta$ <i>cheW</i>	Parkinson, 1978
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Cm <sup>R</sup> , <i>dcm ompT hsdS gal</i> $\lambda$ (DE3)	Promega
<b>Biosensores</b>		
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Km <sup>R</sup> , <i>cvl::mini-Tn5, AHL<sup>-</sup></i>	McClellan <i>et al.</i> 1997
<i>C. violaceum</i> VIR07	Km <sup>R</sup> , <i>cvl, AHL<sup>-</sup></i>	Morohoshi <i>et al.</i> 2007
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZRL4)	Gm <sup>R</sup> , <i>traG::lacZ, AHL<sup>-</sup></i>	Shaw <i>et al.</i> 1997
<b>Productoras de AHLs</b>		
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264 <sup>T</sup>	Patógeno de peces y moluscos	Skerman <i>et al.</i> , 1980
<i>V. metschnikovii</i> NCTC 8483 <sup>T</sup>	Patógeno de moluscos y humanos	Skerman <i>et al.</i> 1980
<i>V. nigripulchritudo</i> CIP 103195 <sup>T</sup>	Patógeno de moluscos	Goarant <i>et al.</i> , 2006

**Tabla 4 continuación. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características.**

Cepa	Características	Referencia
<i>V. mediterranei</i> VibC-Oc-97	Patógeno de corales	Rubio-Portillo <i>et al.</i> , 2004
<i>V. owensii</i> VibC-Oc-106	Patógeno de corales y moluscos	Rubio-Portillo <i>et al.</i> , 2004
<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	Patógeno de corales	Rubio-Portillo <i>et al.</i> , 2004
<i>V. neptunius</i> PP-145.98	Patógeno de moluscos	Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>V. tubiashii</i> CECT 631 <sup>T</sup>	Patógeno de peces y moluscos	Hada <i>et al.</i> , 1984
<i>Agrobacterium</i> <i>fabrum</i> C58	Patógeno de plantas	Lassalle <i>et al.</i> , 2011
<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> CECT 225 <sup>T</sup>	Patógeno de plantas	Hauben <i>et al.</i> , 1998
<i>Halomonas</i> <i>anticariensis</i> FP35 <sup>T</sup>	Aislada de un suelo salino	Martínez-Cánovas <i>et al.</i> , 2004
<b>Para estudio de QQ</b>		
<i>Tenacibaculum</i> <i>discolor</i> 20-J	Aislada de agua de mar en un criadero de peces	Romero <i>et al.</i> , 2010
Colección de 61 cepas	Aisladas de <i>Venerupis decussata</i> en un criadero de moluscos de Lugo	Este trabajo
Colección de 36 cepas	Aisladas de <i>V. philippinarum</i> en un criadero de moluscos de Lugo	Este trabajo
Colección de 27 cepas	Aisladas de <i>V. corrugata</i> en un criadero de moluscos de Lugo	Este trabajo
Colección de 15 cepas	Aisladas de <i>Ensis siliqua</i> en un criadero de moluscos de Lugo	Este trabajo
Colección de 7 cepas	Aisladas de <i>Solen marginatus</i> en un criadero de moluscos de Lugo	Este trabajo
Colección de 450 cepas	Aisladas de agua de mar en un criadero de peces y moluscos de Granada	Este trabajo

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes. *Escherichia coli*, *Chromobacterium violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), *A. fabrum* C58, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se cultivaron en medio LB (Difco) y se incubaron a 28°C con una agitación de 100 rpm, o a 37°C en algunos casos para *E. coli*. Los aislados marinos y las cepas de *Vibrio* se cultivaron en medio CM (Difco) y se incubaron a 25°C con una agitación de 100 rpm. *Halomonas anticariensis* FP35<sup>T</sup> se cultivó en medio MY (Quesada *et al.*, 1993) y se incubó a 32°C con una agitación de 100 rpm.

La conservación de las cepas a corto plazo se realizó por resiembras en medio sólido y a 4°C. A largo plazo, se hizo por congelación a -80°C de cultivos líquidos conteniendo 20 % glicerol (v/v).

### 3.2. Plásmidos y fósmidos

Los plásmidos y fósmidos utilizados en este trabajo como vectores para la clonación y expresión de distintos genes fueron los siguientes (Tabla 5).

**Tabla 5. Plásmidos y fósmidos utilizados en este trabajo y sus características.**

Vector	Características	Referencia
<b>Plásmido</b>		
pGEM-T	Ap <sup>R</sup> , vector de clonación de productos de PCR	Promega
pME6010	Amplio rango de hospedadores, derivado de pVS1, bajo número de copias, Tc <sup>R</sup>	Heeb <i>et al.</i> , 2000
pUC18	Ap <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , MCS	Vieira and Messing, 1987
pMAL-c2TEV	Ap <sup>R</sup> , vector de clonación para expresión de proteínas	New England Biolabs
pME6863	Tc <sup>R</sup> , pME6010:: <i>aiiA</i> (lactonasa)	Dong <i>et al.</i> , 2000
pMIR102	Tc <sup>R</sup> , pME6010:: <i>attM</i> (lactonasa)	Zhang <i>et al.</i> , 2002
<b>Fósido</b>		
pCC1FOS	Cm <sup>R</sup> , <i>oriV</i> , <i>trfA</i> ,	Epicentre

### 3.3. Suelos, aguas y sedimentos salinos

Las muestras de suelos, aguas y sedimentos acuosos salinos empleados en esta tesis se recogen en la Tabla 6, así como su salinidad y pH (Oueriaghli *et al.*, 2013). Estas muestras se utilizaron para la búsqueda de genes de quorum quenching mediante PCR, y la muestra S1C se empleó para la construcción de una librería metagenómica.

**Tabla 6. Muestras de suelos, aguas y sedimentos salinos usados en este trabajo.**

Época	Zona	Muestra	Tipo de muestra	Salinidad % (p/v)	pH	
Julio 2010	Salina de Larache. Marruecos	1L	Suelo	14,8)	6,6	
		2L	Agua	7,8	8,0	
		3L	Suelo	2,1	7,6	
Julio 2010	Salina de Souk Larbâa. Marruecos	1S	Sedimento acuoso	3,9	7,3	
		2S	Sedimento acuoso	16	7,5	
		3S	Agua	3,5	8,3	
Noviembre 2007	Finca la Salina. Rambla Salada. Murcia	S1C	Suelo	1,8	8,3	
		S2C	Suelo	1,8	8,3	
		S4C	Sedimento acuoso	2,2	8,0	
	Trasvase Tajo-Segura. Rambla Salada. Murcia	S3C	Sedimento acuoso	2,9	8,3	
		Surgencia. Rambla Salada. Murcia.	S7C	Sedimento acuoso	15,1	7,2
			S8C	Sedimento acuoso	15,1	7,2

### 3.4. Medios de cultivo

A continuación, se detalla la composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo tanto para el cultivo de cepas bacterianas como para la elaboración de pruebas fenotípicas. Cuando fue necesario, el pH de los medios se ajustó a  $7,0 \pm 0,2$  con NaOH 1M y la esterilización se llevó a cabo en autoclave a una temperatura de 112°C y 0,5 atmósferas de presión durante 30 minutos. Para la preparación de los medios de

cultivo sólidos se utilizó agar a una concentración del 1,5 % (p/v), excepto para los medios de movilidad en los que se empleó agar entre el 0,3 y el 0,5 % (p/v).

**Medio MY** (Quesada *et al.*, 1993). Medio utilizado para cultivar *Halomonas anticariensis* FP35<sup>T</sup>. La composición que se detalla a continuación está referida a un 7,5 % (p/v) de sales.

Glucosa anhidra.....	10 g
Proteosa peptona.....	5 g
Extracto de malta.....	3 g
Extracto de levadura.....	3 g
Solución de sales Subow <sup>a</sup> .....	250 ml
Agua destilada csp.....	1.000 ml

<sup>a</sup>Sales Subow (Rodríguez-Valera *et al.*, 1981). Stock de sales con una concentración del 30 % (p/v). Su composición es la siguiente:

NaCl.....	205,2 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	36 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	52 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,8 g
KCl.....	5,2 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,2 g
NaBr.....	0,6 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,5 % (p/v).....	0,6 ml
Agua destilada csp.....	1.000 ml

**Medio caldo marino (CM).** Medio deshidratado (Difco) empleado para cultivar las bacterias marinas.

**Medio agar marino (AM).** Medio deshidratado (Difco) empleado para cultivar las bacterias marinas.

**Agua de mar (SFSW).** Agua de mar filtrada y esterilizada utilizada para los ensayos *in vivo* en acuarios.

**Medio agua de mar con extracto de levadura (SFSWYE).** Medio utilizado cultivar las bacterias marinas. Su composición es SFSW adicionada de 0,01 % (p/v) de extracto de levadura.

**Medio tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS)** (Lotz *et al.*, 1983). Medio selectivo deshidratado (Difco) empleado para el aislamiento de *Vibrio* spp.

**Medio Luria-Bertani (LB).** Medio deshidratado (Difco) empleado habitualmente para el crecimiento de numerosas cepas.

**Medio AB** (Chilton *et al.*, 1974). Medio utilizado para cultivar *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en la detección de moléculas AHLs. Se le adicionó X-gal (80 µg/ml) una vez esterilizado.

Manitol.....	2 g
Tampón fosfato 20X <sup>a</sup> .....	50 ml
Solución de sales 20X <sup>b</sup> .....	50 ml
Agar.....	15 g
Agua destilada csp.....	1.000 ml

<sup>a</sup>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 g; agua destilada csp 1.000 ml.

<sup>b</sup>NH<sub>4</sub>Cl 20 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6 g; KCl 3 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g; agua destilada csp 1.000 ml.

**Medio MGM.** Medio empleado para cultivar *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) para la detección de AHLs mediante TLC. Se le adicionó X-gal (80 µg/ml) una vez esterilizado.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	11 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3 g
NaCl.....	0,5 g
Glutamato.....	1 g
Manitol.....	10 g
Biotina.....	1 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	27,8 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	246 mg
Agar.....	15 g
Agua destilada csp.....	1.000 ml

Los medios descritos a continuación se emplearon para la evaluación de distintos fenotipos tras los ensayos de quorum quenching.

**Medio LB almidón** (Mourey y Kilbertus, 1976). Medio empleado para evaluar la actividad proteolítica de *Pectobacterium carotovorum*. Se preparó añadiendo al medio LB un 1 % (p/v) de almidón y 1,5 % (p/v) de agar. Para el revelado se vertió lugol en la placa.

**Medio AM almidón** (Mourey y Kilbertus 1976). Medio empleado para evaluar la actividad proteolítica de *Vibrio* spp. Se preparó añadiendo al medio AM un 1% (p/v) de almidón. Para el revelado se vertió lugol en la placa.

**Medio LB caseína** (Barrow y Feltham, 1993). Medio empleado para evaluar la actividad proteolítica de *P. carotovorum*. Se realizó preparando el medio LB con la mitad de cantidad de agua necesaria (500 ml) y 1,5 % (p/v) de agar. Una vez esterilizado el medio, se le añadió 500 ml de leche desnatada.

**Medio AM caseína** (Barrow y Feltham 1993). Medio empleado para evaluar la actividad proteolítica de *Vibrio* spp. Se realizó como el medio anterior pero con AM como base.

**Medio LB Tween 20** (Mourey y Kilbertus, 1976). Medio empleado para evaluar la actividad lipolítica de *P. carotovorum*. Se preparó añadiendo al medio LB un 1 % (v/v) de Tween 20 (derivado del polioxietilén sorbitán) y 1,5 % (p/v) de agar.

**Medio AM Tween 20** (Mourey y Kilbertus 1976). Medio empleado para evaluar la actividad lipolítica de *Vibrio* spp. Se preparó añadiendo al medio AM un 1 % (v/v) de Tween 20 (derivado del polioxietilén sorbitán).

**Medio LB Tween 80** (Mourey y Kilbertus 1976). Medio empleado para evaluar la actividad lipolítica de *P. carotovorum*. Se preparó añadiendo al medio LB un 1 % (v/v) de Tween 80 (derivado del polioxietilén sorbitán) y 1,5 % (p/v) de agar.

**Medio AM Tween 80** (Mourey y Kilbertus 1976). Medio empleado para evaluar la actividad lipolítica de *Vibrio* spp. Se preparó añadiendo al medio AM un 1 % (v/v) de Tween 80 (derivado del polioxietilén sorbitán).

**Medio AM quitina** (Wu *et al.*, 2009). Medio empleado para evaluar la actividad quitinolítica de *Vibrio* spp. Se preparó añadiendo al medio AM un 1 % (p/v) de quitina soluble. La quitina insoluble (Sigma) fue previamente solubilizada en HCl 10N y precipitada con etanol 100 % (p/v) frío.

**Medio pectina** (Teather y Wood, 1982). Medio empleado para detectar la actividad pectinolítica de *P. carotovorum*.

NaNO <sub>3</sub> .....	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Sacarosa.....	30 g
ZnSO <sub>4</sub> .....	10 mg
CuSO <sub>4</sub> .....	10 mg
Pectina.....	10 g

Rojo congo 0,04 % (p/v).....	10 ml
Agar.....	10 g
Agua destilada csp.....	1.000 ml

**Medio fosfatasa alcalina (PVK)** (Pikovskaya, 1948). Medio empleado para detectar la producción de la enzima fosfatasa alcalina en *P. carotovorum*. Se preparó añadiendo 1 ml de fosfato de fenolftaleína 0,01 % (p/v) (Merck) al medio LB tras autoclavarlo.

**Medio DNAsa** (Jeffries *et al.*, 1957). Medio deshidratado (Cultimed) empleado para medir la producción de la enzima DNAsa de *Vibrio* spp. y de *P. carotovorum*. Para la lectura se vertió HCl 1N sobre la placa.

**Medio CM gelatina** (Pickett *et al.*, 1991). Medio empleado para evaluar la hidrólisis de la gelatina de *Vibrio* spp. Se preparó añadiendo 15 g/l de gelatina al medio CM.

**Medio agar sangre** (Vera y Power, 1980). Medio comercial (Beckton Dickinson) utilizado para evaluar la actividad hemolítica en *Vibrio* spp.

**Medio cromoazurol sulfonato (O-CAS)** (Pérez-Miranda *et al.*, 2007) . Medio empleado para el evaluar la producción de sideróforos en *Vibrio* spp.

Cromoazurol sulfonato.....	0,6 g
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.....	0,3 g
PIPES.....	0,3 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 10 mM.....	10 ml
Agarosa.....	9 g
Agua destilada csp.....	1.000 ml

**Medio triptona** (Parkinson, 1976). Medio empleado para evaluar la motilidad tipo swarming de los mutantes de quimiotaxis de *Escherichia coli*.

Triptona.....	10 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	4 g
Agua destilada csp.....	1.000 ml

### 3.5. Antimicrobianos

Las soluciones de antimicrobianos (Sigma) se prepararon en agua bidestilada, excepto la rifampicina y la tetraciclina que se prepararon en metanol. Dichas soluciones se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenaron a -20°C repartidas en alícuotas.

Cuando fue necesario, se añadieron a los medios de cultivo los antimicrobianos a las siguientes concentraciones finales: gentamicina (Gm) 50 µg/ml, kanamicina (Km) 50 µg/ml, cloranfenicol (Cm) 12,5 µg/ml, ampicilina (Amp) 100 µg/ml, streptomycin (Sm) 100 µg/ml, tetraciclina (Tc) 10 µg/ml y rifampicina (Rif) 50 µg/ml.

### 3.6. Moléculas AHLs

Las moléculas AHLs sintéticas adicionadas a los medios fueron las siguientes (Sigma): *N*-butanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>4</sub>-HSL), *N*-hexanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>6</sub>-HSL), *N*-3-oxohexanoil-DL-homoserin lactona (3-O-C<sub>6</sub>-HSL), *N*-octanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>8</sub>-HSL), *N*-3-oxooctanoil-DL-homoserin lactona (3-O-C<sub>8</sub>-HSL), *N*-decanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>10</sub>-HSL), *N*-3-hidroxicanoil-DL-homoserin lactona (3-OH-C<sub>10</sub>-HSL), *N*-dodecanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>12</sub>-HSL), *N*-3-oxododecanoil-DL-homoserin lactona (3-O-C<sub>12</sub>-HSL) y *N*-tetradecanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>14</sub>-HSL). Las soluciones stock de cada compuesto se disolvieron en metanol 70 % (v/v) y se prepararon a 10 mM. Posteriormente se utilizaron a una concentración final de 10 µM o 25 µM.

Las moléculas sintéticas utilizadas para los análisis por HPLC/MS fueron, además de todas las anteriores, las siguientes: *N*-3-oxododecanoil-DL-homoserin lactona (3-O-C<sub>10</sub>-HSL), *N*-3-hidroxicanoil-DL-homoserin lactona (3-OH-C<sub>12</sub>-HSL), *N*-3-oxotridecanoil-DL-homoserin lactona (3-O-C<sub>13</sub>-HSL) y *N*-hexadecanoil-DL-homoserin lactona (C<sub>16</sub>-HSL).

### 3.7. Otras soluciones

#### a) X-gal

La solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido (X-gal) (Sigma) se preparó a una concentración final de 20 mg/ml utilizando *N,N*-dimetilformamida (Panreac) como disolvente, y se conservó a -20°C.

#### b) Buffer PBS

La solución de tampón fosfato (PBS) se empleó para el ensayo de localización celular de la enzimas quorum quenching. Se preparó de la siguiente forma y se ajustó el pH a 6,5.

NaCl.....	17,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
Agua bidestilada csp.....	1.000 ml

### c) Buffer TE

La solución Tris-EDTA (TE) se utilizó para resuspender el ADN. Su composición final fue 1 mM EDTA y 10 mM Tris-Cl pH 7,5.

### d) Buffer CLB

La solución de lisis celular (CLB) se utilizó para el ensayo de expresión y purificación de proteínas. Su composición final fue 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl y 1 mM EDTA y se ajustó el pH a 7,5.

### e) Buffer RE

La solución tampón de reacción (RE) se utilizó en el ensayo de expresión y purificación de proteínas. Su composición fue 200 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 6,5.

### f) Buffer TBE

La solución tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) para la electroforesis en geles de agarosa se preparó diluida (TBE 1X) a partir de una solución concentrada TBE 10X cuya composición fue Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M y EDTA 20 mM pH 8.

### g) Soluciones de extracción de ADN genómico

En extracción de ADN genómico (Martín-Platero et al., 2007) se utilizaron tres soluciones. La solución 1 se compuso de 5 g de sacarosa, 1,25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8 y agua bidestilada csp 50 ml. La composición de la solución 2 fue 5 ml de Tris-HCl 1 M pH8, 10 ml de EDTA 0,5 M, 20 µl de NaCl 5M, 1 ml de SDS 10 % (p/v) y agua bidestilada csp 50 ml. La solución 3 estaba compuesta por acetato sódico 3 M pH 5.

### **3.8. Técnicas para el estudio de la actividad quorum quenching**

#### **3.8.1. Ensayo de difusión en placa para la detección de moléculas AHLs**

##### **a) Detección en cultivos**

Para detectar la producción de AHLs, se utilizaron cultivos al inicio de la fase estacionaria de las cepas a ensayar. Se añadieron 100 µl de cultivo a un pocillo de 6 mm hecho con una pipeta Pasteur estéril en placas de LB y AB X-gal sobre las que previamente se había vertido una sobrecapa del biosensor correspondiente diluido 1:10 en LB agar 0,7 % (p/v). Las placas de LB se usaron en el caso de los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, y las placas de AB X-gal se usaron para *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4). La incubación de estas placas se realizó a 28°C durante 24 h para que se desarrollara el color correspondiente. En todos los experimentos se incluyeron como controles positivos las bacterias productoras de AHLs *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. metschnikovii* NCTC 8483<sup>T</sup> y *V. nigripulchritudo* CIP 103195<sup>T</sup> (Milton *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2007; García-Aljaro *et al.*, 2012) y un control negativo consistente en medio CM.

##### **b) Detección en extractos de cultivos**

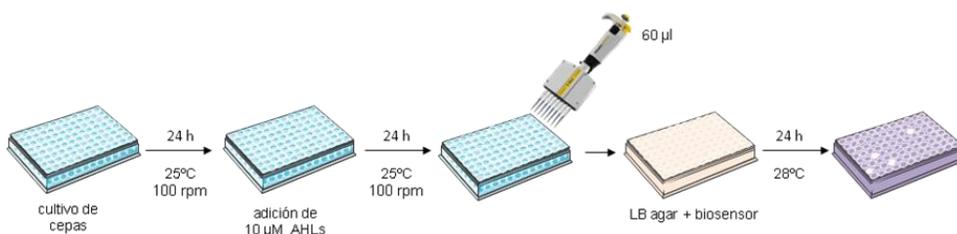
En cuanto a la detección de moléculas señal AHLs de origen natural en los extractos de los cultivos, se procedió de la misma manera. Para ello, se extrajeron las AHLs con disolventes orgánicos a partir de 5 ml de cultivo de las bacterias a ensayar al inicio de la fase estacionaria (Marketon y Gonzalez, 2002; Llamas *et al.*, 2005). Se realizaron dos extracciones sucesivas con diclorometano y las fases se separaron por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recogió la fase orgánica y se evaporó en un rotavapor ConcentratorPlus (Eppendorf). El extracto se resuspendió en 20 µl de metanol al 70 % (v/v) y se dispuso sobre discos de celulosa estériles colocados en placas de LB o AB X-gal en las que previamente se había vertido una sobrecapa del biosensor correspondiente como se ha explicado anteriormente. A continuación, se incubaron las placas 28°C durante 24 h.

#### **3.8.2. Ensayo de la actividad quorum quenching**

##### **a) Ensayo de difusión en placa microtiter**

Para el ensayo de la actividad quorum quenching frente a AHLs de origen sintético se empleó la siguiente metodología (Fig. 8) (Torres *et al.*,

2016). Se prepararon cultivos de las cepas a ensayar en placas microtiter de 96 pocillos. Tras 24 h de incubación, se añadieron las AHLs (10  $\mu$ M) a los cultivos y se volvió a incubar 24 h a 25°C. A continuación, se transfirieron 10-20  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo a placas microtiter de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de LB agar 1,5 % (p/v) por pocillo. Posteriormente, se añadieron 60  $\mu$ l por pocillo de un cultivo del biosensor adecuado diluido 1:5 en LB agar 1,5 % (p/v) y se incubaron 24 h a 28°C para que se desarrollase el color correspondiente. En todos los casos se utilizó medio fresco LB suplementado con AHLs como control negativo.



**Figura 8. Ensayo de difusión en placa microtiter de la actividad quorum quenching.**

## b) Ensayo de difusión en placa Petri

La actividad quorum quenching frente a AHLs de origen sintético se ensayó mediante un método de difusión en placa (Fig. 9). Para ello se añadieron AHLs (10  $\mu$ M) a 500  $\mu$ l de un cultivo de 24 h de las cepas a ensayar. Tras 24 h de incubación a 25°C y 100 rpm, se centrifugaron los cultivos durante 3 minutos a 10.000 rpm y las AHLs remanentes se detectaron en 100  $\mu$ l del sobrenadante, que se depositaron en un pocillo tal y como se ha descrito previamente. La incubación de las placas se realizó a 28°C durante 24 h. En todos los experimentos se incluyó un control positivo de actividad QQ, la cepa *Tenacibaculum discolor* 20-J (Romero *et al.*, 2010), y un control negativo consistente en medio CM adicionado de la misma concentración de moléculas señal.



**Figura 9. Ensayo de difusión en placa Petri de la actividad quorum quenching.**

En el caso de las AHLs de origen natural se realizó un ensayo similar al anterior pero con algunas diferencias. Las cepas seleccionadas con actividad QQ frente a AHLs sintéticas se cultivaron en 5 ml de CM y se incubaron a 25°C y 100 rpm. Tras 24 h, a los cultivos se les añadió 5 µl de extracto de AHLs obtenido como ya se ha descrito anteriormente (Marketon y Gonzalez, 2002; Llamas *et al.*, 2005). Se volvieron a incubar en agitación, a 25°C. A las 24 h, se extrajeron con diclorometano las AHLs remanentes en los cultivos (Marketon y Gonzalez, 2002; Llamas *et al.*, 2005) y se depositaron sobre discos de celulosa estériles para su detección en un ensayo de difusión en placa Petri con el biosensor adecuado.

### **3.8.3. Análisis de moléculas AHLs mediante TLC**

#### **a) Análisis de la producción de AHLs**

Para el análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de AHLs obtenidos tal y como se ha descrito previamente, se depositaron 20 µl de extracto en placas de TLC de 20 × 20 cm (Partisil KC18 Whatman) utilizando metanol 60 % (v/v) como fase móvil. Posteriormente, las placas se dejaron secar al aire libre. El revelado de las placas se realizó cubriendo las mismas con 25 ml de un cultivo de 6 h de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio MGM mezclado con un volumen igual de medio fresco, 25 ml de agar al 1,5 % (p/v) y 300 µl de una solución de 20 mg/ml de X-gal. A continuación, se incubaron las placas a 28°C. Como patrones se utilizaron las moléculas C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL y C<sub>12</sub>-HSL. Tras el revelado, las AHLs sin sustituciones o con sustituciones hidroxilo- aparecieron como manchas circulares y bien definidas, mientras que las AHLs de tipo oxo- tuvieron aspecto de gota o "lágrima" (Steindler y Venturi, 2007).

#### **b) Análisis de las AHLs remanentes**

La confirmación por TLC de la actividad degradadora de AHLs sintéticas se llevó a cabo tal y como se ha explicado anteriormente, pero en este caso se utilizaron 10 µl del sobrenadante de las reacciones de degradación realizadas en medio de cultivo adicionado con AHLs. Para la confirmación de la degradación de las AHLs naturales producidas por otras bacterias se procedió como se ha explicado previamente, analizándose 20 µl de extracto.

### **3.8.4. Análisis de moléculas AHLs mediante HPLC/MS y HPLC/HRMS**

#### **a) Determinación de la estructura y cuantificación de la producción de moléculas AHLs**

La determinación de la estructura y la cuantificación de las AHLs producidas por *Vibrio* spp. en los extractos obtenidos previamente se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas de alta resolución (HPLC/HRMS). Los extractos procedentes de 1 l de cultivo se resuspendieron en acetonitrilo y se purificaron mediante extracción de fase sólida (SPE) (Espada *et al.*, 2011). Para ello, 1 ml de cada extracto purificado se pasó a través de un cartucho Oasis HLB previamente equilibrado con acetonitrilo 50 % (v/v). Las condiciones de elución fueron las descritas por Romero y colaboradores (2011). A continuación, una alícuota de 10 µl de la fracción eluida se analizaron por HPLC/HRMS (Balado *et al.*, 2015; Osorio *et al.*, 2015) en una columna Scharlau KromaPhase C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) mediante monitorización selectiva de iones (selected ion monitoring, SIM) en un cromatógrafo Accela LC acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Scientific). Para el procesamiento de datos se utilizó el software Xcalibur (version 2.2).

La exactitud y precisión de los datos se calcularon a partir de la desviación estándar relativa de las réplicas (<15 %). La cuantificación relativa de las AHLs se llevó a cabo por comparación con una curva de calibración construida por abundancia de iones moleculares obtenidos a partir de AHLs sintéticas estándar (Milton *et al.*, 2001).

#### **b) Confirmación de la actividad quorum quenching de moléculas AHLs**

La confirmación de la actividad QQ de AHLs se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (HPLC/MS). Para ello, se añadieron moléculas AHLs (25 µM) a 500 µl de cultivo de las bacterias a ensayar (Romero *et al.*, 2011). Tras 24 h de incubación a 25°C y 100 rpm se centrifugaron los cultivos y se extrajeron las AHLs remanentes con diclorometano. Se evaporaron mediante flujo de nitrógeno a 50°C. El extracto seco se resuspendió en 400 µl de acetonitrilo y se conservó a -20°C hasta su cuantificación. Como control se utilizó medio fresco adicionado de AHLs a la misma concentración, e incubado y procesado del mismo modo.

El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HPLC 1100 (Agilent) equipado con una precolumna C8 (2,1 × 12,5 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 µ 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula) que se mantuvo a 45°C. La fase móvil utilizada

fue ácido fórmico 0,1 % (v/v) en agua y ácido fórmico 0,1 % (v/v) en acetonitrilo (Ortori *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2011). Los experimentos de espectrometría de masas (MS) se realizaron en un detector ESI-MS (Waters Synapt) y en un equipo cuadripolar triple API 4000 (Applied Biosystem) equipado con una fuente Turbolon utilizada en modo electrospray de iones positivos y monitorización de múltiples reacciones (MRM). Las señales MRM se utilizaron para obtener información de cuantificación relativa mediante la comparación con una curva de calibración construida por abundancia de iones moleculares obtenidos a partir de AHLs sintéticas estándar (Milton *et al.*, 2001).

### **3.8.5. Determinación de actividad ezimática tipo acilasa o lactonasa**

Para determinar si la capacidad degradadora de AHLs de las cepas seleccionadas era debida a una enzima acilasa o lactonasa, se añadieron las AHLs (10  $\mu$ M) a cultivos de 1 ml de cada bacteria y tras 24 h de incubación a 25°C y 100 rpm se centrifugaron a 10.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se separó en dos alícuotas de 500  $\mu$ l. A una se le extrajeron las AHLs con diclorometano como se ha explicado anteriormente, y la otra se acidificó con HCl hasta pH 2 y se incubó a 25°C y 100 rpm durante 24 h antes de proceder a su extracción con diclorometano. De esta forma se facilitó la posible recuperación de la estructura de la molécula AHL, en caso de que se tratase de una enzima lactonasa (Yates *et al.*, 2002).

### **3.8.6. Localización de la actividad quorum quenching**

La localización celular de la actividad enzimática, se determinó a partir de 15 ml de un cultivo de 24 h de la bacteria QQ seleccionada, que seguidamente se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante (SB) y el extracto celular crudo (CCE). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m y se guardó a 4°C hasta su uso. El pellet se lavó con 15 ml de buffer PBS, se centrifugó y se suspendió en 5 ml del mismo buffer. Posteriormente se llevó a cabo una sonicación intermitente en un baño de hielo (35 kHz de frecuencia) y luego se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 30 min. El extracto celular crudo obtenido se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m y se guardó a 4°C.

La concentración de proteínas del sobrenadante y del extracto celular crudo se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina como estándar. La degradación de AHLs de ambas fracciones fue determinada frente a todas las AHLs en un ensayo de difusión en placa.

### **3.8.7. Ensayo de antagonismo**

A partir de cultivos en CM o LB ( $DO_{600}$  0,7) y con la ayuda de un hisopo estéril, se preparó una sobrecapa de cada patógeno en medio sólido AM o LB en placa Petri. A continuación, se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro en las placas con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ l de cultivo ( $DO_{600}$  2,0) de las cepas degradadoras de AHLs en cada pocillo. Tras 24 h de incubación a 25°C o a 28°C, se midieron las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los pocillos.

### **3.8.8. Cocultivos *in vitro* entre cepas QQ y bacterias patógenas**

Se realizaron distintas mezclas de cultivos en medio SFSWYE entre las cepas patógenas de *Vibrio* productoras de AHLs y las bacterias con actividad quorum quenching. Para ello, un cultivo de 24 h de cada una de las cepas de *Vibrio* se añadió a un cultivo de 24 h de la cepa degradadora de AHLs y la mezcla se incubó a 25°C y 100 rpm durante 24 h. Se ensayaron distintas ratios entre cada *Vibrio* spp. y la cepa QQ:  $10^4$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml de la cepa QQ;  $10^5$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml de la cepa QQ;  $10^2$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml de la cepa QQ;  $10^2$  ufc/ml de la cepa QQ con  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml de *Vibrio* sp. Para cada condición, la misma concentración (ufc/ml) de la cepa de *Vibrio* sp. fue añadida al medio SFSWYE como control negativo. Tras 24 h de incubación a 25°C, se analizaron las AHLs remanentes de los cocultivos como se ha descrito previamente y se analizó el efecto en la producción de factores de virulencia. En todos los casos se determinó la concentración de *Vibrio* sp. y la cepa QQ para evaluar si se había mantenido la ratio predeterminada durante el ensayo de cocultivo. Para ello, se hicieron diluciones seriadas en medio SFSWYE, se sembraron en medio TCBS y AM y se incubaron a 25°C durante 24 h.

### **3.8.9. Caracterización y ensayos *in vitro* de la enzima de quorum quenching purificada**

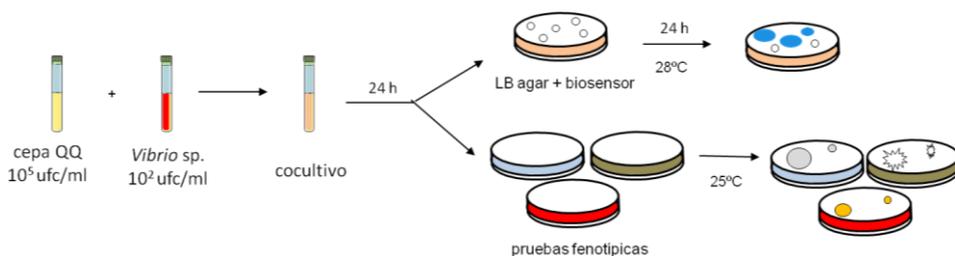
La actividad degradadora de AHLs de la proteína de QQ purificada (véase apartado 3.9.9 y 3.9.11) se ensayó en la solución tampón RE con 16  $\mu$ g/ml de proteína y 25  $\mu$ M de las AHLs sintéticas mediante un ensayo en placa Petri como se ha descrito anteriormente. Para identificar el tipo de enzima QQ y su mecanismo de acción, los productos de las reacciones de degradación se analizaron mediante el ensayo de acidificación y por HPLC/MS siguiendo la metodología previamente descrita.

Una vez confirmada la degradación de AHLs con la enzima de QQ purificada, se ensayó la actividad de ésta frente a cultivos de especies patógenas de *Vibrio* productoras de AHLs. Para ello, se añadieron 16 µg/ml de proteína a 500 µl de cultivos (DO<sub>600</sub> 0,5) de *Vibrio* spp. Tras incubar las reacciones 24 h a 25°C, las AHLs remanentes se detectaron en un ensayo en placa Petri con los biosensores adecuados como se ha descrito anteriormente.

Para evaluar el efecto de la degradación de AHLs sobre algunos de los factores de virulencia y fenotipos regulados por el mecanismo QS en las cepas de *Vibrio* sp. ensayadas se utilizaron diferentes medios (véase apartado 3.4).

### 3.8.10. Evaluación fenotípica tras la pérdida de AHLs

Para evaluar el efecto de la degradación de AHLs sobre algunos de los factores de virulencia y fenotipos regulados por el mecanismo QS en *Vibrio* spp. y en *Pectobacterium carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> se emplearon diferentes medios (véase apartado 3.4) (Fig. 10). Se utilizaron alícuotas de 20 µl de los cultivos o cocultivos (DO<sub>600</sub> 2,0) y se ensayó la actividad hemolítica, proteolítica, DNasa, amilasa, pectinasa y gelatinasa, la producción de fosfatasa alcalina y biofilm y la motilidad tipo swimming y tipo swarming en los medios sólidos descritos previamente. En estas pruebas, el resultado se obtuvo midiendo tras 7 días de incubación a 25°C los halos alrededor de la zona donde se había colocado la gota de cultivo, excepto para los ensayos de motilidad, en los que se midió la migración de las células desde el sitio del inóculo. La cuantificación de la formación de biofilm se realizó mediante un ensayo con cristal violeta (O'Toole and Kolter, 1998).



**Figura 10. Detección de AHLs remanentes y realización de pruebas fenotípicas tras la realización de ensayos de cocultivo *in vitro*.**

### 3.8.11. Ensayos *in vivo* entre cepas QQ y bacterias patógenas

#### a) Ensayos con la almeja babosa *Venerupis corrugata*

Para evaluar la actividad QQ *in vivo* de las cepas seleccionadas frente a dos especies de *Vibrio* patógenas de moluscos y productoras de AHLs se siguió el protocolo descrito por Prado *et al.*, (2005). Para ello, se utilizaron larvas de 10-12 días (~180  $\mu\text{m}$ ) de almeja babosa (*Venerupis corrugata*), que fueron suministradas por el Centro de Cultivos Maríños de Ribadeo (Lugo). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos, con 10 ml de SFSW por pocillo y una densidad final media de 11 larvas/ml. Las condiciones de cultivo fueron 20°C y ciclos de luz de 12 h/día.

Para la inoculación de las larvas, se ajustó el cultivo de las cepas QQ a concentraciones entre  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml. En cuanto a los cultivos de las bacterias patógenas de *Vibrio*, se prepararon a una concentración entre  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml. Los inóculos se prepararon en SFSW, partiendo de cultivos frescos en placa de cada una de las cepas a estudiar.

En el ensayo se inocularon en primer lugar las cepas QQ. Al cabo de 2 horas se añadieron las larvas de almeja babosa, y tres horas más tarde se incorporaron las bacterias patógenas a los pocillos correspondientes. Se incluyeron en el ensayo pocillos sin adición bacteriana (controles negativos) y otros inoculados individualmente con cada una de las cepas (controles positivos). Además, los pocillos inoculados con las cepas QQ sirvieron para comprobar su inocuidad para las larvas. Las placas se incubaron a 25°C y a 100 rpm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Al cabo de 48 horas se examinaron las larvas mediante microscopía óptica (20X, 40X y 100X) (Fig. 12). El número de larvas muertas en cada pocillo se determinó por observación del cese de la movilidad de las mismas y por el agrupamiento de bacterias en los bordes de las larvas.

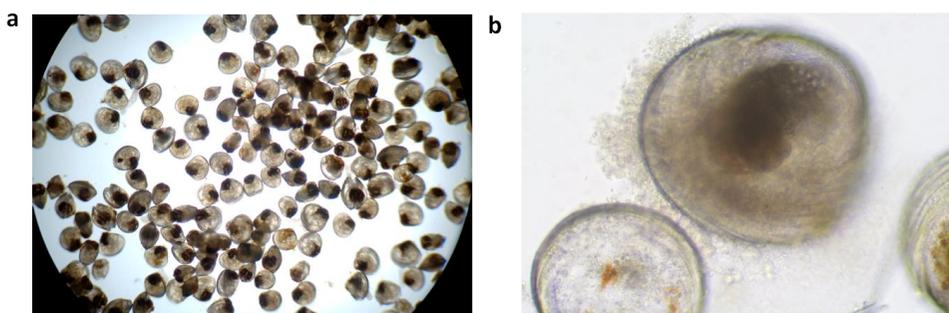
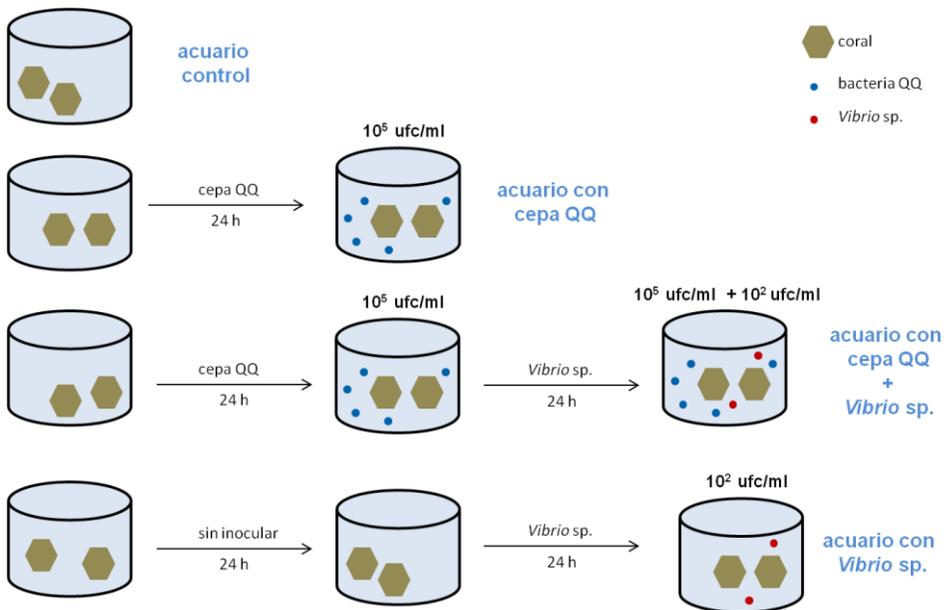


Figura 11. Larvas de *Venerupis corrugata* vivas (a) y muertas (b) observadas al microscopio óptico.

## b) Ensayos con el coral *Oculina patagonica*

Para determinar la actividad QQ sobre una especie de *Vibrio* patógena de coral, se realizaron ensayos *in vivo* con el coral escleroactinio *Oculina patagonica*. Para ello, se prepararon 12 acuarios con SFSW a 24°C, oxigenación continua y ciclos de luz de 12 h/día. En cada uno de ellos se colocaron dos fragmentos de 3 cm<sup>2</sup> del *Oculina patagonica*, que habían sido extraídos previamente en la isla de Tabarca (Alicante). En este caso, para inocular los corales se utilizaron las condiciones óptimas puestas a punto en los cocultivos *in vitro*. Tres de los acuarios fueron inoculados con 10<sup>5</sup> ufc/ml de la cepa QQ, otros tres acuarios con 10<sup>2</sup> ufc/ml de *Vibrio* sp., otros tres fueron inoculados con 10<sup>5</sup> ufc/ml de la cepa QQ junto con 10<sup>2</sup> ufc/ml de *Vibrio* sp. y los otros tres acuarios no se inocularon y fueron utilizados como control. La cepa QQ se inoculó en todos los casos 24 h antes que la cepa de *Vibrio* sp. (Fig. 11).



**Figura 12. Esquema de la inoculación de corales en el ensayo *in vivo* con una cepa con actividad quorum quenching y *Vibrio* sp.**

Para realizar un recuento diario del número de vibrios en el agua de los acuarios y en el tejido del coral se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio TCBS.

Tras diez días de ensayo, se estimó la extensión de la superficie de coral blanqueada utilizando el software de análisis de imágenes *Image-J* (Rasband, 2012). Para medir los niveles de clorofila a tras 5 y diez días de ensayo, 10 ml de tejido homogeneizado del coral se centrifugaron 10 minutos a 5.000 rpm y a 4°C. El pigmento del pellet de algas se extrajo en ausencia de luz con 10 ml de acetona 90 % (v/v) a 4°C durante 24 h, seguidamente se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm y se midió la absorbancia a 750, 664, 647 y 630 nm (Jeffrey y Humphrey, 1975).

### **3.9. Técnicas moleculares**

#### **3.9.1. Extracción de ADN y determinación de su concentración**

##### **a) Extracción de ADN genómico**

La extracción del ADN de las cepas bacterianas se llevó a cabo por el método descrito por Marmur (1961) con las modificaciones de la técnica descrita por Martín-Platero *et al.*, (2007).

Brevemente, se centrifugó 1 ml de un cultivo de 24 horas, se resuspendieron las células con 100 µl de la solución 1 adicionada con 0,1 g de lisozima y 0,5 µl de una solución de ARNasa (40 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se añadió 600 µl de la solución de lisis 2 y se mezcló por inversión suave, dejando a continuación la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se añadieron 0,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para eliminar las proteínas que interfieren en la extracción de ADN y la mezcla se dejó de nuevo 10 minutos a temperatura ambiente. La inactivación enzimática se llevó a cabo incubando la mezcla a 80°C y las proteínas se precipitaron mediante la adición de 200 µl de solución 3. Seguidamente se enfrió en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 600 µl de isopropanol y el ADN precipitado se recogió por centrifugación y se lavó dos veces con etanol al 70 % (v/v), previamente enfriado a -20°C; a continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. El ADN se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente y finalmente se disolvió en agua bidestilada.

Para la secuenciación de genomas completos, el ADN genómico de las cepas implicadas se extrajo usando los kits *MasterPure Complete DNA Purification* (Epicentre) o *Xtrem DNA Extraction* (Xtrem Biotech).

## **b) Extracción de ADN plasmídico y fosmídico**

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit *GenElute Plasmid Miniprep* (Sigma) y para la extracción de ADN fosmídico se usó el kit *Midiprep Purification* (Qiagen). En ambos casos se siguió el protocolo facilitado por los fabricantes. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **c) Determinación de la concentración de ADN**

La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop*, adoptando las recomendaciones del manual de Sambrook y Russell (2001). La concentración de ADN de la muestra se expresó respecto al valor estándar de  $\text{DO}_{260}$  1,0 para soluciones con  $50\ \mu\text{g}$  de ADN de cadena doble. La pureza de la muestra viene dada por la relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  de forma que un valor de esta relación por debajo de 1,8 es indicativo de contaminación por proteínas, exopolisacáridos y/o fenol.

### **3.9.2. Reacción de amplificación de ADN en cadena**

La reacción de amplificación de ADN (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se utilizó con diferentes fines, como la obtención de fragmentos de ADN para su posterior clonaje y la detección de clones positivos con el inserto de interés. Se siguió el protocolo de Saiki *et al.*, (1988) utilizando la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Lawyer *et al.*, 1989). La reacción de ADN contuvieron  $0,5\text{-}1\ \mu\text{g}$  de ADN, 1X tampón con  $\text{MgCl}_2$  (Bioline),  $0,2\ \text{mM}$  dNTPs (Sigma),  $20\ \text{pmol}$  de primers,  $5\ \text{U}$  *Taq* ADN polimerasa (Bioline) y  $50\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada. Las secuencias y función de los primers utilizados se recogen en la Tabla 7, encontrándose subrayados los sitios de restricción de las enzimas de digestión.

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 primers y tiempo de elongación. En general, tras una desnaturalización previa a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, se aplicaron 30 ciclos constituidos por 3 etapas: 30 segundos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos de hibridación de los primers a  $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$  y 60 segundos de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  por cada 1 kb del inserto a amplificar. A continuación, se llevó a cabo un ciclo final de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron mediante el kit *Illustra GFX PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 7. Primers utilizados en este trabajo y su función.**

Primer	Secuencia 5'-3'	Función	Referencia
16F_B27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Identificación taxonómica	Lane, 1991
16R_B1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC	Identificación taxonómica	Lane, 1991
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T	Promega
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T	Promega
ORF29 <sub>NcoI</sub>	CATTTTCAGCAAACCATGGAGGTGA	Clonación de ORF29 en pME6010	Este trabajo
ORF29 <sub>SacI</sub>	TCAAACGAGCTCACGGTGCAAT	Clonación de ORF29 en pME6010	Este trabajo
<i>hqiA</i> <sub>BamHI</sub>	GGATCCATGAGTCAAATCAGCTTGGCG	Expresión y purificación de HqiA en pMAL-C2TEV	Este trabajo
<i>hqiA</i> <sub>HindIII</sub>	AAGCTTTTACGATCCTTCGGGTAAGAAC	Expresión y purificación de HqiA en pMAL-C2TEV	Este trabajo
<i>hqiA</i> F	ATGAGTGAAATCACGTTGGC	Amplificación de <i>hqiA</i>	Este trabajo
<i>hqiA</i> R	CTTTACCCGAAGGATCGTAA	Amplificación de <i>hqiA</i>	Este trabajo
<i>aiiA</i> F	ATGAAGAAAATGAACCATGGA	Amplificación de <i>aiiA</i>	Este trabajo
<i>aiiA</i> R	CTATACAAGCAGTCCAAAAGCC	Amplificación de <i>aiiA</i>	Este trabajo
<i>attM</i> F	GACGCAATGAAACAGAGCCG	Amplificación de <i>attM</i>	Carlier <i>et al.</i> , 2003
<i>attM</i> R	AAGAGCGACCTGAACGAAGC	Amplificación de <i>attM</i>	Carlier <i>et al.</i> , 2003
<i>phzD</i> R	ATGAGCGGCATTCCCGAAATCAC	Amplificación de <i>phzD</i>	Este trabajo
<i>phzD</i> F	TCATTCCAGCACCTCGTCCGGTG	Amplificación de <i>phzD</i>	Este trabajo
<i>pvdQ</i> F	TGGTCGGATCTGTTGAAGAAAGA	Amplificación de <i>pvdQ</i>	Este trabajo
<i>pvdQ</i> R	AAGGTAACGGCCTTAGCCAC	Amplificación de <i>pvdQ</i>	Este trabajo
<i>pvdQ</i> <sub>EcoRI</sub>	ATGAATTCTGGTCGGATCTGTTGAAGAAAGA	Clonación de <i>pvdQ</i> en pUC18	Este trabajo
<i>pvdQ</i> <sub>SalI</sub>	ATCAGCTGAAGGTAACGGCCTTAGCCAC	Clonación de <i>pvdQ</i> en pUC18	Este trabajo
<i>pvdQ</i> <sub>SacI</sub>	GCGGAGCTCGTGAACATACCAAAGAAACG	Clonación de <i>pvdQ</i> en pME6010	Este trabajo
<i>pvdQ</i> <sub>2EcoRI</sub>	GCGGAATTCCTAATTTTCCTCTGACG	Clonación de <i>pvdQ</i> en pME6010	Este trabajo
<i>pvdQ</i> int	CATACTCTCAATCAAGGG	Verificación de dirección de <i>pvdQ</i>	Este trabajo
<i>lacZ</i> RC	GCTTCATCAGGATATCC	Verificación de dirección de <i>pvdQ</i>	Este trabajo

### **3.9.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Las reacciones de PCR, los plásmidos y los fragmentos de ADN originados por digestión con enzimas de restricción se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Ecogen) teñidos previamente con *RedSafe* (Labotaq). Los fragmentos menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 2 % (p/v) disueltos en TBE 1X y los fragmentos mayores en geles al 0,7 % (p/v). Por cada 5 µl de muestra a analizar, se añadió 1 µl de tampón de carga 5X (Bioline) y la mezcla se depositó en un pocillo del gel sumergido en una cubeta con el tampón TBE 1X. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10 V/cm. El ADN se visualizó tras la exposición del gel a la luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador *Universal Hood* (Biorad). Las imágenes se recogieron con una cámara digital acoplada al transiluminador empleando el programa *Gel Doc 2000* (Quantity One, Biorad).

Los marcadores de peso molecular que se utilizaron como referencia del tamaño y concentración de ADN fueron el *Hyperladder I* y *IV* (Bioline) y el marcador  $\lambda$ /*HindIII* originado por la digestión del ADN del fago  $\lambda$  con la enzima de restricción *HindIII*.

### **3.9.4. Recuperación de ADN de geles de agarosa**

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, las bandas elegidas se cortaron con la ayuda de un bisturí. El ADN se recuperó de la agarosa y se concentró utilizando el kit *Illustra GFX PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

### **3.9.5. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas fijadas por el fabricante para cada enzima (Promega, New England, Fermentas).

### **3.9.6. Reacción de ligación de ADN**

Para las reacciones de ligación, los fragmentos de ADN se mezclaron con el correspondiente vector previamente linearizado en relaciones molares vector/inserto variables según el tamaño del fragmento a clonar. La reacción se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante de la enzima T4 ligasa (Promega) en un volumen final de 10 µl.

Para la ligación de productos de PCR el vector de elección fue pGEM-T, componente del kit *pGEM-T Vector System* (Promega), así como los plásmidos pME6010 (Heeb *et al.*, 2000) y pUC18 (Vieira y Messing, 1982). Para la expresión y purificación de proteínas se utilizó el plásmido pMAL-c2TEV del kit *Protein Fusion and Purification System* (New England). Para la mutación de los sistemas QS se utilizaron los plásmidos pME6863 (Dong *et al.*, 2000) y pMIR102 (Zhang *et al.*, 2002). En cuanto al vector empleado en la construcción de la librería metagenómica fue el fósido pCC1FOS, componente del kit *CopyControl Fosmid Library Production* (Epicentre).

### 3.9.7. Transformación de células

#### a) Preparación de células electrocompetentes y transformación por electroporación

La preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* S17  $\lambda$  *pir* y XL1 Blue, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> y *Agrobacterium fabrum* C58 se realizó siguiendo el método de Hanahan (1983). En cuanto a la preparación de células electrocompetentes de *Vibrio* spp., se realizó de la misma forma que las anteriores, pero en vez de lavar las células con agua, se lavaron con una solución de sacarosa 300 mM.

La transformación de las células competentes con ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de electroporación descrito en el Manual de Sambrook y Russell (2001) utilizando un electroporador Micropulser (Biorad). Seguidamente, se añadieron 750  $\mu$ l de medio líquido LB (o CM en el caso de *Vibrio* spp.) a la cubeta de electroporación para recuperar las células y se incubaron a 37°C (o a 25°C en el caso de *Vibrio* spp.) durante 60-90 minutos en agitación para permitir la replicación y posterior expresión de los genes del plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido se seleccionaron sembrando alícuotas de la suspensión celular en placas de LB sólido o AM suplementado con los antimicrobianos adecuados o bien mediante la selección de colonias blancas en medio LB sólido suplementado con antibióticos, IPTG y X-gal. Las placas se incubaron a 25°C o 37°C durante 16 horas.

#### b) Preparación de células competentes con CaCl<sub>2</sub> y transformación por choque térmico

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con CaCl<sub>2</sub> para su posterior transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Manual de Sambrook y Russell (2001).

La transformación de las células competentes con ADN plasmídico se llevó a cabo mediante choque térmico tal y como se describe en el manual de Sambrook y Russell (2001). Las células que habían adquirido el plásmido se seleccionaron en placas de LB suplementado con los antimicrobianos adecuados, IPTG y X-gal.

### **3.9.8. Conjugación**

La transferencia de construcciones plasmídicas se realizó en algunos casos mediante conjugación biparental (Herrero *et al.*, 1990). Como bacteria donadora se utilizó *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*, portadora de los distintos plásmidos, y como cepa receptora se emplearon cepas mutantes espontáneas a la rifampicina de *Vibrio* spp. Se centrifugaron los cultivos del donador y receptor al inicio de la fase logarítmica y los sedimentos se lavaron dos veces con el fin de eliminar sales y antibióticos de los medios de cultivo. A continuación, se resuspendieron las células en el medio adecuado y se mezclaron en una ratio donador:receptor 1:3 y se depositaron en un filtro de 0,22  $\mu$ M estéril dispuesto sobre el medio de conjugación. Las placas se incubaron durante 24 h a la temperatura adecuada, y el filtro se resuspendió en 800  $\mu$ l del medio indicado. Las células que habían adquirido el plásmido por conjugación se seleccionaron sembrando alícuotas de la suspensión celular en placas de medio sólido suplementado con los antimicrobianos adecuados.

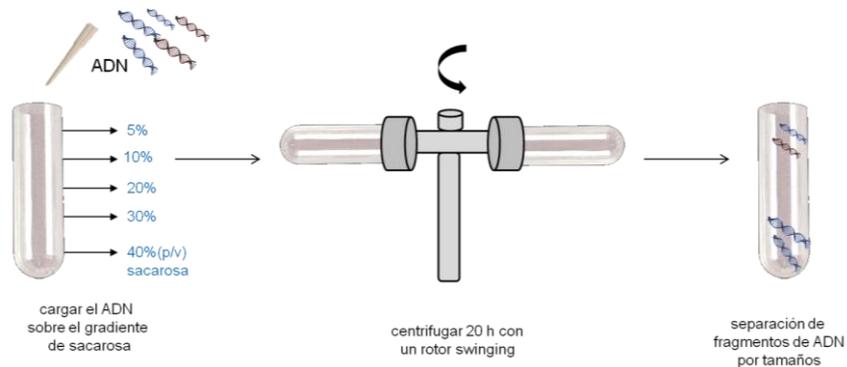
### **3.9.9. Construcción de una librería metagenómica y búsqueda de genes con actividad quorum quenching**

#### **a) Construcción de la librería metagenómica**

La muestra de suelo utilizada para la construcción de la librería metagenómica fue tomada en noviembre de 2007 en Finca la Salina (Rambla Salada, Murcia) (38°07'34.44" N, 1°07'11.13" W) (muestra S1C, Tabla 6) y fue estudiada previamente por nuestro grupo de investigación. Este suelo, considerado como salino, presentó las siguientes propiedades fisicoquímicas: alta salinidad (11,8 g/l), bajo contenido en oxígeno (13 mg/l) y un pH alto (8,3) (Oueriaghli *et al.*, 2013).

El ADN total de 10 g de suelo se había extraído previamente usando el kit *PowerMax Soil DNA Isolation* (Mbio) siguiendo las instrucciones del fabricante (Oueriaghli *et al.*, 2013). Para generar ADN compatible con la construcción de la librería metagenómica, el ADN se fragmentó pipeteando varias veces y se separaron los distintos fragmentos mediante un gradiente de sacarosa. Para ello, se depositaron 100  $\mu$ g de

ADN metagenómico fragmentado en tubos de 17 ml en los que había un gradiente de sacarosa del 5 al 40 % (p/v). Mediante centrifugación a 28.000 rpm a 10°C durante 20 h con una ultracentrífuga L-80 XP Optima (Beckman Coulter) asociada a un rotor SW28.1-Ti de tipo swinging (Beckman Coulter) se fueron separando los fragmentos según su tamaño molecular (Fig. 13).



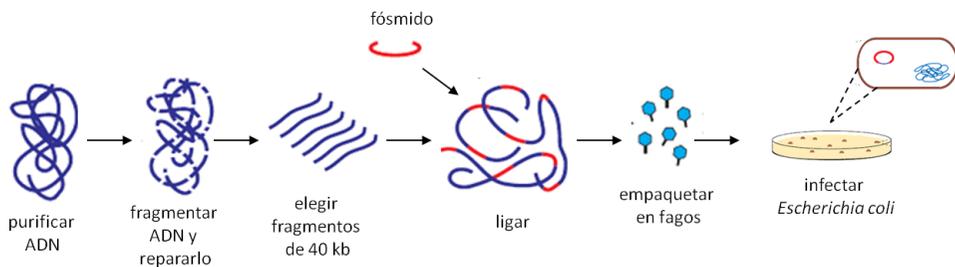
**Figura 13. Separación de ADN en un gradiente de sacarosa mediante ultracentrifugación con un rotor de tipo swinging.**

Tras la ultracentrifugación se perforaron los tubos por la parte inferior y se recogieron fracciones de 200  $\mu$ l cada una (Fig.14). Durante 24 h se precipitó el ADN en cada una de ellas con NaCl 5 M y etanol frío. Posteriormente, se lavaron dos veces con etanol 70 % (v/v) y se resuspendieron en 20  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. El tamaño del ADN de cada una de las fracciones se estimó en un gel de agarosa 0,8 % (p/v) comparando con el marcador  $\lambda$ HindIII. Las fracciones de interés (~40 kb) se juntaron y se usaron en la etapa siguiente.



**Figura 14. Perforación del tubo y recogida de fracciones de la muestra de ADN tras la ultracentrifugación**

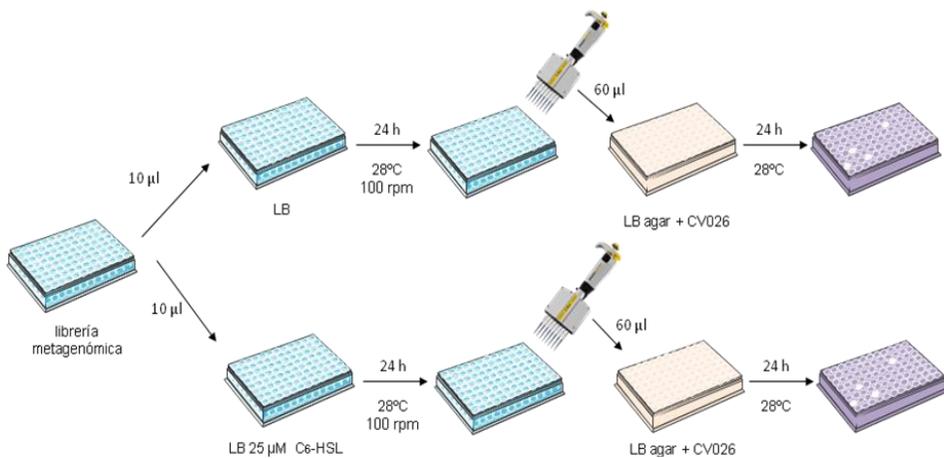
Para la construcción de la librería metagenómica se usó el kit *CopyControl Fosmid Library Production* (Epicentre) con algunas modificaciones en el protocolo del fabricante. Los fragmentos de ADN de 40 kb recuperados tras la ultracentrifugación fueron reparados en sus extremos para generar ADN fosforilado con extremos romos, ligados en el fósrido pCC1FOS (Epicentre) y empaquetados en fagos  $\lambda$  utilizando los extractos MaxPlax<sup>TM</sup> (Epicentre). A continuación, *E. coli* EPI300 T1<sup>R</sup> fue infectado con los bacteriofagos empaquetados y se incubó 1 h a 37°C (Fig. 15). Para determinar el tamaño y la diversidad de los insertos de ADN, se extrajeron y purificaron los fósridos de diversos clones individuales y se llevó a cabo una digestión con la enzima *EcoRI*. Los patrones de restricción de los distintos insertos se evaluaron en un gel de agarosa 0,8 % (p/v) comparando con el marcador  $\lambda$ /*HindIII*.



**Figura 15. Esquema de la construcción de la librería metagenómica.**

## b) Búsqueda de genes QQ de la librería metagenómica y selección de los clones

La librería metagenómica se diluyó en un volumen de 500 ml de LB adicionado de Cm para obtener una concentración final de 250 clones por ml. Se distribuyeron 200  $\mu$ l de esta suspensión por pocillo en placas microtiter de 96 pocillos (~50 clones por pocillo) y se incubaron 24 h a 37°C. Tras este tiempo, 100  $\mu$ l del cultivo de fósmidos de cada pocillo se transfirieron a placas microtiter nuevas con medio LB fresco y otros 100  $\mu$ l del cultivo de fósmidos se transfirieron a placas microtiter con medio LB adicionado de C<sub>6</sub>-HSL (25  $\mu$ M) y se incubaron a 28°C durante 24 h (Fig. 16). A continuación, se detectaron las AHLs remanentes mediante un ensayo en microtiter (Torres *et al.*, 2016b). Para ello, placas microtiter de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de LB agar 1,5 % (p/v) por pocillo fueron inoculadas con 10  $\mu$ l de sobrenadante de cada cultivo de fósmidos (con o sin C<sub>6</sub>-HSL). A continuación, se añadieron 60  $\mu$ l por pocillo de *C. violaceum* CV026 y se incubaron 24 h a 28°C para que se desarrollase el color púrpura. En todos los casos se utilizó medio fresco LB suplementado con C<sub>6</sub>-HSL como control negativo (Fig. 16).



**Figura 16. Ensayo en placa microtiter de la actividad quorum sensing y quorum quenching de los clones de la librería metagenómica.**

Los fósmidos de los clones seleccionados en los pocillos positivos se purificaron utilizando el kit *Midi Prep Purification* (Qiagen) y se transfirieron a *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* por electroporación para futuros análisis.

Para determinar la actividad degradadora de AHLs de los clones seleccionados, se añadieron AHLs sintéticas (C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, 3-O-C<sub>6</sub>-

HSL, C<sub>8</sub>-HSL, 3-O-C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y C<sub>14</sub>-HSL) a 500 µl de un cultivo de *E. coli* S17 λ *pir* transformado con el fósido y se incubaron a 28°C y a 100 rpm durante 24 h. Como control negativo, se utilizó medio LB suplementado con la misma concentración de moléculas AHLs y se incubó en las mismas condiciones. Las AHLs remanentes en cada cultivo tras 24 h de incubación se detectaron mediante un ensayo de difusión en placa Petri con los biosensores *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 tal y como se ha descrito previamente.

### **c) Identificación del gen con actividad quorum quenching en el clon seleccionado**

La identificación del gen responsable de la actividad degradadora de AHLs en el clon positivo se realizó mediante distintos clonajes. Previamente, se extrajo su fósido y se realizó la secuenciación en una plataforma 454 GS Junior (Roche). A continuación, se amplificaron y ligaron en pGEM-T fragmentos de ~5 kb del inserto para determinar que fragmento confería a *E. coli* S17 λ *pir* la actividad QQ. Seguidamente, se clonaron los distintos ORFs presentes en el fragmento seleccionado y se ensayó la actividad QQ frente a todas las AHLs disponibles.

### **d) Evaluación de la actividad del gen quorum quenching *in vivo***

La habilidad del gen de QQ seleccionado en la librería metagenómica de interferir funciones celulares reguladas por QS se analizó mediante su expresión en varios sistemas heterólogos. Se evaluó el efecto de la degradación de AHLs sobre algunos de los fenotipos regulados por QS en el patógeno de plantas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> (véase apartado 3.4) y se analizó la capacidad de dicho gen de interferir la patogenicidad *in vivo* en un ensayo con patatas (*Solanum tuberosum*) similar al descrito por Smadja *et al.*, (2004). Para ello, 20 µl de cultivos (DO<sub>600</sub> 2,0) de la cepa silvestre y las cepas con el plásmido vacío o expresando el gen de QQ se inocularon sobre rodajas de patata previamente esterilizadas en superficie durante 15 minutos con lejía 10 % (v/v). Las patatas se incubaron 48 h a 28°C dentro de placas Petri con papel mojado para mantener la hidratación. Como control negativo se inoculó medio LB sobre rodajas de patata. Los síntomas y las zonas de maceración se observaron visualmente tras dos días de incubación.

También se ensayó la capacidad del gen de QQ de interferir *in vivo* el sistema QS de otra bacteria patógena de plantas, *Agrobacterium fabrum* C58. Para ello se realizó un ensayo con lechugas (*Latuca sativa*) siguiendo una modificación del protocolo de Felix *et al.*, (2014). Se inocularon plantas de ~8 cm con cultivos de la cepa silvestre de *A.*

*fabrum* así como de la cepa expresando el plásmido vacío y con el gen de QQ. Como control negativo se utilizó medio LB sin inocular. Los cultivos (DO<sub>600</sub> 2,0) y el medio LB se inocularon en la tierra (1 ml) y en el tallo de la planta (50 µl) a través de una incisión realizada con un bisturí estéril. Las plantas se mantuvieron en un invernadero a 25°C y fueron regadas cada tres días con agua estéril. Los síntomas se observaron tras 25 días

### **3.9.10. Secuenciación, tratamiento y análisis de las secuencias**

#### **a) Productos de PCR**

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Granada) utilizando un secuenciador 373 Stretch de Applied Biosystems. Para ello, se empleó el método *Big Dye Terminators* (Perkin Elmer), que utiliza en la reacción de extensión la enzima ADN polimerasa AmpliTaq y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

Los cromatogramas de las secuencias fueron comprobados visualmente para corregir los posibles errores con el programa Chromas 2.33. Seguidamente, estas secuencias se compararon con las disponibles en las bases de datos EMBL y GenBank mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de internet del NCBI, y el programa EzTaxon Server 2.1 (Kim *et al.*, 2012).

#### **b) Genomas completos**

Para la secuenciación de genomas completos, se prepararon librerías de ADN genómico usando los kits *Template Preparation* y *P6 DNA Polymerase Binding* (Pacific Biosciences). A continuación, las librerías se secuenciaron mediante la tecnología *Single Molecule Real-Time* (SMRT) en una plataforma PacBio RSII (Pacific Biosciences) en la Universidad de Kuala Lumpur (Malasia) y las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas usando el software Hierarchical Genome-Assembly Process (HGAP). A continuación, los genomas fueron anotados utilizando la herramienta Prokka (Seemann, 2014).

#### **c) Fósmidos**

La secuenciación de fósmidos se llevó a cabo mediante pirosecuenciación en un secuenciador 454 GS Junior (Roche). El ADN se disolvió en buffer TE y fue nebulizado para generar fragmentos de 450 pb. Tras la ligación de los adaptadores, se llevó a cabo una PCR de

emulsión usando el kit emPCR amplification Lib-L (Roche) siguiendo los criterios de calidad recomendados por el fabricante. El ensamblaje de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación se llevó a cabo utilizando el programa Newbler v2.5 (Roche). Se obtuvo un solo contig de 50.457 pb que correspondió a 8.139 pb del fósforo pCC1FOS y 42.318 pb del inserto de ADN metagenómico.

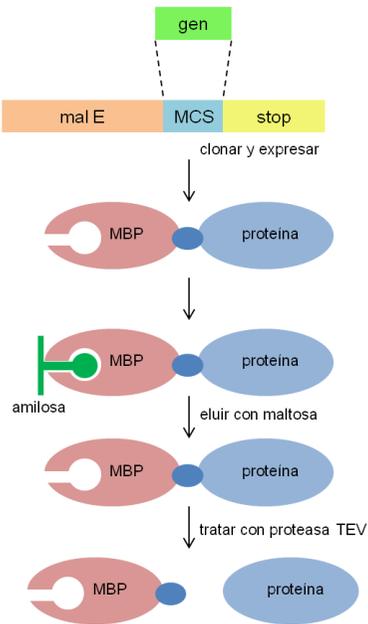
La predicción de los ORFs de dicho inserto fue llevada a cabo con las aplicaciones RAST y GeneMark (Besemer y Borodovsky, 2005; Overbeek *et al.*, 2014). A continuación, el análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada ORF se realizó con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) y su contenido de G+C se calculó utilizando la herramienta GC-Profile (Gao y Zhang, 2006).

En cuanto a las proteínas codificadas por cada ORF, sus secuencias fueron comparadas con las disponibles en la base de datos BLASTX (Altschul *et al.*, 1997). Por otro lado, los alineamientos múltiples de secuencias y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando la herramienta Seaview (Gouy *et al.*, 2010) y Clustal O (Sievers y Higgins, 2014). Los análisis de Maximum likelihood (ML) se llevaron a cabo con 1000 réplicas. Los árboles filogenéticos se construyeron con PhyML usando el modelo LG, usando las opciones NNI (del inglés *nearest-neighbor interchange*) y BioNJ.

### **3.9.11. Expresión y purificación de proteínas**

Para la expresión y purificación de proteínas, los productos de PCR se ligaron en el plásmido de expresión pMAL-c2X (New England), en el que el sitio de división del factor Xa ha sido sustituido por un sitio para una proteasa TEV (del inglés *tobacco etch virus*). A continuación, la construcción resultante se transformó en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Esta construcción se incubó a 37°C hasta que se alcanzó una  $DO_{600}$  0,5 y se le añadió IPTG 1 mM para inducir la producción de la proteína. Tras incubarla a 37°C durante 6 h, se centrifugó el cultivo a 10.000 rpm durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en buffer CLB y se sonicaron durante 10 minutos. La fracción soluble se clarificó por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó por columnas de cromatografía de afinidad MBPTrap HP (GE Healthcare), que se lavaron con CLB hasta que el nivel de proteína en el lavado fue imperceptible. A continuación, la proteína recombinante de la columna fue eluida con CLB suplementada con maltosa 10 mM. La fracción eluida se digirió durante 24 h a 4°C en el mismo buffer con 1 mg de la proteasa recombinante TEV por cada 25 mg de proteína (Parks *et al.*, 1994) (Fig. 17). Las muestras digeridas se cargaron en columnas de cromatografía por intercambio iónico DEAE Sephacel (GE Healthcare)

y la proteína fue eluída con un gradiente lineal de NaCl de 100 a 500 mM. Las fracciones eluídas se juntaron y su concentración en proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La pureza de la proteína se estimó por un gel SDS-PAGE 12 % (p/v). Los tamaños de las proteínas se examinaron con los marcadores de proteínas *Page Ruler* y *Spectra Multicolor* (Thermo Scientific).



**Figura 17. Esquema de la expresión y purificación de proteínas.**





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### **4.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de interferir o inhibir los sistemas quorum sensing**



#### 4.1.1. Resumen

Una nueva alternativa para resolver el problema de las enfermedades infecciosas en la acuicultura es la interrupción de los mecanismos quorum sensing de las bacterias patógenas. Para abordar esta estrategia hemos estudiado una colección de 146 aislados bacterianos procedentes de un criadero de moluscos Lugo y otra colección de 450 aislados procedentes de un criadero de peces y moluscos de Granada.

Se han seleccionado en total 22 cepas con una elevada capacidad degradadora de AHLs tanto sintéticas como producidas por otros microorganismos. Se han identificado taxonómicamente y se ha analizado el tipo de enzimas quorum quenching que poseen.

Además, tres de estas cepas se han utilizado en ensayos *in vivo* en la almeja babosa *Venerupis corrugata* y en el coral escleractinio *Oculina patagonica*, donde han disminuido su mortalidad frente a infecciones por especies patógenas de *Vibrio*, por lo que estas cepas podrían utilizarse como herramientas futuras para el tratamiento de enfermedades en el sector de la acuicultura.



#### 4.1.1. Summary

***A new alternative to fight infectious diseases in aquaculture is the interruption of the quorum-sensing systems of pathogenic bacteria. In order to approach this strategy, we have studied a collection of 146 bacterial isolates from a mollusc hatchery in Lugo and another collection of 450 isolates isolated from a fish and mollusc farm in Granada.***

***A total of 22 strains with a high capacity for degrading AHLs molecules, both synthetic and produced by other microorganisms, have been selected. They have been taxonomically identified and it has been analyzed the type of quorum quenching enzymes they possess.***

***In addition, three of these strains have been used in vivo in the pullet carpet shell *Venerupis corrugata* and in the scleractinian coral *Oculina patagonica*, where they have decreased mortality against infections produced by pathogenic species of *Vibrio*. Therefore, these strains could be used as future tools for the treatment of diseases in the aquaculture sector.***



## 4.1.2. Resultados

### 4.1.2.1. Selección de bacterias con actividad quorum quenching en un criadero de moluscos de Lugo

#### a) Ensayo de la actividad degradadora de AHLs

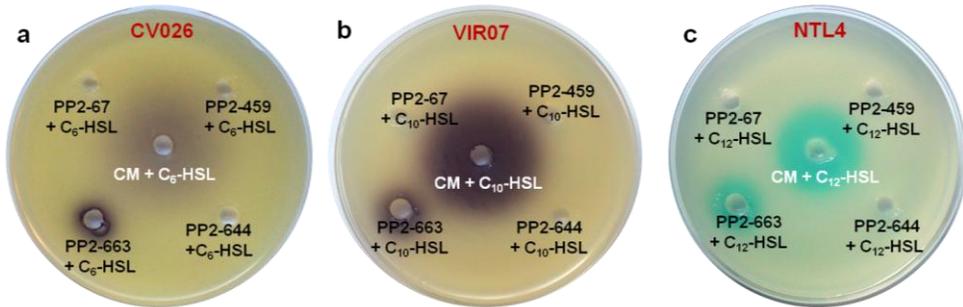
Las 146 cepas marinas estudiadas en este trabajo fueron aisladas en el criadero de moluscos Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (Lugo), donde el agua de mar que circula por las instalaciones proviene del mar Cantábrico, con un valor medio anual de salinidad de 33-36 g/l y de temperatura 12-20°C (43°32'24,9"N, 7°02'15,92" W). En total, una colección de 15 cepas se aislaron de tanques con cultivos de larvas de longueirón (*Ensis siliqua*), 7 cepas se aislaron de cultivos de larvas de longueirón vello o navaja (*Solen marginatus*), 61 cepas se obtuvieron de cultivos de larvas de almeja fina (*Venerupis decussatus*), 36 cepas se aislaron de tanques con larvas de almeja japonesa (*V. philippinarum*) y 27 cepas se obtuvieron de cultivos de larvas de almeja babosa (*V. corrugata*).

Para evaluar la actividad degradadora de cada una de las cepas realizamos un primer ensayo frente a las moléculas de cadena acil media y larga C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL. Tras 24 h de incubación con cada una de las moléculas, detectamos las AHLs remanentes en un ensayo de difusión en placa usando los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07. De las 146 cepas ensayadas, seleccionamos 35 por no activar a los biosensores empleados, indicando que habían degradado las moléculas C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL.

El segundo ensayo se realizó a las 35 cepas seleccionadas utilizando cinco tipos de moléculas señal AHLs sintéticas con cadena acil de longitud variable y sustituciones químicas (C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL). Tras 24 h de incubación con cada AHL, detectamos las moléculas remanentes con los biosensores *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) (Fig. 18). La no aparición de un color púrpura en el caso de *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 o azul en el caso de *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) indicó que no había AHLs y éstas podrían haber sido degradadas. Como control positivo se empleó *Tenacibaculum discolor* 20-J y como control negativo, el medio CM adicionado de AHLs.

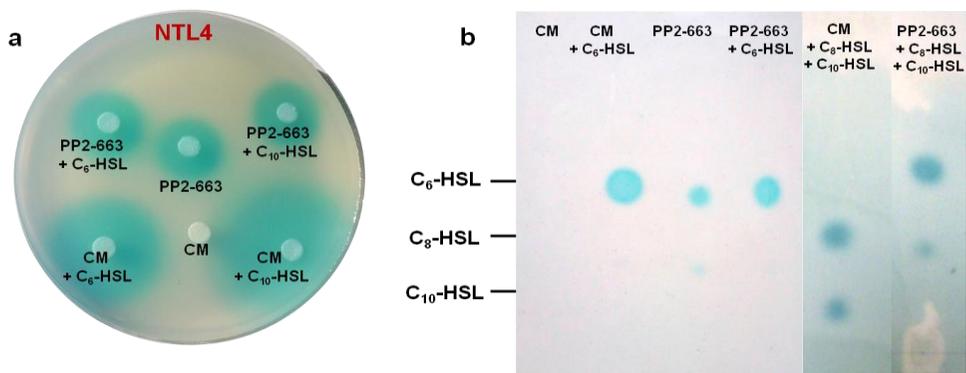
Tras estos ensayos, seleccionamos 10 cepas del total de 146 cepas iniciales debido a su capacidad de degradar una gran variedad de moléculas AHLs. Estos experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre los mismos resultados. Las cepas con mayor

actividad fueron PP2-67, PP2-459, PP2-644 y PP2-663 (Fig. 23), por lo que fueron seleccionadas para los siguientes ensayos (Tabla 8).



**Figura 18. Ensayo de difusión en placa Petri de la actividad degradadora de AHLs de cepas marinas aisladas de un criadero de Lugo.** Detección de AHLs con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 (a), *Chromobacterium violaceum* VIR07 (b) y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (c).

De forma paralela, llevamos a cabo otro ensayo de difusión en placa Petri para determinar la producción de moléculas AHLs por parte de las 10 cepas seleccionadas como degradadoras de AHLs. Solo la cepa PP2-663 sintetizó moléculas detectables por los tres biosensores empleados. Para confirmar la naturaleza de las AHLs producidas por esta cepa, analizamos los extractos de 5 ml de cultivo mediante un ensayo de difusión en placa Petri y TLC con una sobrecapa del biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Fig. 19). Pudimos observar dos manchas con movilidades similares a los patrones C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL. Este análisis confirmó que la cepa PP2-663, además de degradar AHLs, tiene un sistema QS dependiente de AHLs.



**Figura 19. Evaluación de la producción y degradación de AHLs de la cepa PP2-663.** Ensayo de difusión en placa Petri (a) y en TLC (b) usando el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

Para identificar taxonómicamente las cepas seleccionadas por su capacidad degradadora de AHLs, se compararon las secuencias del gen ARNr 16S con las secuencias depositadas en las bases de datos utilizando los programas BLAST y EzTaxon-e. Las cepas mostraron homología con especies de los géneros *Alteromonas* (7 cepas), *Thalassotalea* (1 cepa), *Muricauda* (1 cepa) y *Paracoccus* (1 cepa) (Tabla 8), pertenecientes a las familias *Alteromonadaceae*, *Colwelliaceae*, *Flavobacteriaceae* y *Rhodobacteraceae*.

Como puede observarse en la Tabla 8, la cepa PP2-459, perteneciente al género *Thalassotalea* (anteriormente denominado *Thalassomonas*) y la cepa PP2-663, perteneciente al género *Paracoccus*, podrían ser nuevas especies debido al bajo nivel de homología que presentan con las especies más relacionadas filogenéticamente. Actualmente se está llevando a cabo la identificación de ambas cepas, pero de momento, únicamente la secuencia parcial de la cepa PP2-459 se encuentra depositada en la base de datos EMBL bajo el número de acceso LN898116.

En cuanto a su origen, las cepas PP2-67, PP2-93 y PP2-404, proceden de tanques con *Ensis siliqua*; las cepas PP2-73, PP2- 489 y PP2-490 corresponden con cultivos de *Solen marginatus*; las cepas PP2-459 y PP2-664 proceden de tanques con *Venerupis decussata* y las cepas PP2-663 y PP2-678 vienen de tanques con *V. philippinarium*.

**Tabla 8. Actividad QQ frente AHLs sintéticas de las cepas seleccionadas en el criadero de Lugo e identificación taxonómica.**

Cepa	C <sub>6</sub> -HSL	C <sub>6</sub> -HSL	C <sub>8</sub> -HSL	C <sub>10</sub> -HSL	C <sub>12</sub> -HSL	3-O-C <sub>12</sub> -HSL	3-OH-C <sub>10</sub> -HSL	Identificación taxonómica y % de identidad
PP2-67	+	++	++	++	++	+	+	<i>Alteromonas marina</i> 99,71 %
PP2-459	++	++	++	++	++	++	++	<i>Thalassotalea agariperforans</i> 96,59 %
PP2-644	+	++	++	++	++	+	+	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,29 %
PP2-663	++	++	++	++	++	++	++	<i>Paracoccus homiensis</i> 97,42 %
PP2-73	-	++	+	++	++	-	-	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,92 %
PP2-93	-	++	+	++	++	-	-	<i>Alteromonas macleodii</i> 99, 63 %
PP2-404	-	++	+	++	++	-	-	<i>Alteromonas marina</i> 99, 84 %
PP2-489	-	++	+	++	++	-	-	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,92 %
PP2-490	-	++	+	++	++	-	-	<i>Alteromonas marina</i> 99,78 %
PP2-678	-	++	+	++	++	-	-	<i>Muricauda ruestringensis</i> 99,33 %

++: degradación total, +: degradación parcial, -: no degradación

## b) Confirmación de la actividad degradadora de AHLs mediante HPLC/MS

Para confirmar la capacidad de degradar moléculas AHLs de las 4 cepas seleccionadas (PP2-67, PP2-459, PP2-644 y PP2-663) y descartar que la inactivación de los biosensores fuese debida a una molécula QSI o a un antagonista de los mismos, realizamos ensayos cuantitativos de HPLC/MS.

Las cepas ensayadas redujeron de forma significativa la concentración de las moléculas AHLs ensayadas, mostrando más de un 60 % de actividad en todos los casos. La degradación fue superior frente a C<sub>8</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL en todas las cepas (Fig. 20). Los ensayos se repitieron tres veces, obteniendo siempre los mismos valores, confirmándose así una actividad degradadora de AHLs o quorum quenching por parte de las cepas seleccionadas. La eficiencia de la degradación se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) (P<0.05) (McHugh, 2011). Los distintos grupos de significancia obtenidos tras un test *post-hoc* de Student-Newman-Keuls se representan en la Figura 20 con letras.

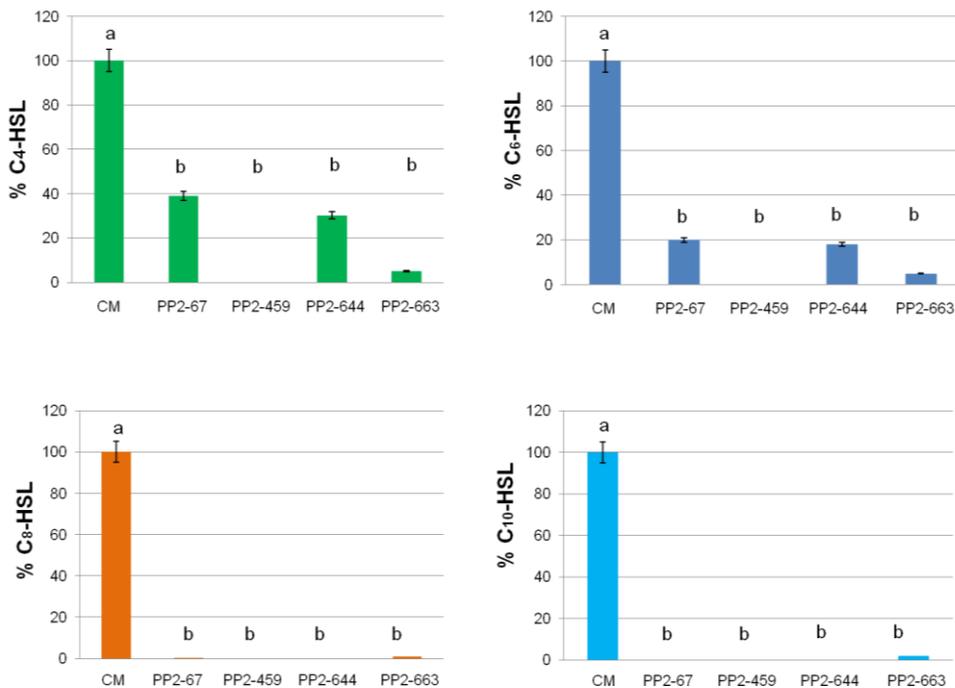


Figura 20. Cuantificación mediante HPLC de las AHLs remanentes tras los ensayos de QQ con las cepas seleccionadas del criadero de Lugo.

Tras estos ensayos, seleccionamos las cepas PP2-459 y PP2-663 para los siguientes ensayos *in vitro* e *in vivo* frente a patógenos debido a que mostraron la mayor capacidad degradadora de las cepas analizadas. Como puede verse en la Figura 20, la cepa PP2-459 presentó una actividad de degradación de las moléculas AHLs ensayadas del 100 % en todas las replicas realizadas. Respecto a la cepa PP2-663, su actividad QQ es superior al 95 % en todas los ensayos, y los niveles tan bajos de AHLs remanentes que se detectan por HPLC (Fig. 20) podrían ser debidos a su propia producción de moléculas AHLs (Fig. 19). Estos análisis se repitieron por triplicado y se obtuvieron siempre resultados significativamente similares.

### **c) Estudio de la actividad QQ frente a extractos de AHLs de origen natural**

Para evaluar si las cepas PP2-459 y PP2-663 poseían potencial para ser aplicadas *in vivo* en siguientes ensayos, evaluamos en primer lugar su capacidad para eliminar *in vitro* AHLs producidas por otros microorganismos. Para ello, determinamos la actividad QQ de las cepas PP2-459 y PP2-663 frente a los extractos de AHLs de *Halomonas anticariensis* FP35<sup>T</sup>, una bacteria halófila moderada no patógena que produce C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL y C<sub>12</sub>-HSL; frente al patógeno de peces y moluscos *V. anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, que produce principalmente 3-O-C<sub>10</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL; y frente a los patógenos de moluscos bivalvos *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup> y *V. neptunius* PP-145.98, que producen AHLs detectables por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) pero cuya estructura química aún no se ha descrito (Hada *et al.*, 1984; Prado *et al.*, 2005; Mohamad *et al.*, 2015). Las AHLs remanentes se detectaron primero en un ensayo en difusión en placa y posteriormente se analizaron por TLC. Para el revelado, utilizamos *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). En ningun caso se detectaron moléculas AHLs remanentes ni de *H. anticariensis* FP35<sup>T</sup> ni de las especies patógenas *V. anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup> y *V. neptunius* PP-145.98, por lo que podemos decir que la actividad de PP2-459 y PP2-663 frente a los extractos de estas bacterias fue del 100 %. En la Figura 21 se muestran los resultados de la actividad QQ de la cepa PP2-459 frente a los extractos de AHLs de *H. anticariensis* FP35<sup>T</sup> y *V. anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>

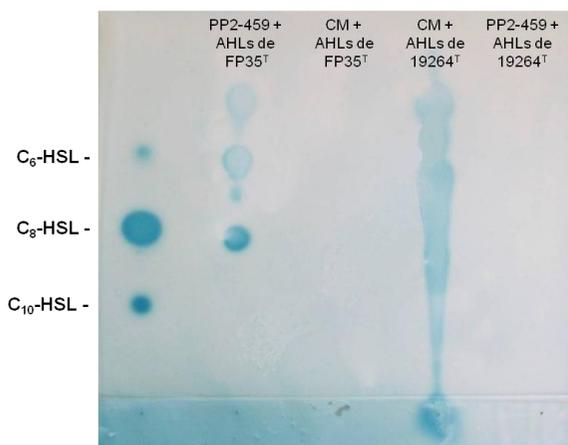


Figura 21. Análisis por TLC de la actividad degradadora de PP2-459 frente a los extractos de AHLs de *Halomonas anticariensis* FP35<sup>T</sup> y de *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>. Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

#### d) Localización de la actividad quorum quenching de las cepas PP2-459 y PP2-663

Para determinar la localización celular de la enzima QQ, se obtuvo el sobrenadante (SB) y el extracto celular crudo (CCE) de cultivos de las cepas PP2-459 y PP2-663. Seguidamente, éstos se utilizaron para realizar ensayos de degradación de las moléculas C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL. Tras 24 h de incubación se detectaron las AHLs remanentes en un ensayo de difusión en placa Petri, en el que se encontró que la actividad QQ de ambas cepas se encuentra en el extracto celular crudo y no en el sobrenadante. En la Figura 22 se muestra el ensayo de degradación del sobrenadante y del extracto celular crudo de la cepa PP2-459.

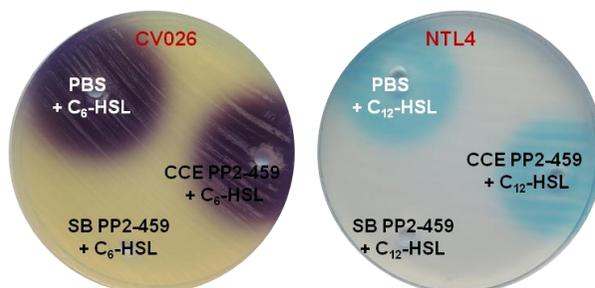


Figura 22. Ensayo de la actividad QQ del sobrenadante y extracto celular crudo de la cepa PP2-459. Detección de AHLs con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

### e) Identificación del tipo de actividad quorum quenching de las cepas PP2-459 y PP2-663

Para determinar si la actividad quorum quenching de las cepas PP2-459 y PP2-663 era debida a una enzima lactonasa, acidificamos los sobrenadantes de los cultivos con C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL (Fig. 23) y cuantificamos las AHLs presentes de nuevo mediante HPLC. Esta acidificación permite la reestructuración o cierre del anillo lactónico de la AHL en el caso de que éste se haya abierto previamente debido a la acción de una enzima lactonasa. En ningún caso se recuperaron los niveles iniciales de AHLs de forma significativa frente al control (Fig. 23), indicando que su degradación previa había sido debida a un tipo de enzima QQ diferente a una lactonasa, como podría ser una acilasa o un oxidorreductasa.

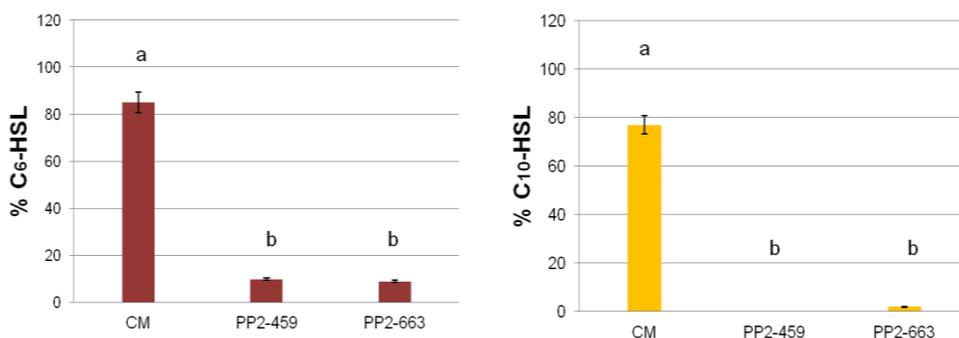
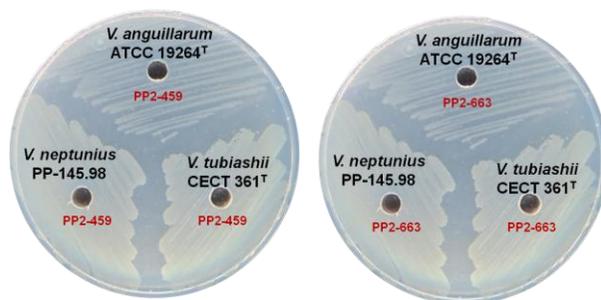


Figura 23. Cuantificación mediante HPLC de AHLs tras la acidificación de las reacciones de quorum quenching con las cepas PP2-459 y PP2-663.

### f) Cocultivos *in vitro* entre las cepas PP2-459 y PP2-663 y *Vibrio* spp. patógenos

Antes de llevar a cabo ensayos de cocultivo con las cepas PP2-459 y PP2-663, evaluamos si éstas interferían en el crecimiento de 3 cepas de las especies patógenas *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup> y *V. neptunius* PP-145.98. Como controles negativos se usaron los medios CM y SFSWYE. Nuestros resultados indicaron que las cepas PP2-459 y PP2-663 no producen ningún efecto negativo sobre el crecimiento de las cepas de *Vibrio* ensayadas (Fig. 24).



**Figura 24. Ensayo de antagonismo de las cepas PP2-459 y PP2-663 sobre cepas patógenas de *Vibrio* spp.**

A continuación, se realizaron cocultivos *in vitro* con el fin de poner a punto las condiciones óptimas para llevar a cabo futuros ensayos *in vivo*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de cocultivos de las cepas PP2-459 y PP2-663 y cada una de las especies patógenas de *Vibrio* en medio SFSWYE distintas concentraciones o ratios:  $10^4$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml de las cepas PP2-459 y PP2-663,  $10^5$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml de las cepas PP2-459 y PP2-663, y por último,  $10^4$  ufc/ml de las cepas PP2-459 o PP2-663 con  $10^6$  ufc/ml de *Vibrio* sp. Tras 24 h de incubación, se detectaron las AHLs remanentes en los cocultivos mediante un ensayo de difusión en placa con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4). El mejor resultado de degradación de AHLs se obtuvo cuando  $10^4$  ufc/ml de un cultivo de *Vibrio* sp. se añadió a un cultivo de  $10^6$  ufc/ml de las cepas PP2-459 o PP2-663, ya que hubo una degradación total de las AHLs de *Vibrio* sp. en estas condiciones. Esta ratio se mantuvo a lo largo de la incubación de 24 h, como pudo confirmarse mediante el recuento en medio TCBS (donde *Vibrio* sp. produce colonias amarillas) y en medio AM (donde *Vibrio* sp. produce colonias lisas y las cepas PP2-459 y PP2-663 producen colonias transparentes con forma de huso).

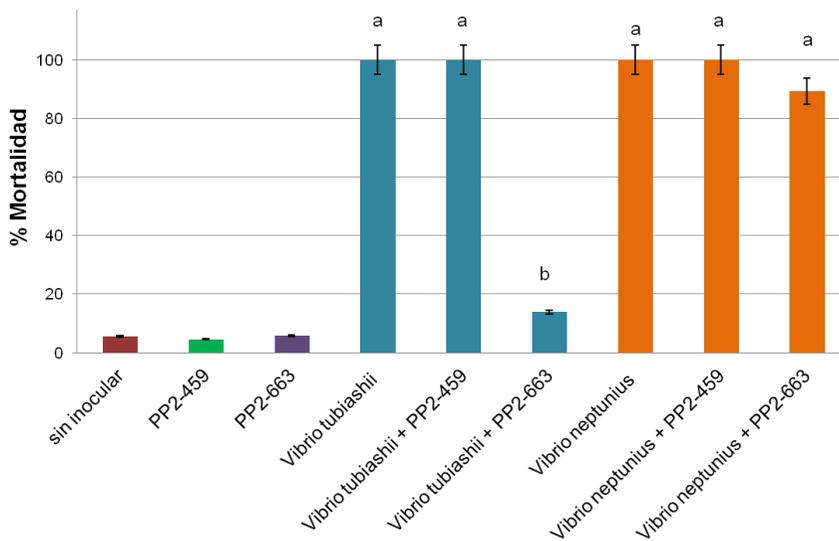
#### **g) Ensayos *in vivo* con la almeja babosa *Venerupis corrugata***

Para evaluar la actividad *in vivo* de las cepas degradadoras de AHLs PP2-459 y PP2-663, se realizaron unos ensayos preliminares con larvas de almeja babosa *Venerupis corrugata*. Los ensayos se realizaron con las bacterias patógenas de moluscos bivalvos *Vibrio tubiashii* CECT 631<sup>T</sup> y *V. neptunius* PP-145.98.

En la Figura 25 se muestran los porcentajes de mortalidades larvianas registradas a las 48 horas para cada uno de los tratamientos. Están representados los valores medios de las tres réplicas para cada una de las combinaciones. La mortalidad media registrada en los

controles negativos (sin inocular) fue de 5,5 %, mientras en los pocillos inoculados con las cepas PP2-459 y PP2-663 fue del 4,6 y 5,9 % respectivamente, lo que confirma la inocuidad de estas bacterias para las larvas. Por su parte, los dos patógenos causaron mortalidades del 100 %, según lo esperado.

La única combinación que se tradujo en una reducción significativa de la mortalidad larvaria fue la de la cepa PP2-663 con el patógeno *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup>, ya que redujo un 86 % la muerte de las larvas. Sin embargo, los resultados de esta misma cepa QQ con *V. neptunius* PP-145.98 no resultaron satisfactorios, ya que disminuyeron la mortalidad de las larvas pero no significativamente, lo que sin duda se debe a que las concentraciones de ambas cepas estaban más próximas, con sólo un orden de magnitud de diferencia frente a los más de dos de la combinación efectiva ( $10^4$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^6$  ufc/ml de cepa QQ). Esto puede explicar igualmente los resultados obtenidos con la cepa PP2-459 con ambos patógenos, ya que en este caso la cepa QQ estaba en el mismo orden de magnitud (*V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup>) o incluso por debajo del patógeno (*V. neptunius* PP-145.98).



**Figura 25. Porcentajes de mortalidad larvaria registrados a las 48 horas en los ensayos *in vivo*.**

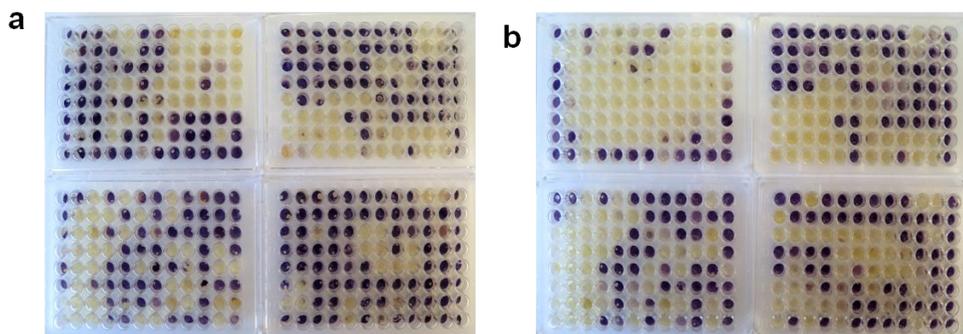
Los resultados obtenidos apuntan a la necesidad de favorecer la proliferación de las cepas QQ en los acuarios o tanques antes de la incorporación de los patógenos, ya que para que compitan eficazmente parece necesaria una diferencia mínima de 2 órdenes de magnitud a favor de las cepas QQ. Actualmente se están diseñando nuevos ensayos que serán abordados en función de la estacionalidad de las larvas.

#### 4.1.2.2. Selección de bacterias con actividad quorum quenching en un criadero de peces y moluscos de Granada

##### a) Ensayo de la actividad degradadora de AHLs

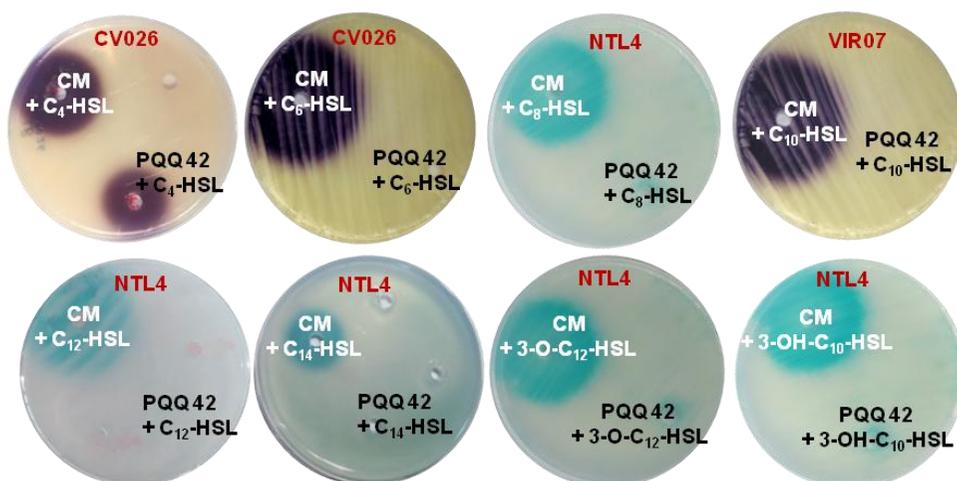
Con el fin de seleccionar nuevas bacterias con actividad quorum quenching y así ampliar nuestra colección, elegimos un nuevo criadero situado al sureste de España. En este caso, la búsqueda de bacterias con capacidad de degradar AHLs se realizó a partir de una colección de 450 aislados bacterianos procedentes del criadero de peces y moluscos Azucarera Guadalfeo de Salobreña (Granada). El agua de mar de sus instalaciones proviene directamente del mar Mediterráneo con una salinidad media anual de 36-39 g/l y temperatura 16-25°C (36°44'43,6"N, 3°36'01,9"W).

Para la selección de bacterias con actividad QQ se llevó a cabo un ensayo inicial en placas microtiter de 96 pocillos en presencia de moléculas AHLs de origen sintético con cadena acil de distinto número de carbonos: C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL. Tras 24 h de incubación, las AHLs remanentes en el medio se detectaron usando los biosensores *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 (Fig. 26). Como control positivo se empleó *Tenacibaculum discolor* 20-J y como control negativo, medio CM adicionado de AHLs. De las 450 cepas ensayadas, 112 no activaron a los dos biosensores, indicando que habían degradado ambas C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado, obteniendo siempre los mismos resultados. Todos los experimentos se llevaron a cabo a pH 7 para prevenir la lactonólisis espontánea de las AHLs (que ocurre a pH básico) y por tanto la no activación de los biosensores, dando lugar a resultados positivos falsos.



**Figura 26. Ensayo en placas microtiter de la actividad degradadora de AHLs de las cepas marinas aisladas de un criadero de Granada. Detección de AHLs con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 (a) y *Chromobacterium violaceum* VIR07 (b).**

A las 112 cepas seleccionadas se les realizó un segundo ensayo frente a las moléculas C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, C<sub>14</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL. Tras 24 h de incubación, las AHLs remanentes en el medio se detectaron en un ensayo de difusión en placa Petri usando los biosensores *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) (Fig. 27).



**Figura 27. Ensayo de difusión en placa Petri de la actividad degradadora de AHLs de cepas marinas aisladas de un criadero de Granada. Detección con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *Chromobacterium violaceum* VIR07 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).**

El resultado del screening fue la selección de 12 cepas con capacidad de degradar un amplio rango de moléculas AHLs. Como se muestra en la Tabla 9, las 12 cepas degradan las AHLs de cadena media y larga con distintas sustituciones oxo- e hidroxil-. Sin embargo, ninguna de ellas degrada C<sub>4</sub>-HSL.

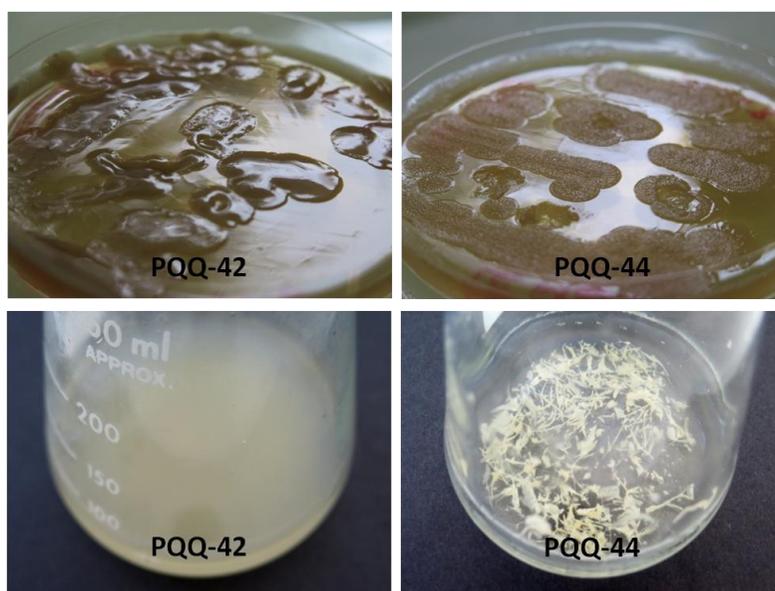
De forma paralela, llevamos a cabo un ensayo de difusión en placa Petri para determinar la producción de moléculas AHLs por parte de las 12 cepas seleccionadas. Ninguna de ellas sintetizó moléculas detectables por los biosensores empleados.

Para identificar taxonómicamente las 12 cepas degradadoras de AHLs seleccionadas, se amplificó y clonó su gen ribosomal 16S rRNA en el plásmido pGEM-T. Según la comparación de las secuencias con las bases de datos de GenBank y EMBL usando las herramientas BLAST y EzTaxon-e, todas las cepas seleccionadas pertenecían a los géneros *Alteromonas* (5 cepas) y *Pseudoalteromonas* (7 cepas), de las familias

*Alteromonadaceae* y *Pseudalteromonadaceae* (Tabla 9). Las secuencias de estas cepas se encuentran depositadas en la base de datos EMBL bajo los números de acceso KT730052-KT730063.

En cuanto a su origen, todas las cepas seleccionadas proceden del agua de mar saliente de las instalaciones de tanques del criadero mencionado.

Las tres cepas con mayor actividad QQ (PQQ-37, PQQ-42 y PQQ-44) frente a las AHLs ensayadas tuvieron una alta homología con *Alteromonas stellipolaris* (Tabla 9), sin embargo, mostraron diferencias morfológicas. La cepa PQQ-42 produce colonias mucosas en medio sólido y un cremiento homogéneo en medio líquido. Por el contrario, las cepas PQQ-37 y PQQ-44 forman colonias secas y rugosas en medio sólido y en medio líquido tienen un crecimiento en forma de “miga de pan”, formando grumos que precipitan (Fig. 28). Por ello, para los siguientes ensayos, seleccionamos las cepas PQQ-42 y PQQ-44.



**Figura 28.** Distinta morfología de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 de *Alteromonas stellipolaris* en medio sólido y líquido.

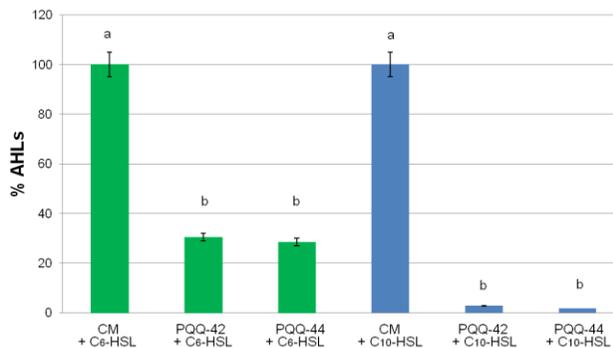
**Tabla 9. Actividad QQ frente AHLs sintéticas de las cepas seleccionadas en el criadero de Granada e identificación taxonómica.**

Cepa	C <sub>4</sub> -HSL	C <sub>6</sub> -HSL	C <sub>8</sub> -HSL	C <sub>10</sub> -HSL	C <sub>12</sub> -HSL	C <sub>14</sub> -HSL	3-O-C <sub>12</sub> -HSL	3-OH-C <sub>10</sub> -HSL	Identificación taxonómica y % de identidad
PQQ-1	-	++	+	++	++	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> 99,78 %
PQQ-5	-	++	+	++	+	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i> 99,70 %
PQQ-8	-	++	+	++	++	++	++	-	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,59 %
PQQ-18	-	++	+	++	++	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> 99,70 %
PQQ-20	-	++	++	++	++	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas atlántica</i> 99,44 %
PQQ-31	-	++	+	++	+	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i> 100 %
PQQ-33	-	++	++	++	++	++	++	-	<i>Alteromonas genovensis</i> 99,60 %
PQQ-37	-	++	++	++	++	++	++	++	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,70 %
PQQ-39	-	++	+	++	++	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i> 99,48 %
PQQ-42	-	++	++	++	++	++	++	++	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,70 %
PQQ-44	-	++	++	++	++	++	++	++	<i>Alteromonas stellipolaris</i> 99,70 %
PQQ-84	-	++	+	++	++	++	++	-	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> 99,70 %

++: degradación total, +: degradación parcial, -: no degradación

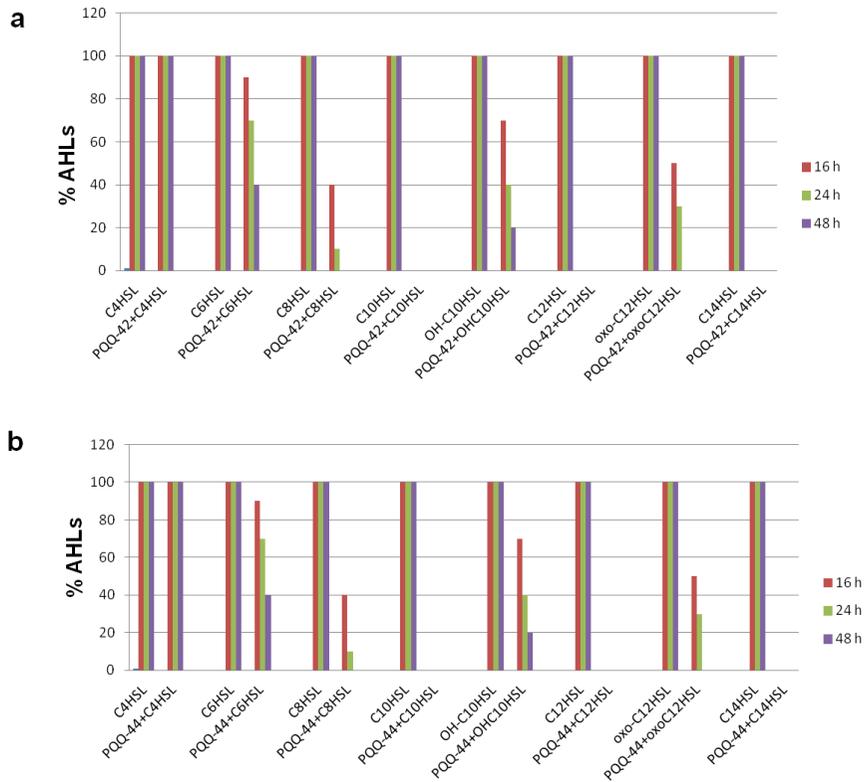
## b) Confirmación de la actividad degradadora de AHLs mediante HPLC/MS

Para determinar si las cepas PQQ-42 y PQQ-44 producían un compuesto inhibitor o antagonista de las moléculas AHLs o si por el contrario las estaban degradando enzimáticamente, se realizó un ensayo similar a los descritos previamente utilizando las moléculas C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL y tras 24 h de incubación las AHLs remanentes se cuantificaron mediante HPLC/MS (Romero *et al.*, 2011). Los resultados indicaron que las dos cepas seleccionadas eran capaces de reducir significativamente los niveles de ambas AHLs ensayadas, confirmándose por tanto su actividad enzimática degradadora. Esta capacidad fue mayor frente a C<sub>10</sub>-HSL que frente a C<sub>6</sub>-HSL (Fig. 29).



**Figura 29. Confirmación mediante HPLC de la actividad degradadora de AHLs de las cepas seleccionadas en un criadero de Granada.**

Tras los análisis de HPLC/MS, donde observamos que las cepas PQQ-42 y PQQ-44 tenían una actividad QQ de más del 70 % en todas las réplicas realizadas, realizamos un ensayo para evaluar la actividad de ambas cepas a distintos tiempos de incubación con las AHLs. Para ello, se realizó un ensayo de difusión en placa Petri con los distintos biosensores y se cuantificaron las AHLs remanentes tras 15, 24 y 48 h por comparación con el diámetro del halo del pocillo control (consistente en medio adicionado de moléculas señal). Como puede observarse, en ambas cepas las AHLs de cadena larga y sin sustituciones (C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, C<sub>14</sub>-HSL) se degradan mejor y más rápidamente (en menos de 15 h) (Fig. 30).



**Figura 30. Actividad degradadora de AHLs en las cepas PQQ-42 (a) y PQQ-44 (b) a las 15, 24 y 48 h de incubación mediante un ensayo de difusión en placa Petri.**

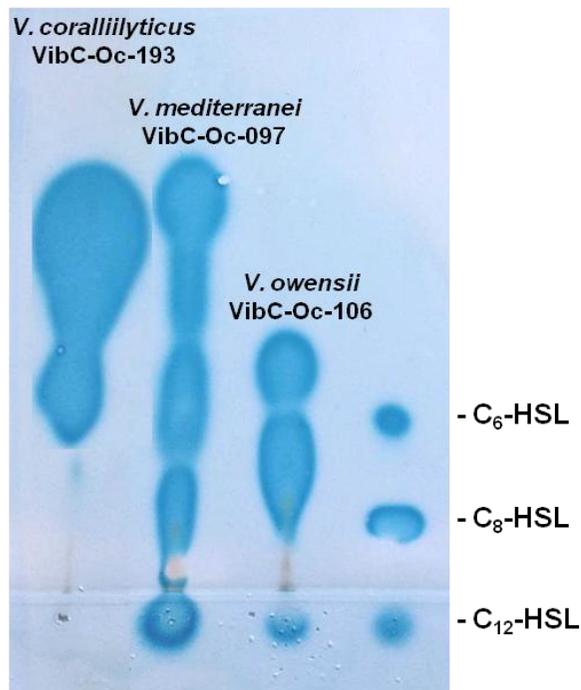
### c) Estudio de la actividad QQ frente a extractos de AHLs de origen natural

Con el fin de determinar si las cepas PQQ-42 y PQQ-44 podrían ser utilizadas en el futuro para interrumpir los sistemas QS de bacterias patógenas *in vivo*, ensayamos *in vitro* su capacidad de degradar AHLs de origen natural. Para ello, seleccionamos tres cepas patógenas de peces y moluscos cuyas AHLs han sido descritas: *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. nigripulchritudo* CIP 103195<sup>T</sup> y *V. metschnikovii* NCTC 8483<sup>T</sup>, así como tres cepas patógenas pertenecientes a distintas especies del género *Vibrio* aisladas del coral *Oculina patagonica* y de agua de mar: *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. mediterranei* VibC-Oc-097 cuyas AHLs han sido descritas por primera vez en esta tesis.

Las especies *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. mediterranei* VibC-Oc-097 fueron seleccionadas para estos

experimentos por su gran virulencia en corales y su mayor producción de moléculas AHLs respecto a otras cepas estudiadas. A partir de una colección de 34 cepas de la familia *Vibrionaceae* aisladas de los corales *Oculina patagonica* y *Cladocora caespitosa* sanos y enfermos, así como de agua de mar, se analizó la producción de moléculas señal AHLs. Para ello, se partió de cultivos en caldo marino de cada una de las cepas. Se les realizó una extracción de AHLs y seguidamente un ensayo de difusión en placa Petri utilizando para el revelado los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

A continuación, los extractos de los cultivos de las cepas seleccionadas (*V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, *V. mediterranei* VibC-Oc-097 y *V. owensii* VibC-Oc-106) se analizaron cualitativamente por cromatografía en capa fina (TLC) usando el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Los perfiles de moléculas AHLs de las cepas ensayadas fueron diferentes entre sí, detectándose al menos dos compuestos en cada cepa (Fig. 31). En muchos casos, las moléculas migraron en forma de "lágrima", indicando que probablemente fuesen AHLs con sustituciones de tipo oxo. *V. mediterranei* VibC-Oc-097 fue la cepa que mostró una mayor diversidad de AHLs producidas, ya que en este ensayo por TLC se detectaron cuatro compuestos en total.



**Figura 31. Análisis por TLC de las moléculas señal producidas por las cepas patógenas de *Vibrio* spp. Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).**

Con el fin de caracterizar químicamente las moléculas señal producidas por *V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 se identificaron y cuantificaron las AHLs en los extractos obtenidos a partir de grandes volúmenes de cultivo en fase estacionaria de cada cepa. Para ello, los extractos se purificaron mediante SPE para después ser analizados mediante HPLC/HRMS (SIM) utilizando distintas AHLs como estándares (Tabla 10).

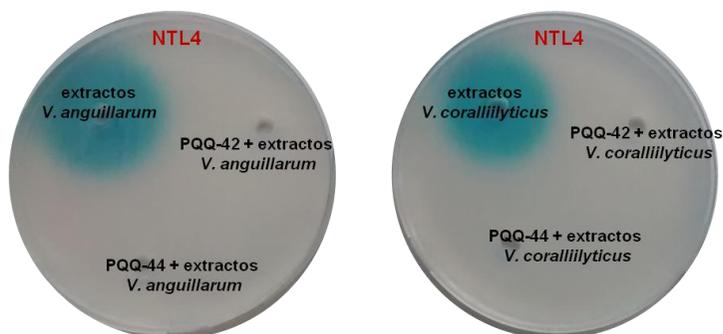
**Tabla 10. Cuantificación mediante HPLC/HRMS de las AHLs de las tres cepas de *Vibrio* spp. seleccionadas.**

AHL	Concentración (nmol/l)		
	<i>V. mediterranei</i> VibC-Oc-097	<i>V. owensii</i> VibC-Oc-106	<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193
C <sub>4</sub> -HSL	4,00	-	3,30
C <sub>6</sub> -HSL	1,33	0,08	-
C <sub>8</sub> -HSL	0,15	0,11	-
C <sub>12</sub> -HSL	0,67	4,12	-
C <sub>16</sub> -HSL	0,64	0,14	0,34
3-O-C <sub>10</sub> -HSL	-	0,03	-
3-O-C <sub>12</sub> -HSL	0,02	-	-
3-O-C <sub>13</sub> -HSL	1,76	-	-
3-OH-C <sub>10</sub> -HSL	0,36	0,25	0,69
3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	8,08	2,77	0,12

Una vez caracterizadas las moléculas AHLs *V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc\_193, ensayamos *in vitro* la actividad quorum quenching de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 frente a los extractos de estos patógenos y los patógenos de peces y moluscos *V. anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. nigripulchritudo* CIP 103195<sup>T</sup> y *V. metschnikovii* NCTC 8483<sup>T</sup>.

En primer lugar, se obtuvieron los extractos AHLs de las seis especies patógenas de *Vibrio* y a continuación se añadieron a cultivos de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 (DO<sub>600</sub> 0,5) y se incubaron 24 h. La detección de AHLs remanentes se llevó a cabo mediante un ensayo de difusión en placa con los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4). Se confirmó que las cepas PQQ-42 y PQQ-

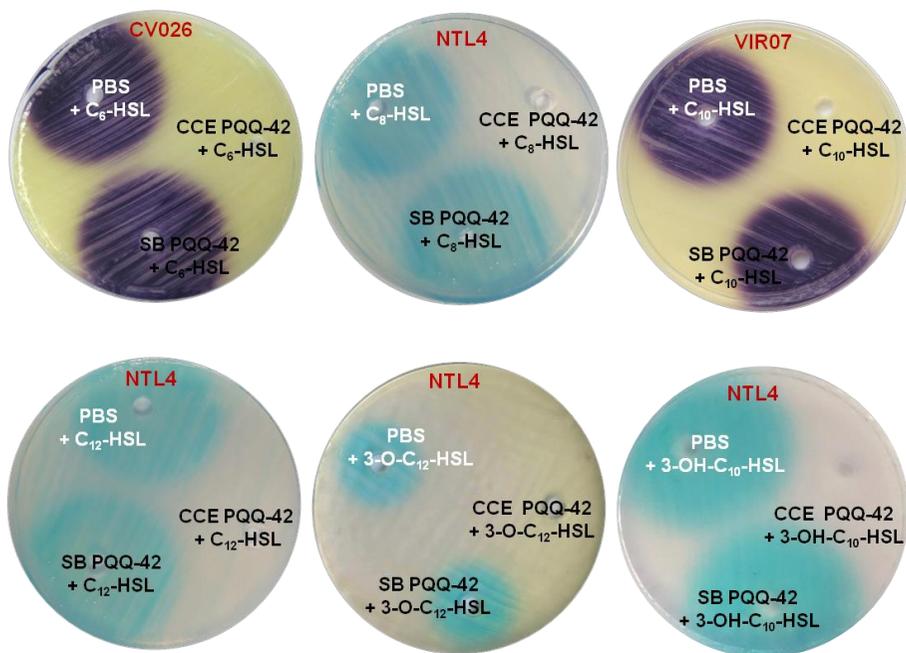
44 tenían actividad QQ frente a todos los extractos de AHLs de las cepas patógenas ensayadas (Fig. 32).



**Figura 32. Degradación *in vitro* de extractos de moléculas AHLs de cepas patógenas de *Vibrio* spp. por parte de las cepas PQQ-42 y PQQ-44. Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4)**

#### **d) Localización de la actividad quorum quenching de las cepas PQQ-42 y PQQ-44**

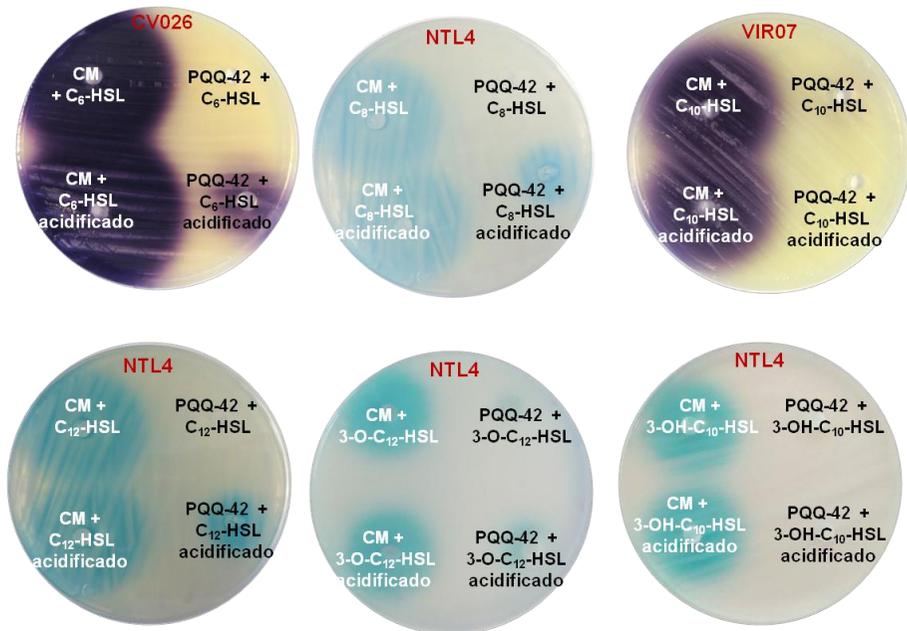
Para determinar la localización celular de la enzima QQ, se obtuvo el sobrenadante (SB) y el extracto celular crudo (CCE) de cultivos de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 y en cada caso se ajustó la concentración de proteína a 35 µg/ml. Seguidamente, se utilizó el sobrenadante y el extracto celular crudo para realizar ensayos de degradación de las moléculas C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL. Tras 24 h de incubación se detectaron las AHLs remanentes en un ensayo de difusión en placa Petri, en el que se encontró que la actividad QQ de ambas cepas se encuentra en el extracto celular crudo y no en el sobrenadante. En la Figura 33 se muestran los resultados de la actividad QQ de la cepa PQQ-42.



**Figura 33. Ensayo de la actividad quorum quenching del sobrenadante y extracto celular crudo de la cepa PQQ-42.** Detección de AHLs con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *Chromobacterium violaceum* VIR07 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

#### **e) Identificación del tipo de actividad quorum quenching de las cepas PQQ-42 y PQQ-44**

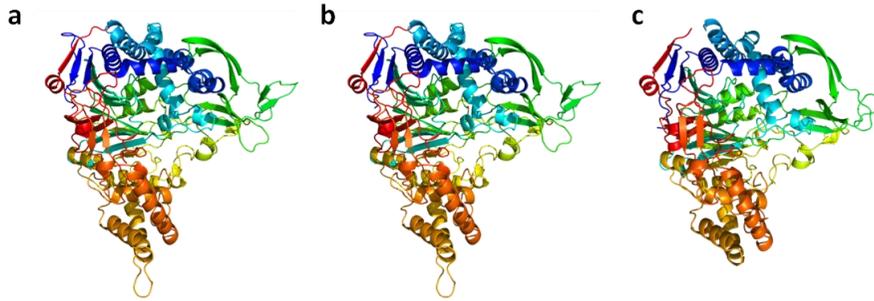
Para determinar si la actividad QQ de PQQ-42 y PQQ-44 era debida a una enzima de tipo lactonasa, se llevó a cabo una acidificación de los cultivos de ambas cepas tras la incubación durante 24 h con cada una de las distintas AHLs (C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL). Esta acidificación permite la reestructuración y cierre del anillo lactónico en el caso de que éste se haya abierto previamente por una enzima lactonasa (Yates *et al.*, 2002). Tras una nueva incubación durante 24 h, en ninguno de los casos la recuperación de la concentración inicial de AHLs fue significativa respecto al control, consistente en caldo marino adicionado con AHLs. Esto indica que la actividad degradadora de AHLs de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 se debe a una enzima diferente a una lactonasa. En la Figura 34 se muestran los resultados de la actividad QQ de la cepa PQQ-42.



**Figura 34. Determinación de AHLs remanentes en las reacciones de quorum quenching de la cepa PQQ-42 con y sin acidificación.** Detección de AHLs con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *Chromobacterium violaceum* VIR07 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

Una vez descartada una enzima de tipo lactonasa, se llevó a cabo una aproximación molecular para poder identificar el tipo de enzima responsable de la actividad QQ de las cepas PQQ-42 y PQQ-44. Para ello, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo de ambas cepas mediante *Single Molecule Real-Time* (SMRT) en una plataforma PacBio RSII (Pacific Biosciences). Ambos genomas son circulares, de 4,7 Mpb, y están depositados en GenBank bajo los números de BioProject PRJNA319005 y PRJNA319007. Tras la anotación de las secuencias ensambladas con la herramienta Prokka (Seemann, 2014), se identificó en ambas cepas el gen *pvdQ*, que codifica una enzima QQ de tipo acilasa.

La estructura tridimensional de esta enzima se predijo mediante el software *Protein Homology/analogy Recognition Engine 2.0* (Phyre2) y se comparó con la estructura de la enzima PvdQ de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 35).

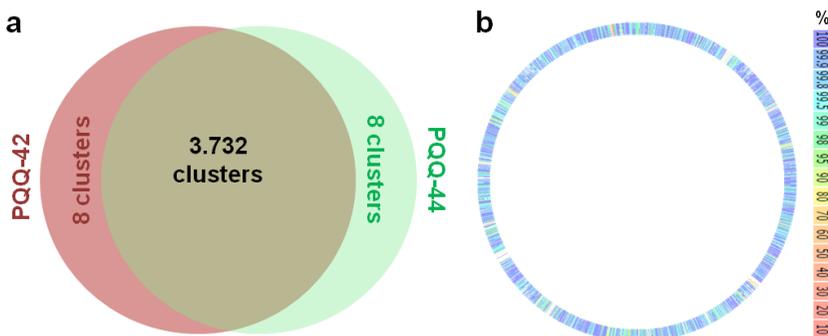


**Figura 35. Estructura tridimensional de la enzima PvdQ.** Representación de la enzima de las cepas PQQ-42 (a) y PQQ-44 (b) y *Pseudomonas aeruginosa* (c).

Actualmente se están llevando a cabo ensayos de ligación del gen *pvdQ* en los plásmidos de alto y bajo número de copias pUC18 y pME6010 para confirmar que es el responsable de la actividad degradadora de AHLs.

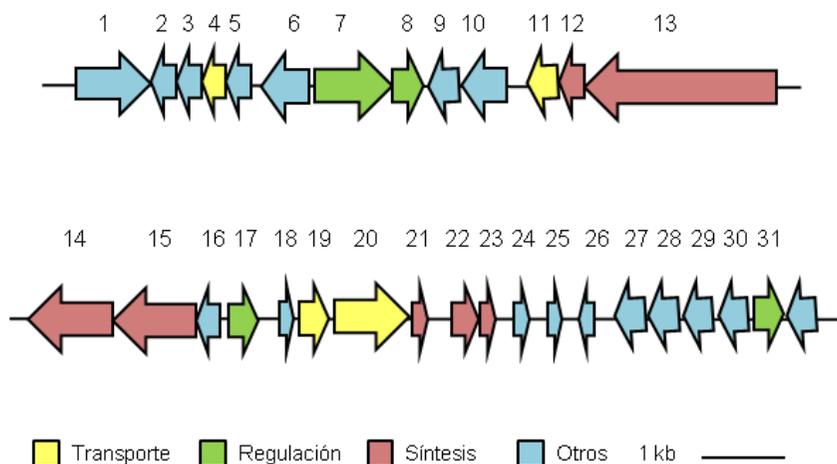
Debido a que en las cepas PQQ-42 y PQQ-44 se identificó el mismo tipo de enzima QQ, se seleccionó la cepa PQQ-42 para los siguientes estudios, ya que como se ha mostrado anteriormente (Fig. 28), ésta tenía un crecimiento más homogéneo y no producía grumos ni precipitados.

De forma paralela, tras la anotación y el análisis de los genomas se obtuvo información de otras características interesantes en las dos cepas. Como previamente se había identificado según la clonación y secuenciación de su gen ribosomal 16S, ambas tienen homología del 100 % con *Alteromonas stellipolaris* LMG 21856<sup>T</sup>. Sin embargo, la comparación de los genomas con las herramientas de software RAST y OrthoVenn mostró que aunque las dos cepas comparten 3.732 clústeres de genes, hay 8 clústeres diferentes en cada una de ellas (Fig. 36) en los que la mayoría de genes codifican proteínas hipotéticas, transposasas y ATPasas.



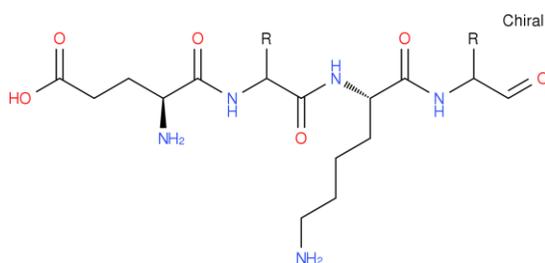
**Figura 36. Comparación de los genomas de las cepas PQQ-42 y PQQ-44.** Empleo de las herramientas OrthoVenn (a) y RAST (b).

Sorprendentemente, uno de los 8 clústeres diferentes de la cepa PQQ-42 codifica la síntesis de un péptido no ribosomal (PNR). Esto fue confirmado mediante la ayuda del software antiSMASH (Weber *et al.*, 2015). Este clúster está constituido por distintos genes de regulación génica, biosíntesis y transporte de un PNR (Fig. 37, Tabla 11).



**Figura 37. ORFs del clúster de síntesis de un péptido no ribosomal encontrado en el genoma de la cepa PQQ-42.**

Este clúster tiene una disposición muy peculiar y tiene muy baja homología con clústeres de síntesis de péptidos no ribosomales encontrados en otras bacterias, siendo sus valores de homología más altos 30 % con el clúster PNR de *Teredinibacter turnerae* y 14 % con *Pseudoalteromonas elyakovii*. Utilizando de nuevo el programa antiSMASH se ha realizado una predicción de la posible estructura química del compuesto PNR sintetizado por este clúster (Fig. 38).



**Figura 38. Predicción de la estructura del péptido no ribosomal producido por el clúster encontrado en el genoma de la cepa PQQ-42.**

**Tabla 11. Identificación de la función hipotética de los ORFs del clúster de síntesis de PNR de la cepa PQQ-42.**

ORF	Función hipotética	Función
1	Galactosidasa	Desconocida
2	Tetratricopéptido	Desconocida
3	Acetilhidrolasa	Desconocida
4	Proteína transmembrana de transporte	Transporte PNR
5	Dihidropicolinato sintasa	Desconocida
6	Proteína hipotética	Desconocida
7	Región de unión a ATP/proteína ATPasa/ histidina quinasa	Regulación génica
8	Proteína receptora de regulación génica	Regulación génica
9	Proteína hipotética	Desconocida
10	Proteína hipotética	Desconocida
11	Sistema de transporte de péptidos cíclicos	Transporte PNR
12	Proteína SyrP	Biosíntesis PNR
13	Péptido no ribosomal sintasa	Biosíntesis PNR
14	Péptido no ribosomal sintasa	Biosíntesis PNR
15	CoA ligasa de ácidos graso de cadena larga/ péptido no ribosomal sintasa	Biosíntesis PNR
16	Proteína hipotética	Desconocida
17	Regulador transcripcional CadC	Regulación génica
18	Proteína hipotética	Biosíntesis PNR
19	Proteína de membrana de bomba de flujo multifármaco	Transporte PNR
20	Proteína de resistencia a acriflavina	Transporte PNR
21	Tioesterasa	Biosíntesis PNR
22	Vulnibactina sintasa/fosfopanteteinil transferasa	Biosíntesis PNR
23	Proteína hipotética	Desconocida
24	Proteína hipotética	Desconocida
25	Transposasa ISXo8	Desconocida
26	Proteína de unión a ADN de cadena simple	Desconocida
27	Transporte de galactosa dependiente de sodio	Desconocida
28	Galactoquinasa	Desconocida
29	Galactosa-1-fosfato uridililtransferasa	Desconocida
30	Galactosa mutarotasa	Desconocida
31	Operon represor de la galactosa/familia GalR-LacI	Regulación génica
32	Proteína hipotética	Desconocida

Para identificar el PNR sintetizado por este cluster de PQQ-42 se está llevando a cabo la mutación de los genes de dicho cluster que codifican las sintasas del PNR (ORF13 y ORF14) (Fig. 37, Tabla 11). De forma paralela, se van a llevar a cabo ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de los genes de dicho cluster.

## f) Cocultivos *in vitro* entre la cepa PQQ-42 y *Vibrio* spp. patógenos

Antes de llevar a cabo ensayos de cocultivo con la cepa PQQ-42, evaluamos si ésta interfería en el crecimiento de 6 cepas de las especies patógenas *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. nigripulchritudo* CIP 103195<sup>T</sup>, *V. metschnikovii* NCTC 8483<sup>T</sup>, *V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 mediante un ensayo de antagonismo. Como controles negativos se usaron los medios CM y SFSWYE. Nuestros resultados indicaron que PQQ-42 no produce ningún efecto negativo sobre el crecimiento de las cepas de *Vibrio* ensayadas (Fig. 39).



Figura 39. Ensayo de antagonismo de la cepa PQQ-42 sobre las cepas patógenas de *Vibrio* spp.

A continuación, se realizaron cocultivos *in vitro* con el fin de poner a punto las condiciones óptimas para llevar a cabo futuros ensayos *in vivo*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de cocultivos de la cepa PQQ-42 y cada una de las especies patógenas de *Vibrio* en medio SFSWYE en seis ratios o concentraciones distintas:  $10^2$  ufc/ml de *Vibrio* sp. con  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml de la cepa PQQ-42 y  $10^2$  ufc/ml de la cepa PQQ-42 con  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml de *Vibrio* sp. Tras 24 h de incubación, se detectaron las AHLs remanentes en los cocultivos mediante un ensayo de difusión en placa con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4). El mejor resultado de degradación de AHLs se obtuvo cuando  $10^2$  ufc/ml de un cultivo de *Vibrio* sp. se añadió a un cultivo de  $10^5$  ufc/ml de la cepa PQQ-42, ya que hubo una degradación total de las AHLs de *Vibrio* sp. en estas condiciones. Esta ratio se mantuvo a lo largo de la incubación de 24 h, como pudo confirmarse mediante el recuento en medio TCBS (donde *Vibrio* sp. produce colonias amarillas) y en medio AM (donde *Vibrio* sp. produce colonias lisas y PQQ-42 produce colonias convexas y mucosas) (Fig. 40).

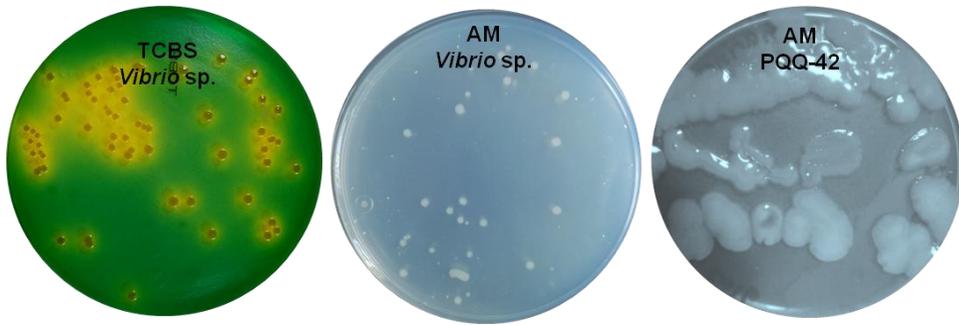


Figura 40. Morfología de colonias de *Vibrio* sp. en medio TCBS y AM y de la cepa PQQ-42 en medio AM.

Los cocultivos en este ratio también se utilizaron para evaluar el efecto de la degradación de AHLs sobre algunos factores de virulencia producidos por las cepas patógenas de los vibrios. La realización de más de una decena de pruebas fenotípicas (véase apartado 3.4) mostró que algunos fenotipos de las especies de *Vibrio* ensayadas se vieron afectados bajo nuestras condiciones de ensayo. Por tanto, en el caso de los *Vibrio* spp. patógenos de corales cuyas AHLs han sido descritas por primera vez en esta tesis, podría establecerse una correlación entre las moléculas AHLs y la producción de distintos factores de virulencia. La Tabla 12 recoge los resultados de los fenotipos analizados en los distintos cocultivos y su comparación con el cultivo puro de cada uno de las especies de *Vibrio*. Entre ellos, como es el caso de la actividad proteasa y la motilidad tipo swimming en *V. mediterranei* VibC-Oc-097, que se vieron disminuidos en nuestras condiciones de ensayo (Fig. 41). Los ensayos fenotípicos se repitieron tres veces obteniéndose los mismos resultados.

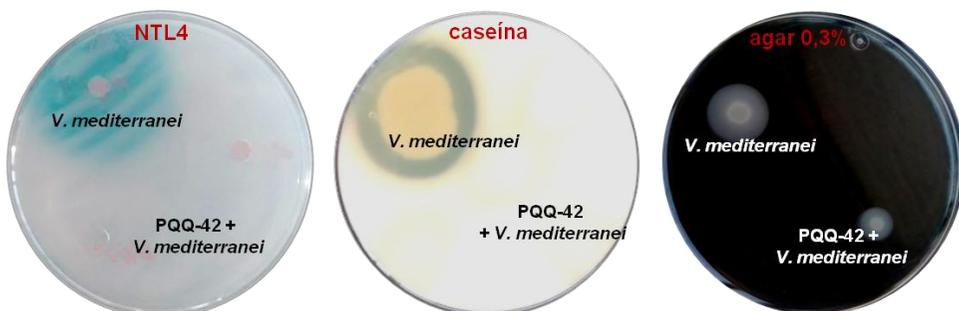


Figura 41. Disminución de algunos fenotipos en *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097 tras el cocultivo con la cepa PQQ-42. Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

Tabla 12. Fenotipos de *Vibrio* spp. en cultivo puro y tras el cocultivo con la cepa PQQ-42.

Fenotipo	<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264 <sup>T</sup>		<i>V. metschnikovi</i> NCTC 8483 <sup>T</sup>		<i>V. nigripulchritudo</i> CIP 103195 <sup>T</sup>		<i>V. mediterranei</i> VibC-Oc-097		<i>V. owensii</i> VibC-Oc-106		<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	
	cultivo puro	QQ	cultivo puro	QQ	cultivo puro	QQ	cultivo puro	QQ	cultivo puro	QQ	cultivo puro	QQ
<b>AHLs</b>	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
<b>Motilidad</b>	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
<b>Hemólisis</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Proteasa</b>	++	++	++	+	-	-	++	+	++	+	++	+
<b>Amilasa</b>	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>DNAsa</b>	++	++	+	++	+	++	+	++	++	+	-	-
<b>Quitinasa</b>	++	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<b>Gelatinasa</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Lipasa (Tween 20)</b>	++	++	+	++	+	++	+	++	++	++	++	++
<b>Lipasa (Tween 80)</b>	+	++	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++
<b>Sideróforos</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Biofilm</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++: mucha actividad, +: poca actividad, -: no actividad

### g) Ensayos *in vivo* con el coral *Oculina patagonica*

Los ensayos *in vivo* con *A. stellipolaris* PQQ-42 se realizaron en colonias del coral escleroactinio *Oculina patagonica*, en el que la bacteria patógena *V. mediterranei* es responsable de la enfermedad del blanqueamiento (Kushmaro *et al.*, 2001). Se prepararon acuarios con SFSW y fragmentos de *O. patagonica*, a los que se sometió a distintos tratamientos siguiendo la ratio adecuada seleccionada previamente: tres acuarios con  $10^5$  ufc/ml de la cepa PQQ-42, tres acuarios con  $10^2$  ufc/ml de *V. mediterranei* VibC-Oc-097, otros tres con  $10^5$  ufc/ml de PQQ-42 junto con  $10^2$  ufc/ml de *V. mediterranei* VibC-Oc-097 y tres acuarios más sin inocular (control). Tras diez días, los corales tratados con PQQ-42 y *V. mediterranei* VibC-Oc-097 mostraron un menor daño del tejido o blanqueamiento que aquellos corales infectados solo con *V. mediterranei* VibC-Oc-097 (Fig. 42). Este resultado se ve reflejado en los niveles de clorofila *a* detectados en el tejido del coral, ya que este parámetro está relacionado con el estado de la comunidad de zooxantelas del coral y por tanto, con su blanqueamiento (Fig. 43). Estos ensayos se realizaron por triplicado y siempre se obtuvieron los mismos resultados. Esto indica que la adición de la cepa PQQ-42 reduce la patogenicidad de *V. mediterranei* VibC-Oc-097 sobre el coral *O. patagonica*, disminuyendo su nivel de blanqueamiento ( $29,25 \pm 14,63$  %) en comparación con los corales tratados sólo con *V. mediterranei* VibC-Oc-097 ( $77,53 \pm 13,22$  %).

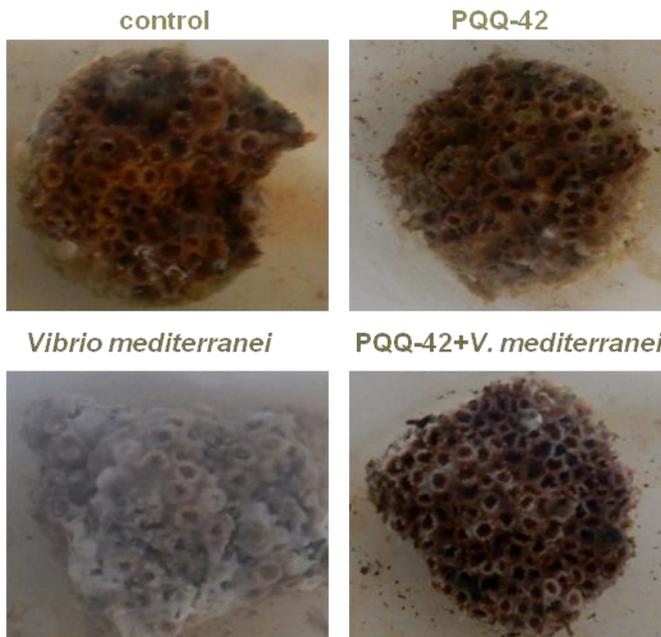
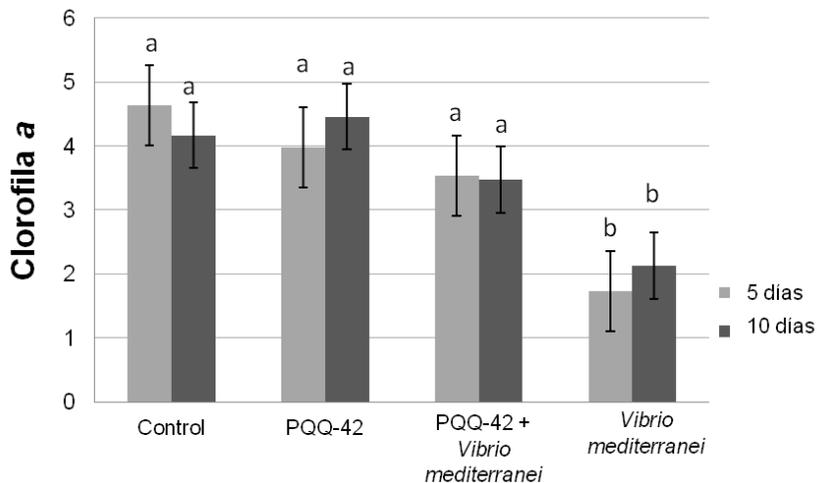


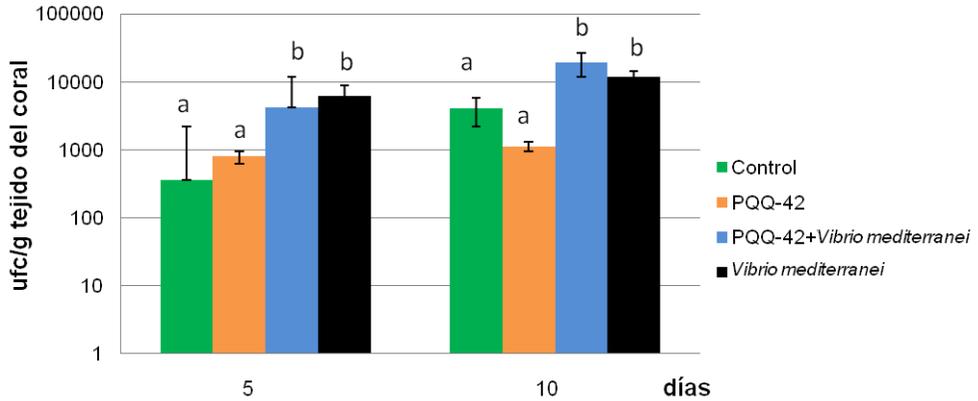
Figura 42. Fragmentos del coral *Oculina patagonica* con distinta extensión de blanqueamiento tras 10 días de tratamiento.

Además, los niveles de clorofila *a* y el estado de blanqueamiento son similares en los corales control y en aquellos tratados sólo con *A. stellipolaris* PQQ-42, lo que indica que esta bacteria no es virulenta ni produce ningún daño o alteración sobre *O. patagonica* (Fig. 43). La varianza entre los valores de los distintos tratamientos se analizó mediante ANOVA ( $P < 0.05$ ), para posteriormente, establecer los grupos de significancia mediante el test de Student-Newman-Keuls, que se representan con letras (Fig. 43).



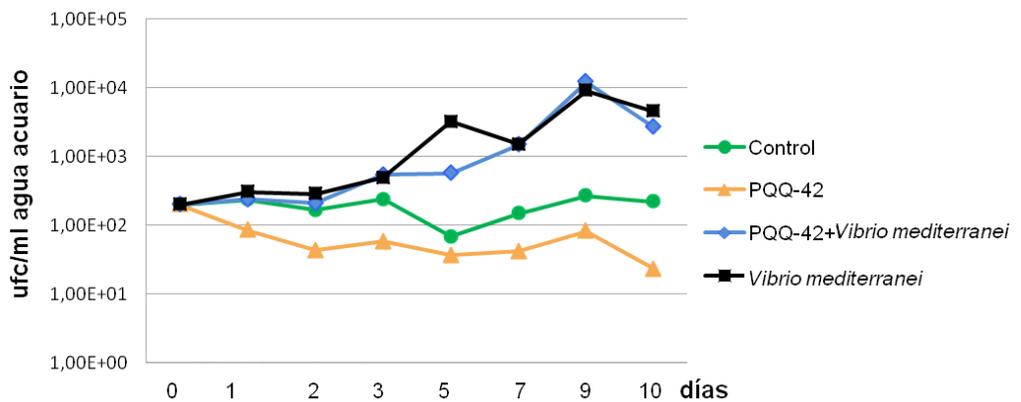
**Figura 43. Niveles de clorofila *a* en el coral *Oculina patagonica* s a los 5 y 10 días de inoculación con los distintos tratamientos.**

Para verificar que la disminución del blanqueamiento y de los niveles de clorofila *a* en los corales era debida a la actividad QQ de la cepa PQQ-42 y que no había sido debida a una disminución del número de vibrios, se realizaron recuentos diarios del agua de los acuarios y del tejido del coral en el medio selectivo TCBS. Puede verse en la siguiente figura que no hay diferencias significativas en los niveles de vibrios en los corales infectados con *V. mediterranei* VibC-Oc-097 respecto a los corales infectados con PQQ-42 junto con *V. mediterranei* VibC-Oc-097 ni a los 5 ni a los 10 días de tratamiento (Fig. 44).



**Figura 44.** Recuentos de *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097 en el tejido del coral *Oculina patagonica* a los 5 y 10 días de inoculación con los distintos tratamientos.

Del mismo modo que en el tejido de los corales, los niveles de concentración de vibrios en el agua de los acuarios se mantuvieron significativamente iguales independientemente del tratamiento realizado (Fig. 45). Estos resultados demuestran, por tanto, que la cepa PQQ-42 no produce ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *V. mediterranei* VibC-Oc-097, como ya se había comprobado anteriormente (Fig. 39). Las diferencias de blanqueamiento y clorofila *a* entre los distintos corales no son debidas a una disminución en el crecimiento de la bacteria patógena, sino a una interferencia mediante QQ de la regulación de la producción de sus factores de virulencia.



**Figura 45.** Recuentos de *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097 en el agua de los acuarios con *Oculina patagonica* con los distintos tratamientos.

### 4.1.3. Discusión

Uno de los principales problemas que afectan a la acuicultura son las enfermedades infecciosas bacterianas, que causan pérdidas económicas de billones de euros en el sector y pueden llegar a arruinar hasta el 50 % del producto de los criaderos (Paillard *et al.*, 2004; Lafferty *et al.*, 2015). Para su prevención y tratamiento se han utilizado durante mucho tiempo los antibióticos, lo que ha provocado una pérdida de eficacia de los mismos así como la aparición de numerosas resistencias, por lo que cada vez está más restringido su uso (Akinbowale *et al.*, 2006; Smith, 2008). Las enfermedades en los criaderos afectan principalmente a las larvas de moluscos, debido a su vulnerabilidad por su pequeño tamaño. Pero las enfermedades infecciosas perjudican también a los arrecifes de coral, siendo la más importante la enfermedad conocida como *bleaching*, en la que las infecciones por *Vibrio* spp., junto con el aumento de la temperatura del mar producen el blanqueamiento y la pérdida de tejido en los corales (Hoegh-Guldberg, 1999).

Por estas razones, en los últimos años se ha mostrado un enorme interés en estudiar los mecanismos por los que se pueden prevenir y/o tratar las infecciones de los animales marinos al menor coste económico y sin riesgo sanitario. No sólo se reducirían las pérdidas económicas del sector de la acuicultura sino que se obtendrían productos marinos de mayor calidad y seguridad. Además, en el caso de los arrecifes de coral, se reducirían las zonas afectadas por el blanqueamiento, disminuyendo así los problemas asociados que conlleva la muerte de los corales, como la pérdida de biodiversidad de sus ecosistemas o un aumento de la erosión en la costa.

Por esta razón se están investigando nuevas estrategias para combatir las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura y a los organismos relacionados con ella. Algunas de estas estrategias se basan en la eliminación de los patógenos responsables (Nakai y Park, 2002; Vinoj *et al.*, 2014), mientras que otras se centran en la inhibición de su crecimiento más que en su muerte (Defoirdt *et al.*, 2006, 2007). Una nueva estrategia para resolver el problema de las enfermedades infecciosas es la interrupción de la comunicación intercelular bacteriana, llamada quorum sensing, que regula la expresión de factores de virulencia en muchos patógenos acuáticos (Dong *et al.*, 2000, 2007; Bjarnsholt *et al.*, 2010; Natrah *et al.*, 2011)

En el caso de las bacterias patógenas que regulan su virulencia mediante los sistemas QS, como es el caso de numerosas especies de *Vibrio*, la interferencia de sus moléculas señal mediante quorum quenching representa una buena y novedosa alternativa para controlar su patogenicidad (Defoirdt *et al.*, 2004). A diferencia de los tratamientos

antibióticos, que reducen el número de bacterias patógenas, el mecanismo quorum quenching no debería producir resistencias ya que no impone una alta presión selectiva sobre la bacteria patógena (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Rasko y Sperandio, 2010). Aunque se han descrito mecanismos de resistencia contra compuestos QSI (García-Contreras *et al.*, 2013, 2016; Kalia *et al.*, 2014) y la aparición de mutantes espontáneos que dejan de regular su virulencia mediante moléculas señal, haciéndose insensibles a la inhibición de QS (Sandoz *et al.*, 2007), muchos autores defienden que esto no quiere decir que éstas puedan extenderse, y además, esas resistencias serán mucho menores que las producidas por compuestos antimicrobianos convencionales (Defoirdt *et al.*, 2010; Rémy *et al.*, 2016).

Actualmente, distintos estudios han demostrado la potencial aplicación de la interrupción de la comunicación intercelular bacteriana para el tratamiento de las enfermedades bacterianas en la acuicultura (Tinh *et al.*, 2008; Nhan *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2014; VINOJ *et al.*, 2014) y se han descrito numerosas patentes referidas a sus aplicaciones (Romero *et al.*, 2012).

Siguiendo esta nueva alternativa de quorum quenching, hemos estudiado dos colecciones de aislados bacterianos procedentes de criaderos de Lugo y Granada. El cribado se ha realizado sobre bacterias marinas para facilitar posteriormente su posible aplicación en la acuicultura.

En el caso del primer criadero, situado en Lugo, hemos seleccionado cuatro cepas basándonos en su actividad QQ frente a cinco AHLs sintéticas, como se demostró en los ensayos en pocillos de difusión en placa, el cual es un método eficaz para el aislamiento de bacterias degradadoras de moléculas señal AHLs (Romero *et al.*, 2011). El porcentaje de cepas encontradas en este trabajo con actividad QQ sobre C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL fue 6,84 %, mientras que el porcentaje de aislados con elevada actividad QQ sobre un amplio rango de AHLs fue 2,71 %. Estos datos son similares a los encontrados en otros estudios en ambientes acuáticos, en los que se ha encontrado que la frecuencia de bacterias degradadoras de AHLs es más elevada en medios marinos que terrestres (Dong y Zhang, 2005; Romero *et al.*, 2008, 2010).

Debido a que los sistemas QS se pueden interrumpir mediante degradación enzimática de las moléculas señal (Yates *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2007) o mediante moléculas con estructura similar a ellas (Manefield *et al.*, 2002), realizamos ensayos mediante HPLC/MS para un mejor entendimiento del mecanismo de inhibición de QS responsable en las 4 cepas seleccionadas. Éstas mostraron una elevada capacidad de degradar enzimáticamente las moléculas AHLs ensayadas, siendo su

actividad QQ más efectiva frente a las moléculas de cadena acil larga y mediana que frente a las AHLs de cadena corta. Este resultado concuerda con otros estudios llevados a cabo en los que se ha demostrado que es más común que los aislados marinos presenten mayor capacidad para degradar AHLs de cadena acil larga que corta (Romero *et al.*, 2011). No obstante, las cepas PP2-459 y PP2-663 mostraron una actividad QQ prácticamente del 100 % en todos los ensayos.

En cuanto al tipo de enzima QQ producida por estas cepas, se realizaron distintos ensayos. Es sabido que el anillo lactónico de las AHLs es inestable en condiciones alcalinas y/o en temperaturas superiores a 37°C, lo que llevaría a una lactonólisis de la molécula AHL (Yates *et al.*, 2002). Debido a que en nuestros ensayos no hubo una recuperación significativa de los niveles de AHLs tras la acidificación de las muestras, podemos decir que la actividad enzimática QQ de las cepas seleccionadas no es debido a una lactonasa, sino a una enzima de otro tipo.

Se ha demostrado que las bacterias con actividad QQ son ubicuas tanto en procariotas como en eucariotas y actúan degradando las moléculas AHLs, influyendo en las actividades reguladas por QS. Estas bacterias podrían sintetizar sus enzimas QQ como una estrategia de defensa frente a sus competidores (Dong y Zhang, 2005).

Debido a que nuestro objetivo era interferir los sistemas QS en patógenos marinos, ensayamos la actividad QQ frente a extractos de la bacteria patógena de acuicultura *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, que produce 3-O-C<sub>10</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL como señales mayoritarias (Milton *et al.*, 1997; 2001) y frente a *Halomonas anticariensis* FP35<sup>T</sup>, una bacteria halófila moderada que produce un amplio rango de moléculas AHLs como C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL y C<sub>12</sub>-HSL (Llamas *et al.*, 2005). En ambos casos, la degradación de AHLs fue completa, indicado que además de las AHLs sintéticas probadas anteriormente, se degradan también las AHLs sintetizadas por otras bacterias, incluyendo bacterias no relacionadas filogenéticamente.

Las cepas con mayor actividad QQ, PP2-459 y PP2-663, fueron utilizadas en ensayos *in vivo* con la almeja babosa *Venerupis corrugata* frente a dos patógenos importantes de este bivalvo: *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup> y *V. neptunius* PP-145.98 (Hada *et al.*, 1984; Prado *et al.*, 2005). La almeja babosa es la especie marisquera, entre los bivalvos del infralitoral, de mayor producción en Galicia. En estos ensayos *in vivo*, la adición de cepa PP2-663 produjo una disminución del 86 % de la mortalidad larvaria producida por *V. tubiashii* CECT 631<sup>T</sup>. Sin embargo, los ensayos con la cepa PP2-459 no resultaron satisfactorios, lo que sin duda se debe a que

las concentraciones de la cepa QQ y de patógeno estaban muy próximas (un orden o menos de magnitud de diferencia frente a los más de dos de la combinación efectiva).

En lo que concierne a las cepas bacterianas seleccionadas del criadero de Lugo, todas ellas pertenecen a géneros típicamente marinos. El género predominante es *Alteromonas*, en donde la actividad QQ ya se había descrito previamente (Romero *et al.*, 2011). En los genomas de algunas especies de *Alteromonas* se han identificado secuencias que podrían codificar para enzimas acilasas. En cuanto a las cepas de mayor actividad quorum quenching, PP2-459 (*Thalassotalea* sp.) y PP2-663 (*Paracoccus* sp.) presentaron un nivel de homología bajo con otros miembros de su género (96,65 % y 97,42 % respectivamente), por lo que podrían tratarse de nuevas especies. Ni en el género *Thalassotalea* ni en *Paracoccus* se habían descrito previamente enzimas QQ. Sin embargo, posteriormente se han encontrado otros aislados marinos del mismo género con acción degradadora de AHLs (Tang *et al.*, 2013).

Siguiendo este enfoque prometedor, y con el objetivo de ampliar nuestra colección de cepas QQ, realizamos otra búsqueda de bacterias con actividad QQ a partir de una colección de 450 aislados de un criadero de peces y moluscos de Granada. Se han seleccionado 12 cepas con capacidad degradadora de un amplio rango de moléculas señal AHLs sintéticas. Al igual que las bacterias seleccionadas en el criadero de Lugo, todas ellas crecen entre 2,5 y 3 % (p/v) de NaCl, así que se clasifican como bacterias marinas (Kushner y Kamekura, 1988). Las 12 bacterias seleccionadas pertenecen a los géneros *Alteromonas* y *Pseudoalteromonas*, comúnmente encontrados en ambientes marinos y en los que se había descrito previamente una actividad QQ (Romero *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2013). El porcentaje de aislados encontrados en este trabajo con actividad QQ sobre C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>10</sub>-HSL fue 24,88 %, mientras que el porcentaje de aislados con una elevada actividad QQ frente a numerosas AHLs fue 2,66 %. Estos datos son similares a los encontrados en el estudio previo realizado en el criadero de Lugo (Torres *et al.*, 2013) y además concuerdan con otros estudios en los que se ha demostrado que las bacterias degradadoras de AHLs son más frecuentes en los ambientes marinos que en los terrestres (Dong y Zhang, 2005; Romero *et al.*, 2011; 2012). Además, las cepas aisladas en este trabajo mostraron actividad QQ elevada para las moléculas AHLs de cadena acil media y larga, pero no fueron efectivas frente a las AHLs de cadena corta (C<sub>4</sub>-HSL), una característica común entre los aislados marinos (Romero *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2013), donde además la mayoría de bacterias patógenas producen AHLs de cadena acil media y larga (Buchholtz *et al.*, 2006; García-Aljaro *et al.*, 2012).

Como procedimiento para la búsqueda de bacterias con actividad QQ, algunos autores han utilizado medios enriquecidos con moléculas AHLs como sola fuente de carbono y nitrógeno (Leadbetter y Greenberg, 2000; Park *et al.*, 2005). En nuestro caso, hemos realizado dos ensayos secuenciales consecutivos para seleccionar las 12 cepas con actividad degradadora de AHLs. El primer ensayo se llevó a cabo en placas microtiter en presencia de AHLs de cadena acil media o larga (C<sub>6</sub>-HSL o C<sub>10</sub>-HSL). Como segundo cribado, hemos realizado un ensayo frente a un rango más amplio frente a moléculas AHLs de cadena acil de distinta longitud y hemos seleccionado 12 cepas con una actividad QQ elevada.

Debido a que nuestros esfuerzos iban dirigidos a la interrupción de los sistemas QS en bacterias patógenas de acuicultura, las cepas PQQ-42 y PQQ-44 fueron elegidas para los siguientes ensayos por mostrar la mejor actividad degradadora entre las 12 cepas seleccionadas. Ambas cepas degradaron eficientemente AHLs de cadena acil media y larga, con y sin sustituciones de tipo oxo e hidroxilo, aunque las AHLs de cadena larga fueron degradadas más rápidamente. Además, las cepas PQQ-42 y PQQ-44 también degradaron los extractos de AHLs de importantes bacterias patógenas relacionadas con la acuicultura, como *Vibrio anguillarum* ATCC 19264<sup>T</sup>, *V. nigripulchritudo* CIP 103195<sup>T</sup>, *V. metschnikovii* NCTC 8483<sup>T</sup>, *V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, considerados grandes amenazas tanto para los criaderos comerciales como para los arrecifes de coral, debido a la frecuencia de las infecciones, su amplia distribución geográfica y el elevado número de especies afectadas (Toranzo y Barja, 1990; Milton *et al.*, 1997; Kushmaro *et al.*, 2001; Rosenberg y Falkovitz, 2004; Goarant *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2007; Lagana *et al.*, 2011; Goulden *et al.*, 2012; Ushijima *et al.*, 2012). En tres de las especies patógenas de *Vibrio* utilizadas (*V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193), no se habían descrito hasta la fecha las AHLs producidas. En esta tesis, y de forma paralela a la búsqueda de bacterias con actividad QQ, se han caracterizado y cuantificado las moléculas sintetizadas por cada cepa. Aunque los análisis por TLC y HPLC/HRMS mostraron una alta diversidad de AHLs producidas por las cepas ensayadas, en ambos casos las moléculas predominantes fueron principalmente las de cadena acil larga, como en la mayoría de miembros de la familia *Vibrionaceae* (Buchholtz *et al.*, 2006; García-Aljaro *et al.*, 2012).

En todos los casos anteriores, la degradación de AHLs de las seis especies de *Vibrio* fue completa, indicando que las cepas PQQ-42 y PQQ-44 son capaces de inactivar las moléculas AHLs naturales sintetizadas por bacterias patógenas. Además, fueron capaces, incluso, de degradar las AHLs producidas por bacterias patógenas no marinas, como los fitopatógenos *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas carotovorum* y

*Pseudomonas atrosepticum* (Smadja *et al.*, 2004; Venturi *et al.*, 2004; Pöllumaa *et al.*, 2012). Esta capacidad degradadora de AHLs naturales se confirmó en los siguientes ensayos de cocultivo *in vitro*, en los que las cepas QQ fueron añadidas en una mayor concentración a cultivos de vibrios patógenos (ratio  $10^5:10^2$  ufc/ml), degradando sus AHLs complemente.

Para determinar si la enzima QQ de las cepas PQQ-42 y PQQ-44 se trataba de una lactonasa, llevamos a cabo un ensayo de acidificación tras la incubación de las muestras con AHLs. No hubo una recuperación significativa de las moléculas AHLs ensayadas, lo que sugiere que la actividad degradadora observada en ambas cepas no es debida a una lactona, sino que se debe a la acción de otro tipo de enzima, como podría ser una acilasa o una oxidorreductasa. Al igual que en el estudio con bacterias aisladas del criadero de Lugo, los resultados indican que la actividad QQ no es debida a una lactonasa, y podría deberse a una enzima de otro tipo, como una acilasa. Para indenticar la enzima responsable de la actividad QQ, llevamos a cabo la secuenciación de los genomas de las cepas PQQ-42 y PQQ-44. En ellos se identificó el gen *pvdQ*, que codifica una enzima QQ de tipo acilasa con afinidad por las moléculas AHLs de cadena media o larga, lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente para las cepas PQQ-42 y PQQ-44 (Sio *et al.*, 2006; Bokhove *et al.*, 2010). De momento no se ha ensayado la actividad de la enzima purificada PvdQ de PQQ-42 y PQQ-44, pero estudios previos han puesto de manifiesto que la adición de PvdQ disminuye *in vivo* los síntomas producidos por la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* (Papaioannou *et al.*, 2009).

De forma paralela, se identificó en el genoma de la cepa PQQ-42 un cluster de síntesis de un PNR con homología con los clúster PNR de *Teredinibacter turnerae* y *Pseudoalteromonas elyakovii* (Yang *et al.*, 2009; Nagel *et al.*, 2012). Dicho PNR podría codificar para algún metabolito secundario, característica muy común entre las bacterias marinas, que han demostrado ser fuente de un gran número de compuestos bioactivos (Nikapitiya, 2012; Yu *et al.*, 2013). Los PNR son una clase de péptidos usualmente producidos como metabolitos secundarios, son una familia muy diversa de productos naturales con un rango de actividades biológicas y farmacológicas extremadamente amplio. Pueden funcionar como surfactantes, sideróforos, pigmentos, antibióticos, citostáticos o inmunosupresores, y por eso en la actualidad el objetivo de numerosas investigaciones es identificar microorganismos que posean genes de síntesis de PNR. En los últimos años, se han identificado dichos genes en numerosas especies marinas y se están aislando en ellas estos tipos de compuestos. Recientemente, en *Alteromonas macleodii* se ha descrito la presencia de un cluster que codifica un PNR con actividad antibacteriana y antitumoral que está

rodeado de transposasas que lo hacen móvil, como en el caso de PQQ-42 (Mizuno *et al.*, 2013). Nuestra hipótesis es que este PNR no es un compuesto antimicrobiano sino algún otro metabolito secundario, debido a que en nuestros ensayos de antagonismo frente a *Vibrio* spp. no detectamos ninguna actividad de antibiosis. En todo caso, la presencia de este cluster en el genoma de la cepa PQQ-42 no implica su expresión o función, pero incrementa la posibilidad de identificar microorganismos que puedan producir estos compuestos PNR (Al-Amoudi *et al.*, 2016). La capacidad de sintetizar un PNR junto con su actividad QQ convierten a la cepa PQQ-42 en una herramienta biotecnológica muy valiosa.

Respecto a la localización celular de la actividad degradadora de PQQ-42 y PQQ-44, ensayamos la actividad QQ en el sobrenadante y en el extracto celular crudo de las dos cepas frente a un amplio rango de AHLs. En todos los casos, no hubo actividad degradadora de AHLs en el sobrenadante de los cultivos, por lo que resultados indicaron que la actividad QQ en estas cepas está en las células, como es el caso de la mayoría de enzimas de QQ descritas hasta el momento (Uroz *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2014).

En este estudio hemos elegido la cepa PQQ-42 para los siguientes ensayos por su crecimiento homogéneo. Tras verificar que esta cepa no tiene ningún efecto de antagonismo sobre *Vibrio* spp., hemos realizado ensayos de cocultivo *in vitro* y hemos demostrado que la degradación de AHLs por parte de la cepa PQQ-42 tiene un efecto sobre los factores de virulencia producidos por *Vibrio* spp., como la disminución de la producción de quitinasa y proteasa y la reducción de la motilidad tipo swimming. Sin embargo, fenotipos como la formación de biofilm, la producción de sideróforos y las actividades lipasa y gelatinasa no se vieron afectadas. De forma similar a estos resultados, otros autores han descrito la atenuación de factores de virulencia, como la hemólisis y la producción de proteasa y biofilm, tras el cocultivo con una bacteria degradadora de AHLs (Chu *et al.*, 2014). En este trabajo hemos demostrado que la degradación de las AHLs en *Vibrio* spp. afecta a la expresión de algunos de sus fenotipos y por tanto, la posible virulencia de estos vibrios sobre los organismos marinos. Para verificar que la disminución de algunos factores de virulencia es debida a una interferencia del mecanismo QS, también se realizaron cocultivos entre *Vibrio* spp. y cepas de *E. coli* que expresan lactonasas (*E. coli*:pME6863 y *E. coli*:pMIR102) (Dong *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). Además, se están mutando los sistemas QS de estos *Vibrio* spp. mediante transformación con los plásmidos pME6863 y pMIR102. En todos los casos, la degradación de las AHLs tuvo el mismo efecto en la expresión de los fenotipos de *Vibrio* spp. Proximamente se realizarán ensayos *in vivo* para determinar la implicación del mecanismo QS en la virulencia de las mismas

Basándonos en los resultados de los cocultivos *in vitro*, realizamos ensayos *in vivo* y demostramos que la adición de la cepa PQQ-42 disminuye hasta un 50 % el blanqueamiento producido por *V. mediterranei* VibC-Oc-097 sobre el coral *Oculina patagonica* sin disminuir el número de vibrios. Este descubrimiento es de gran interés para la acuicultura y para la ecología, ya que entre el gran número de animales y plantas acuáticas susceptibles a las vibriosis, los corales representan un grupo muy sensible a estas enfermedades.

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios sobre la interferencia del sistema QS en infecciones por vibrios en acuicultura de peces, como rodaballos (*Scophthalmus maximus*) (Tinh *et al.*, 2008), en gambas (*Macrobrachium rosenbergii*) (Nhan *et al.*, 2010), o en langostinos (Vinoj *et al.*, 2014), obteniéndose muy buenos resultados. Recientemente, se ha demostrado que la administración oral de *Bacillus* sp. QSI protege a peces cebra (*Danio rerio*) de infecciones por *Aeromonas hydrophila* (Chu *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no se habían llevado a cabo ensayos de QQ sobre moluscos bivalvos ni sobre corales, por lo que nuestro estudio supone una primera aportación en la lucha contra sus enfermedades.

El uso de microorganismos o extractos con capacidad de degradar moléculas AHLs es una estrategia de control de enfermedades infecciosas en acuicultura que está adquiriendo cada vez más importancia. Una ventaja de esta estrategia es la opción de incorporar estas bacterias o extractos con actividad QQ directamente sobre el suministro de agua de las instalaciones o encapsularlos e incorporarlos junto a los piensos (Grandclément *et al.*, 2015). Otra ventaja del mecanismo QQ es que se permite una degradación de un amplio rango de moléculas AHLs, lo que permitirá la interrupción de un alto número de sistemas QS de bacterias patógenas, mientras que la inhibición por QSI es más específica para cada especie.

Según nuestros resultados, las cepas PP2-459, PP2-663, PQQ-42 y PQQ-44 tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas y son buenas candidatas a ser utilizadas *in vivo* para atenuar la producción de factores de virulencia en bacterias patógenas en la acuicultura. De hecho, la adición *in vivo* de estas cepas reduce significativamente la mortalidad en larvas de almeja y corales, así como probablemente en otras especies de la acuicultura afectadas por especies patógenas de *Vibrio*. Estas propiedades hacen a estas cepas una herramienta factible, económica y respetuosa con el medio ambiente para combatir las enfermedades infecciosas por *Vibrio* y otros patógenos cuya virulencia esté regulada por QS.





## **4.2. Búsqueda de enzimas quorum quenching en ambientes salinos mediante técnicas de ecología molecular**



#### 4.2.1. Resumen

En las últimas décadas, los sistemas quorum sensing y quorum quenching se han descrito en muchas bacterias provenientes de distintos ambientes acuáticos y terrestres. Sin embargo, son muy escasos los estudios de QS y su inhibición en bacterias extremófilas, y especialmente en microorganismos halófilos.

En 2005 se describió por primera vez la existencia de moléculas QS en bacterias halófilas aisladas fundamentalmente de suelos salinos y se demostró que la capacidad de producir AHLs era común en la familia *Halomonadaceae*. Sin embargo, apenas existe información disponible sobre el mecanismo de QQ en hábitats salinos.

Este estudio representa la primera identificación de genes de QQ en una librería metagenómica creada a partir de una muestra de suelo salino. Para aumentar la probabilidad de encontrar genes de QQ, hemos utilizado una estrategia de pool de clones, lo que nos ha permitido realizar de una forma más rápida el ensayo de 250.000 clones. Así, se ha identificado un único clon con capacidad de degradar AHLs, demostrando así que la presencia de genes QQ en los ambientes salinos son poco frecuentes. La caracterización genética y química de este clon ha permitido la identificación de una nueva clase de enzima degradadora de AHLs no relacionada con otros tipos de enzimas descritos previamente.



#### 4.2.1. Summary

*In the last decades, quorum sensing and quorum quenching systems have been described in many bacteria from different aquatic and terrestrial environments. However, QS studies and their inhibition in extremophilic bacteria, and especially in halophilic microorganisms, are very scarce.*

*In 2005, the existence of QS molecules was first described in halophilic bacteria isolated from saline soils and the ability to produce AHLs was shown to be common in the Halomonadaceae family. However, there is hardly any information available on the mechanism of QQ in saline habitats.*

*This study represents the first identification of QQ genes in a metagenomic library created from a saline soil sample. To increase the probability of finding QQ genes, we have used a clone pooling strategy, which has enabled us to perform a faster assay of 250,000 clones. A single clone with the capacity to degrade AHLs has been identified, thus demonstrating that the presence of QQ genes in saline environments is rare. The genetic and chemical characterization of this clone has allowed the identification of a new class of AHL-degrading enzyme unrelated to other types of enzymes previously described.*



## **4.2.2. Resultados**

### **4.2.2.1. Búsqueda de genes de quorum quenching en ambientes salinos mediante PCR**

Para abordar este enfoque, se utilizaron distintas muestras de ADN provenientes de suelos, aguas y sedimentos salinos de Rambla Salada (Murcia), Fuente de Piedra (Málaga), Larache (Marruecos) y Souk Larbâa (Marruecos) (véase el apartado 3.3). Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR con primers para las enzimas de quorum quenching PvdQ (acilasa), AttM (lactonasa) y AiiA (lactonasa) (véase el apartado 3.9.2). Sin embargo, en ninguno de los suelos o aguas salinas analizadas se ha obtenido, hasta el momento y en las condiciones ensayadas, amplificación con los pares de primers utilizados.

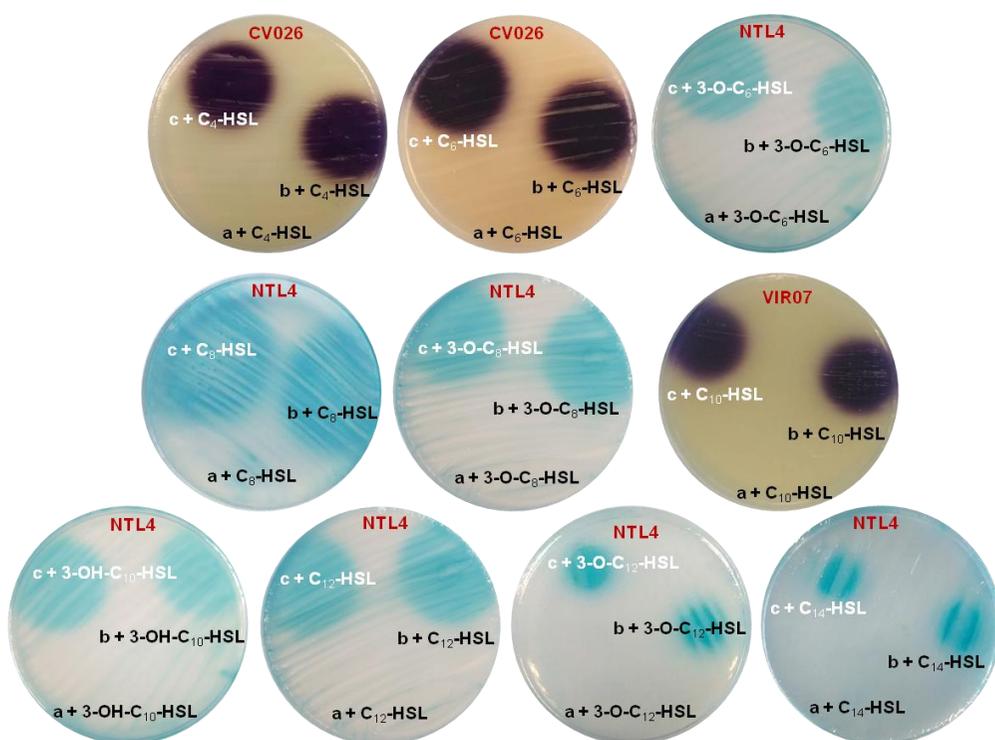
### **4.2.2.2. Identificación de genes de quorum quenching mediante una aproximación metagenómica**

#### **a) Búsqueda de genes de producción y degradación de AHLs en una librería metagenómica**

La búsqueda de nuevos genes de quorum quenching en ambientes salinos se realizó a partir de la construcción y el cribado de una librería metagenómica de un suelo salino localizado en Finca la Salina (Rambla Salada, Murcia) (muestra S1C, Tabla 6). La librería estuvo constituida por 250.000 clones, cuyos fósmidos contenían insertos de ~40 kb, tal y como se comprobó por restricción enzimática de distintos clones elegidos al azar.

El cribado de la librería se llevó a cabo en placas microtiter de 96 pocillos, donde se realizó un cálculo aproximado para obtener un número teórico de 50 clones por pocillo (~4.800 clones en cada placa microtiter). Usando esta estrategia, se abordó un ensayo de la capacidad de producir o de degradar moléculas AHLs utilizando el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026. Tras dos días de incubación sin adición de AHLs, ninguno de los pocillos de las 52 microtiters activó al biosensor. Por el contrario, tras dos días de incubación en presencia de la molécula C<sub>6</sub>-HSL, uno de los pocillos no activó al biosensor, lo que indicó una posible actividad QQ. Para identificar el clon o los clones involucrados, se realizaron diluciones seriadas del contenido del pocillo positivo para obtener colonias individuales. El posterior ensayo de la actividad QQ de estos aislados permitió la identificación de 17 clones de *Escherichia coli* con habilidad para degradar C<sub>6</sub>-HSL. Los análisis de restricción mostraron que todos los clones poseían un fósrido con un inserto de ~42 kb con un mismo patrón de restricción.

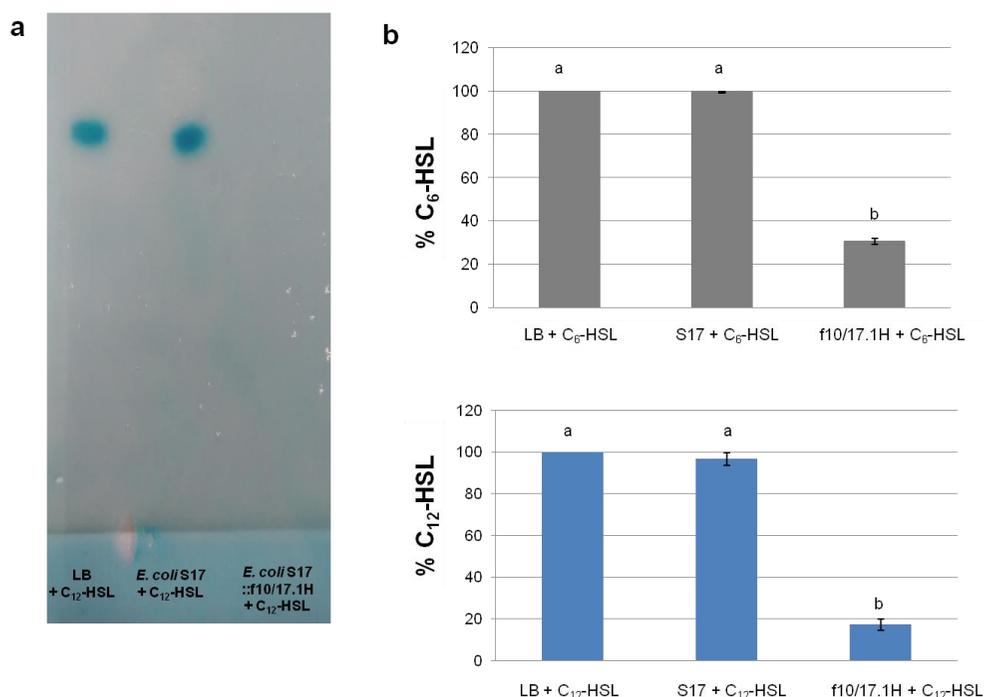
Este fósido, que fue nombrado f10/17.1H, fue purificado y transferido a *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* para llevar a cabo ensayos adicionales de degradación de AHLs sintéticas. Mediante ensayos de difusión en placa con los biosensores *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4), *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 se analizaron las AHLs remanentes de cultivos de dicho clon adicionados de las distintas moléculas sintéticas. Estos ensayos revelaron que el fósido f10/17.1H confería a *E. coli* la capacidad de degradar un amplio rango de moléculas AHLs sintéticas de distinto número de carbonos y sustituciones químicas: C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>6</sub>-HSL, 3-O-C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, 3-O-C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL y C<sub>14</sub>-HSL (Fig. 46).



**Figura 46. Determinación de la actividad quorum quenching conferida por el fósido f10/17.1H.** Detección con los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *Chromobacterium violaceum* VIR07 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4) de las AHLs adicionadas a *Escherichia coli* S17  $\lambda$  *pir*:f10/17.1H (a), *Escherichia coli* S17  $\lambda$  *pir* (b) y al medio LB (c).

Para identificar si el fenotipo observado era debido a una degradación de las AHLs o a una inhibición de su detección, se analizaron las moléculas remanentes mediante ensayos de TLC y HPLC. En estos ensayos se utilizaron las moléculas de cadena acil media y

larga C<sub>6</sub>-HSL y C<sub>12</sub>-HSL. Los resultados revelaron que la actividad del fósido f10/17.1H se correspondía con una degradación de las AHLs y no con una inhibición de los biosensores empleados (Fig. 47). Los análisis por HPLC/MS confirmaron que *E. coli* S17  $\lambda$  *pir* con el fósido f10/17.1H degradó totalmente las AHLs adicionadas en comparación con el control *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*, que no mostró actividad alguna (P<0.0001). Además, se pudo observar una eficacia significativamente superior en la degradación en presencia de C<sub>12</sub>-HSL (Fig. 47, P<0.0001). Los distintos grupos de significancia obtenidos tras un test *post-hoc* de Student-Newman-Keuls se representan con letras.



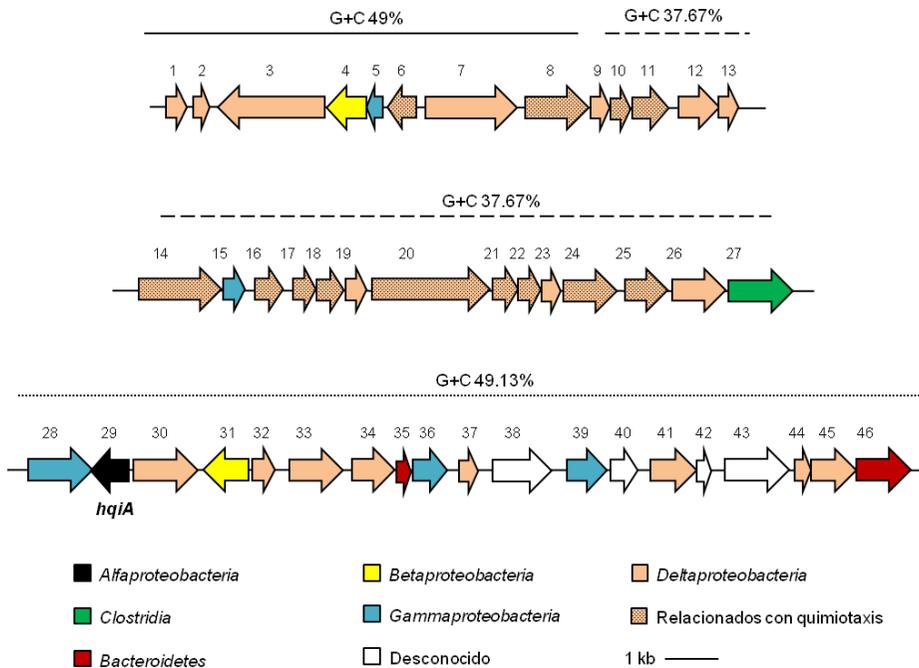
**Figura 47. Confirmación de la actividad quorum quenching del fósido f10/17.1H.** Análisis mediante TLC con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4) (a) y cuantificación mediante HPLC (b) de las AHLs remanentes tras el cultivo con *Escherichia coli* S17  $\lambda$  *pir*::f10/17.1H y *Escherichia coli* S17  $\lambda$  *pir*.

## b) Análisis *in silico* de la secuencia de ADN del fósido f10/17.1H

El análisis *in silico* del inserto de 42.318 pb de ADN ambiental del fósido f10/17.1H reveló 46 marcos abiertos de lectura (ORFs) en ambas direcciones (Fig. 48). Esta secuencia está depositada en GenBank con el número de BioProject PRJNA326320. El análisis del

contenido de guanina y citosina del inserto con el software GC-Profile puso de manifiesto un contenido total de G+C de 45,6 moles %, con tres segmentos diferenciados: (1-8.963 pb: 49 %, 8.926-21.987 pb: 37,67 % y 21.958-42.318 pb: 49,13 %) (Fig. 48). Aparte de las variaciones del porcentaje de G+C, un análisis detallado de la secuencia reveló que el uso de codones de la mayoría de aminoácidos detectados estaba igualmente distribuido entre sus distintas formas.

La comparación de las secuencias de proteínas de estos ORFs con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank reveló que 31 de los 46 ORFs mostraron una alta homología con las proteínas de la clase *Deltaproteobacteria*, y entre ellos, 25 ORFs estaban relacionados con proteínas de bacterias reductoras de sulfato (Tabla 13). Los géneros más representados relacionados con la clase *Deltaproteobacteria* fueron *Desulfobacula* (5 ORFs), *Desulfatibacillum* (3 ORFs), *Desulfobacterium* (4 ORFs), *Desulfosarcina* (2 ORFs), *Desulfomonile* (2 ORFs), *Desulforegula* (2 ORFs) y *Desulfocapsa* (2 ORFs). Las otras proteínas identificadas en el fósido tuvieron homología con proteínas de las clases *Gammaproteobacteria* (5 ORFs), *Betaproteobacteria* (2 ORFs), *Alfaproteobacteria* (1 ORF) y *Clostridia* (1 ORF) y del filo *Bacteroidetes* (2 ORFs) (Fig. 48).



**Figura 48. Distribución de ORFs en el inserto del fósido f10/17.1H.**

**Tabla 13. Homología de las proteínas codificadas por los ORFs del fosmidio f10/17.1H.**

f10/17.1H		Proteínas o proteínas hipotéticas y bacterias de mayor homología		
ORF	pb	Función hipotética	Especie bacteriana	Filo/clase
1	416	Proteína hipotética	<i>Deltaproteobacterium</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
2	326	Tiorredoxina	<i>Deltaproteobacterium</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
3	2072	Sensor histidina quinasa de sistema regulador de dos componentes	<i>Desulfobacula toluolica</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
4	737	Proteína hipotética	<i>Uliginosibacterium gangwonense</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
5	311	Proteína de unión a ATP de un transportador ABC de níquel	<i>Enterobacter lignolyticus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
6	533	Proteína de quimiotaxis CheW	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
7	1730	Regulador transcripcional tipo Fis	<i>Desulfobacter postgatei</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
8	1199	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilos	<i>Desulfobacula toluolica</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
9	359	Proteína hipotética	<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
10	419	Proteína de motilidad tipo gliding	<i>Desulfosarcina</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
11	680	Receptor CheY	<i>Desulfocapsa sulfexigens</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
12	743	Proteína hipotética	<i>Desulfosarcina</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
13	371	Regulador transcripcional tipo Fis	<i>Desulfonatronospira thiodismutans</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
14	1541	Proteína de quimiotaxis CheA	<i>Desulfonauticus</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
15	422	Regulador transcripcional tipo Fis	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
16	524	Receptor CheY	<i>Desulfocapsa sulfexigens</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
17	416	Proteína de quimiotaxis histidina quinasa	<i>Lawsonia intracellularis</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
18	512	Quimiorreceptor CheD glutamina desaminasa	<i>Desulfobacula toluolica</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
19	398	Histidina quinasa	<i>Desulforegula conservatrix</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
20	2216	Proteína de quimiotaxis CheA	<i>Desulfobacula toluolica</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
21	482	Proteína de quimiotaxis CheD	<i>Desulforegula conservatrix</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
22	428	Proteína de quimotaxis CheY	<i>Desulfobacterium</i> sp. no cultivado	<i>Deltaproteobacteria</i>
23	353	Proteína hipotética	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>

**Tabla 13. Homología de las proteínas codificadas por los ORFs del fosmido f10/17.1H.**

f10/17.1H		Proteínas o proteínas hipotéticas y bacterias de mayor homología		
ORF	pb	Función hipotética	Especie bacteriana	Filo/clase
24	1046	Regulador de respuesta de quimiotaxis glutamato metilesterasa	<i>Desulfobacterium</i> sp. no cultivado	<i>Deltaproteobacteria</i>
25	824	Metiltransferasa de tipo CheR	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
26	1046	L-treonina-3-deshidrogenasa	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
27	1184	Ligasa 2-amino-3-cetobutirato coA	<i>Clostridium termitidis</i>	<i>Clostridia</i>
28	1232	Transportador antiporte de Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	<i>Thioflaviccoccus mobilis</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
29	725	Isocorismatasa	<i>Hyphomonas jannaschiana</i>	<i>Alfaproteobacteria</i>
30	1271	Ferredoxina 4Fe-4S	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
31	839	Ciclohidrolasa GTP	<i>Pandoraea</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>
32	428	Proteína hipotética	<i>Deltaproteobacterium</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
33	1019	Aciltransferasa de fosfolípidos	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
34	785	Proteína hipotética de membrana	<i>Deltaproteobacterium</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
35	275	Proteína hipotética	<i>Polaribacter</i> sp.	<i>Bacteroidetes</i>
36	647	Proteínas de unión a grupo hemo	<i>Methylomonas methanica</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
37	347	Proteína hipotética	<i>Deltaproteobacterium</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
38	1124	ATPasa no caracterizada	Bacteria no cultivada	Sin identificar
39	761	Proteína hipotética	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
40	506	Proteína hipotética	Bacteria no cultivada	Sin identificar
41	866	Proteína hipotética	<i>Thermodesulfobium narugense</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
42	245	Desconocida	Sin identificar	Sin identificar
43	1127	Receptor de sideróforos TonB	Sin identificar	Sin identificar
44	302	Proteína hipotética	<i>Desulfobacula</i> sp.	<i>Deltaproteobacteria</i>
45	845	Desconocida	<i>Desulfobacterium</i> sp. no cultivado	<i>Deltaproteobacteria</i>
46	989	Serina proteasa de tipo subtilisina	<i>Ignavibacterium album</i>	<i>Bacteroidetes</i>

Las identificaciones taxonómicas y homologías mostradas en la Tabla 13 se comprobaron mediante el análisis filogenético de proteínas representativas de cada género mediante maximum likelihood. En la Figura 49 se muestra un ejemplo, en el que se representa la homología del ORF6 con proteínas CheW de otros géneros. Así se confirmaron los resultados obtenidos en el análisis por el programa BLAST, mostrando que el inserto del fósido seleccionado provenía de una *Deltaproteobacteria*. Sin embargo, varios ORFs (4, 5, 15, 27, 28, 29, 31, 35, 36, 38, 39, 40, 42, 43, 46) relacionados con otros grupos taxonómicos, como *Clostridia*, *Bacteroidetes*, *Alfa-*, *Beta-* o *Gammaproteobacteria*, estaban insertados en distintas localizaciones entre los ORFs relacionados con *Deltaproteobacteria*, lo que sugiere que podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal.

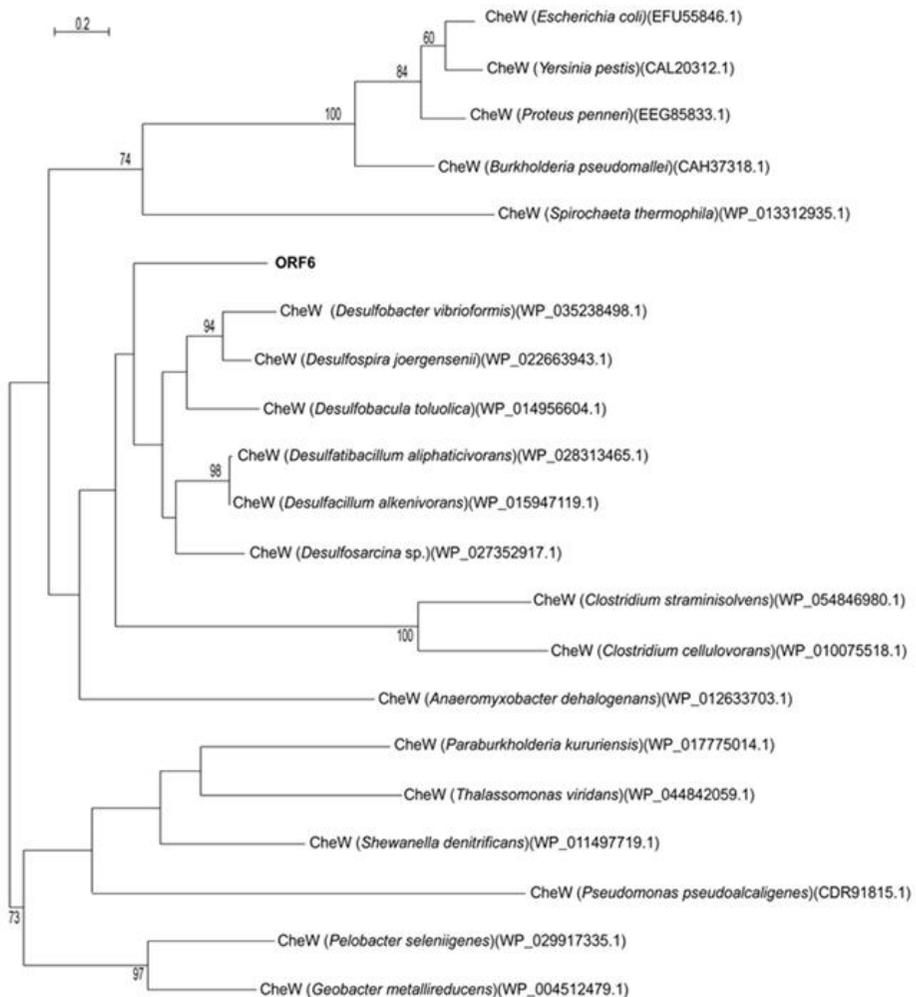


Figura 49. Análisis filogenético del ORF6 del fósido f10/17.1H

En términos de función, un análisis detallado de la secuencia del fósido reveló la presencia de un cluster de ORFs homólogos a genes que codifican proteínas de sistemas de quimotaxis. Concretamente, del ORF6 al ORF25, hay representados un total de 13 genes relacionados con quimotaxis y motilidad, como los homólogos de CheA (histidina quinasa), CheD (quimiorreceptor), CheR (metiltransferasa), CheW (quimiorreceptor) y CheY (quimiorreceptor). La funcionalidad de estos genes se analizó utilizando *E. coli* RP437 y dos mutantes de quimiotaxis ( $\Delta cheA$  y  $\Delta cheW$ ) que han perdido la motilidad tipo swarming. Tras la transformación de estos mutantes con el fósido f10/17.1H, no se observó una restauración o complementación significativa del fenotipo de swarming en comparación con la cepa silvestre RP437. El análisis de la secuencia del fósido seleccionado también mostró 5 ORFs que codificaban proteínas homólogas a una L-treonina-3-deshidrogenasa (ORF26), una ligasa 2-amino-3-cetobutirato coA (ORF27), una isocorismatasa (ORF29), una ciclohidrolasa GTP (ORF31) y una aciltransferasa de fosfolípidos (ORF33). Aparte de estos ORFs y aquellos que codifican proteínas hipotéticas, ningún ORF presentó homología con enzimas conocidas degradadoras de AHLs, como lactonasas (AttM, AiiA, QlcA, QsdA) o acilasas (QuiP, PvdQ) (Tabla 13, Fig. 50).

### **c) Demostración de la actividad degradadora de AHLs del ORF29**

Basándonos en la homología de las secuencias de los distintos ORFs (Tabla 13) y en la reacción enzimática prevista para las proteínas codificadas por los ORF26, ORF27, ORF29, ORF31 y ORF33, seleccionamos el ORF29, que codificaba una isocorismatasa (237 aa), para determinar su implicación en la degradación de AHLs.

El ORF29 fue amplificado mediante PCR y ligado en el plásmido pGEM-T. Posteriormente se transfirió al plásmido de bajo número de copias pME6010. Los ensayos de degradación frente a AHLs sintéticas realizados con las construcciones plasmídicas en pGEM-T o pME6010 revelaron que el ORF29 (denominado *hqiA* por *hypersaline quorum-quenching isochorismatase*) confiere a *E. coli* la habilidad de degradar todas las AHLs ensayadas.

### **d) Análisis y purificación de la proteína HqiA**

Tras un análisis exhaustivo de la secuencia de aminoácidos de HqiA, se puso de manifiesto que esta proteína no tenía homología con las enzimas lactonasas y acilasas conocidas hasta la fecha. De hecho, tal y como se observa en el árbol filogenético (Fig. 50), HqiA es muy distante filogenéticamente de las lactonasas AiiA, AttM, QlcA o QsdA y no está relacionada con las enzimas acilasas descritas PvdQ y QuiP (datos no mostrados).

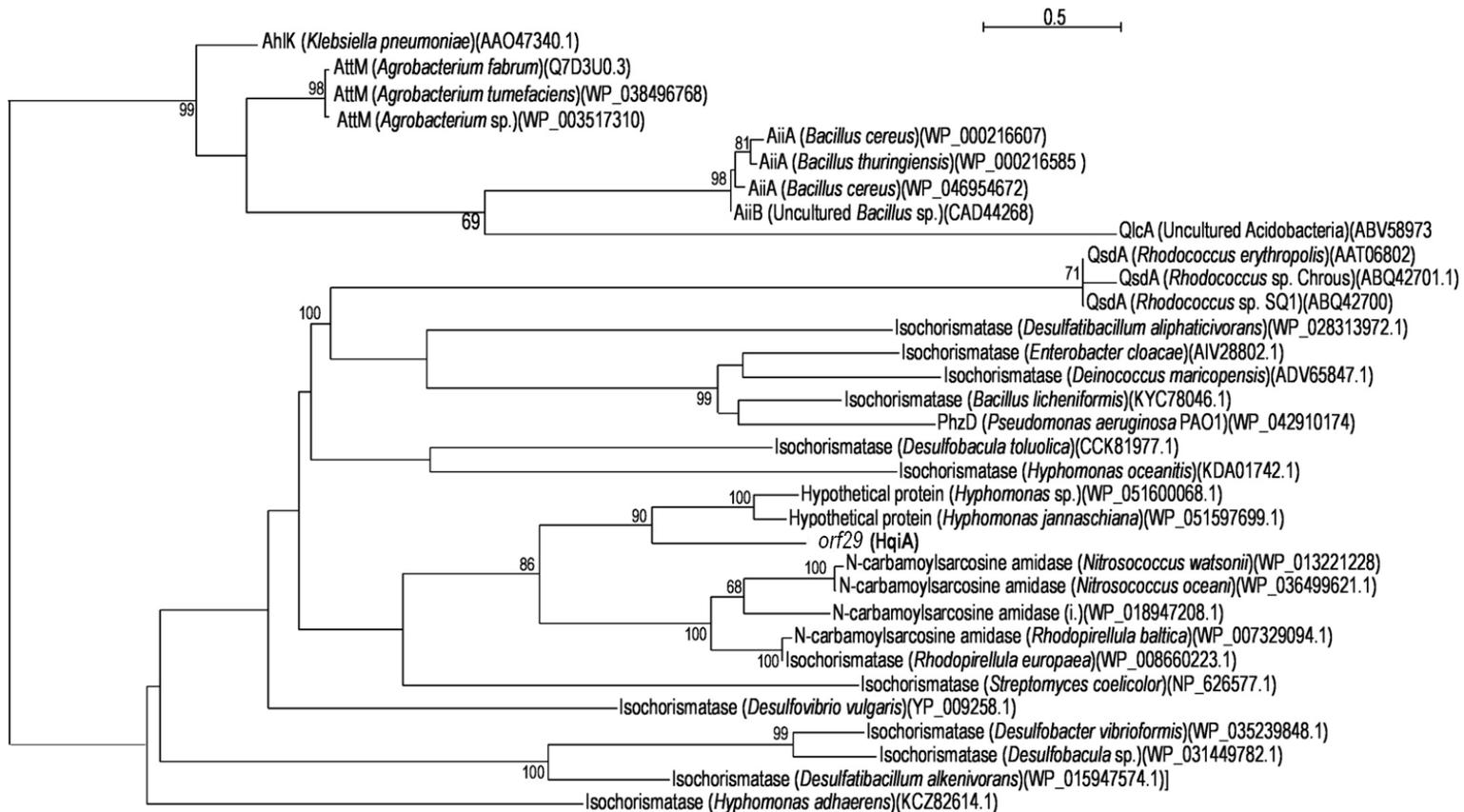
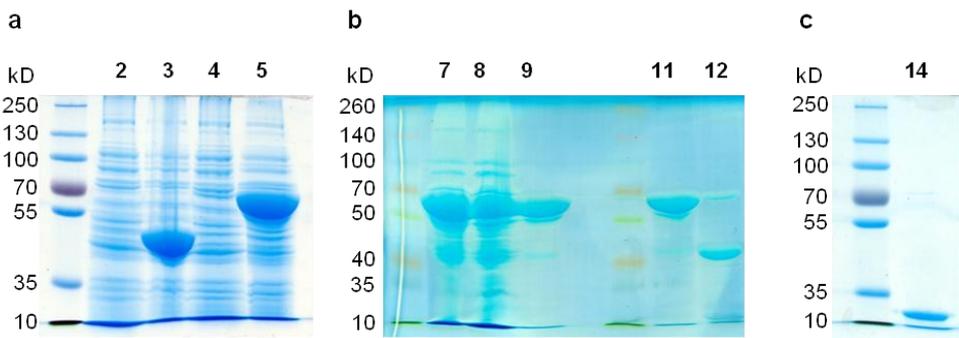


Figura 50. Análisis filogenético y agrupación de HqiA en el cluster de las enzimas cisteína hidrolasas con otras proteínas hipotéticas (HYPO), isocorismatasas (ISO) y N-carbamoylsarcosina amidasas (NCAR).

Además, se confirmó que la secuencia de la proteína HqiA está más relacionada con *Hyphomonas* que con otros géneros de la clase *Deltaproteobacteria*, aunque se pueden encontrar algunos homólogos en el genoma de algunas especies de *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina* y *Desulfocapsa*. Este análisis filogenético también puso de manifiesto que HqiA se agrupa en el clúster de las enzimas cisteína hidrolasas (CSHasas) junto con otras  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, y más especialmente con las enzimas isocorismatasas y las *N*-carbamoilsarcosina amidasas.

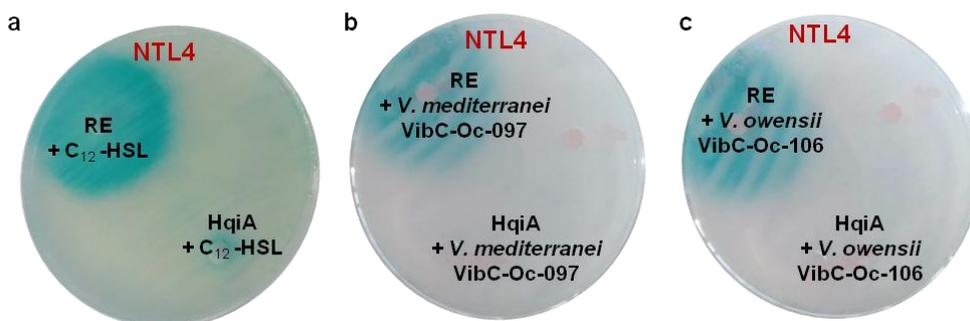
Para expresar y purificar la proteína HqiA para su posterior caracterización, se llevó a cabo la amplificación de *hqiA* mediante primers específicos y su posterior ligación en el plásmido de expresión pMAL-c2X, en el que el sitio de división del factor Xa ha sido sustituido por la proteasa TEV (del inglés *tobacco etch virus*). La transformación de la ligación de *hqiA* en pMAL-c2TEV en *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS y su inducción con IPTG 1mM, generó la proteína de fusión a maltosa (MBP) denominada MBP-HqiA. Posteriormente, ésta fue tratada con la proteasa TEV y purificada para dar lugar a la proteína HqiA, que tuvo un peso molecular de 26 kD (Fig. 51).



**Figura 51. Expresión y purificación de HqiA.** Electroforesis de proteínas de la expresión de MBP-HqiA (a), carriles 2 y 3: extractos sin inducir e inducidos de *E. coli* con el vector vacío y carriles 4 y 5: extractos sin inducir e inducidos de *E. coli*:pMAL-c2TEV-*hqiA*. Tratamiento de MBP-HqiA (b), carril 7: extractos crudos, carril 8: extractos solubles, carriles 9 y 11: fracción de cromatografía de afinidad y carril 12: proteína tratada con la proteasa TEV. Purificación de HqiA por cromatografía de intercambio iónico (c), carril 14: muestra eluída.

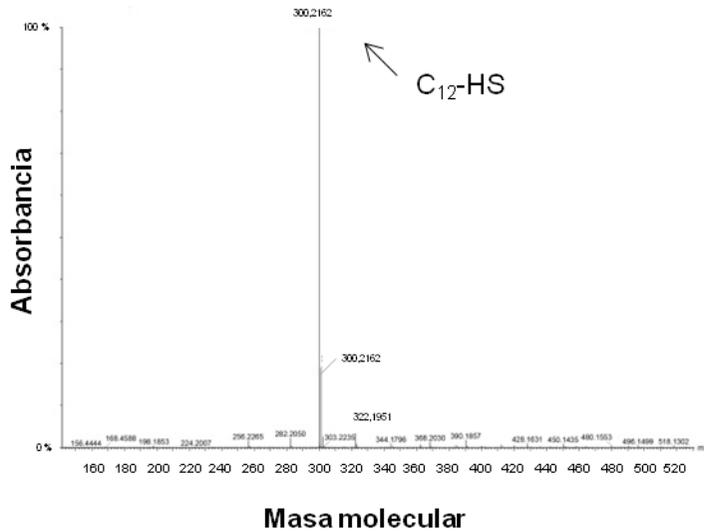
La actividad degradadora de AHLs de HqiA se confirmó frente a todas las AHLs utilizando el extracto crudo de *E. coli* con el plásmido pMAL-c2TEV-*hqiA*. Por el contrario, no hubo degradación de las moléculas con los extractos de *E. coli* con el vector vacío pMAL-c2TEV (datos no mostrados). Además, se realizaron ensayos con la enzima purificada HqiA (16  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a todas las AHLs sintéticas disponibles

así como en ensayos *in vivo* mediante su adición a cultivos de 500  $\mu$ l (DO<sub>600</sub> 0,5) de las bacterias patógenas en acuicultura productoras de AHLs *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-97 y *V. owensii* VibC-Oc-106. En ambos casos, HqiA produjo una degradación total de las AHLs (Fig. 52).



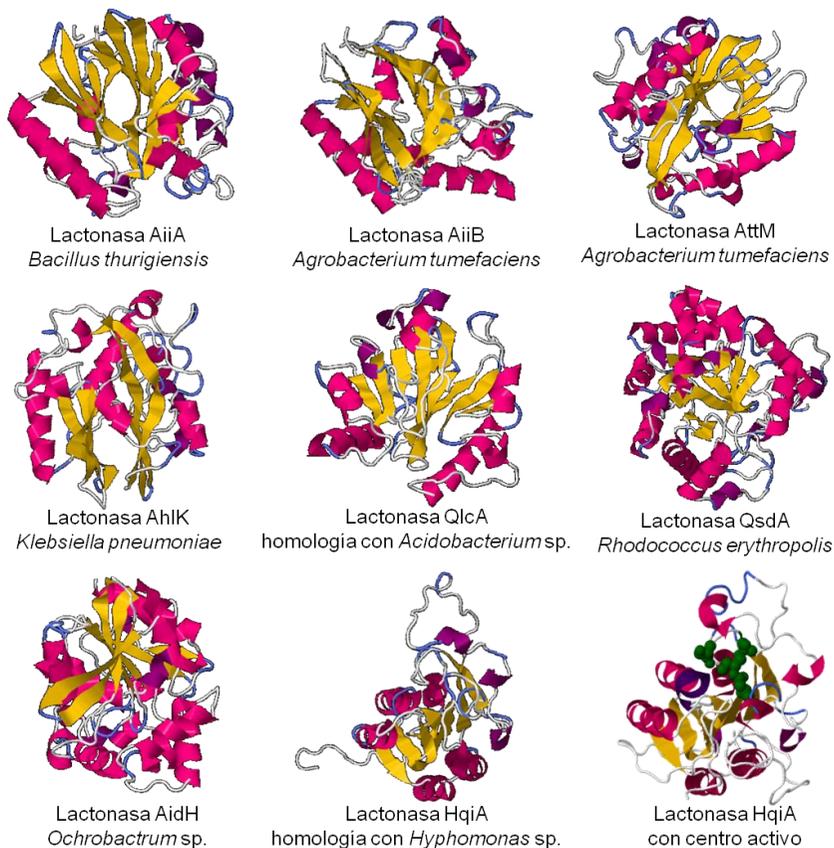
**Figura 52. Determinación de la actividad degradadora de la enzima purificada HqiA.** Actividad sobre sobre AHLs sintéticas (a) y sobre cultivos de *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097 (b) y *Vibrio owensii* VibC-Oc-106 (c) Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4).

Para identificar el tipo de actividad enzimática de la proteína HqiA, se analizó el producto de la reacción entre la proteína purificada y C<sub>12</sub>-HSL tras 4 h de incubación mediante HPLC/MS y un ensayo de acidificación (Yates *et al.*, 2002). Además, tras la acidificación del sobrenadante con HCl y posterior neutralización del pH, se realizó un ensayo para detectar las AHLs remanentes con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4). Hubo una recuperación completa de los niveles iniciales de C<sub>12</sub>-HSL, por lo que podría decirse que la actividad QQ es debida a una enzima de tipo lactonasa (datos no mostrados). En cuanto al análisis por HPLC/MS, se observó que en las muestras, tras el ensayo de degradación aparece un pico mayoritaria correspondiente a una masa molecular de ~300, lo que corresponde con la forma abierta de C<sub>12</sub>-HSL, la dodecanoil-homoserina C<sub>12</sub>-HS (C<sub>12</sub>-HSL=283; C<sub>12</sub>-HS, 283 + H<sub>2</sub>O=300) (Fig. 53). Estos resultados indican que la isocorismatasa HqiA tiene actividad lactonasa.



**Figura 53. Detección por HPLC/MS del producto C<sub>12</sub>-HS tras el ensayo de degradación de la proteína purificada HqiA con la molécula C<sub>12</sub>-HSL.**

La estructura tridimensional de la proteína HqiA se predijo mediante el software Phyre2 y se comparó con la estructura de otras lactonas descritas (Fig. 54). Como puede observarse, la estructura de HqiA es muy diferente a la de las otras lactonas AiiA, AiiB, AttM, AhIK, QlcA, QsdA y AidH. La isocorismatasa corresponde a una gran familia de enzimas relacionada con las cisteína hidrolasas (CSHasas), capaces de hidrolizar enlaces éster y éter, y cuyo centro catalítico activo posee los dominios conservados D, K y C (ácido aspártico, lisina y cisteína), presentes también en HqiA (Fig. 54).

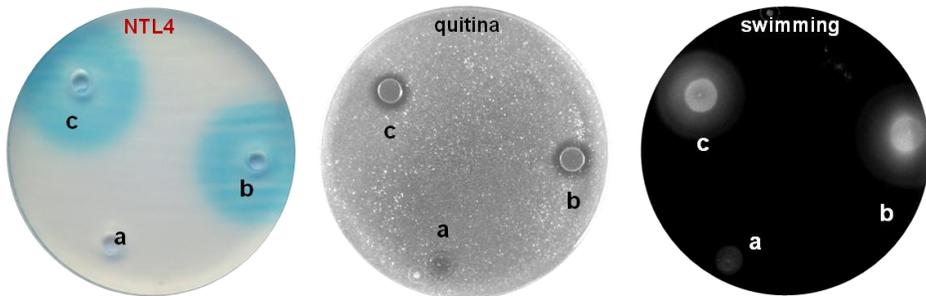


**Figura 54. Estructura tridimensional de diferentes enzimas quorum quenching de tipo lactonasa.**

### e) Efecto de la actividad quorum quenching de *hqiA* frente a la virulencia de bacterias patógenas

Como hemos visto en el capítulo anterior, *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193 es un importante patógeno de corales en el que existe una correlación entre la producción de AHLs y la regulación de distintos fenotipos. Para evaluar el impacto de la expresión de *hqiA* en esta cepa especie de *Vibrio*, se introdujo mediante conjugación el plásmido pME6010::*hqiA* en dicha bacteria. Nuestros resultados demostraron que la concentración de AHLs en el cultivo disminuyó considerablemente en comparación con el control realizado con el plásmido vacío y la cepa silvestre. No se encontraron AHLs en *V. coralliilyticus* (pME6010::*hqiA*) en la detección con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), mientras que en los controles sí se detectaron.

Para evaluar el impacto de *hqiA* en las funciones reguladas por QS en este patógeno marino, se realizaron ensayos fenotípicos (véase apartado 3.4) a los cultivos de *V. coralliilyticus* (pME6010::*hqiA*), *V. coralliilyticus* (pME6010) y a la cepa silvestre. Los resultados indicaron que la expresión de *hqiA* en *V. coralliilyticus* disminuye la motilidad tipo swimming e inhibe la producción de la enzima quitinasa bajo nuestras condiciones de ensayo (Fig. 55).

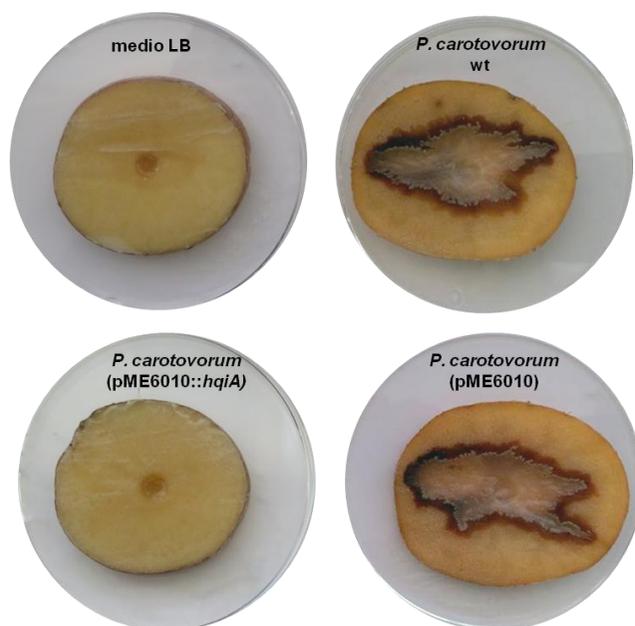


**Figura 55. Influencia de la expresión de *hqiA* en algunos fenotipos de *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193.** Detección de AHLs con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4) en *Vibrio coralliilyticus* (pME6010::*hqiA*) (a), *Vibrio coralliilyticus* expresando el vector vacío pME6010 (b) y la cepa salvaje.

De forma similar se evaluó el efecto de *hqiA* en bacterias patógenas de plantas. En *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> la virulencia está relacionada con enzimas de maceración de tipo proteasas y pectinasas, motilidad de tipo swarming y swimming, etc., hallándose estos factores de virulencia regulados por QS.

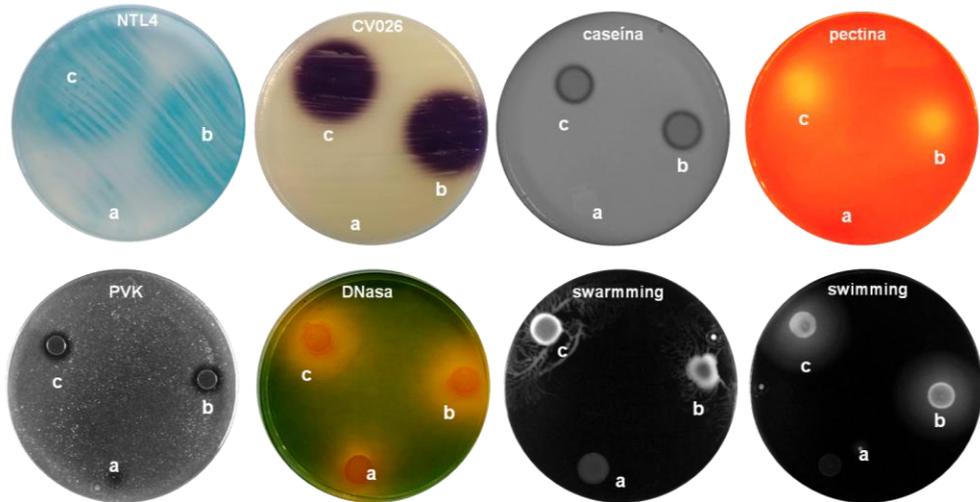
Con el fin de determinar el efecto de la expresión de *hqiA* en la regulación de los factores de virulencia de esta bacteria, se introdujo por electroporación el plásmido pME6010::*hqiA* en la misma. Se observó que la concentración de AHLs en el cultivo disminuyó significativamente en comparación con el control realizado con el plásmido vacío y la cepa silvestre. No se encontraron AHLs en *P. carotovorum* (pME6010::*hqiA*) en el ensayo de difusión en placa con los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), pero en los controles sí se detectaron. La actividad QQ de la expresión del gen *hqiA* en *P. carotovorum* se evaluó a continuación en un ensayo en tubérculos de patatas. El ensayo puso de manifiesto que *P. carotovorum* (pME6010::*hqiA*) no fue capaz de causar síntomas de podredumbre, mientras que la cepa silvestre y el control con el plásmido vacío pME6010 causaron una maceración importante (Fig. 56).

Para confirmar que la expresión de *hqiA* no influía sobre el crecimiento de *P. carotovorum*, se realizó una curva de crecimiento de *P. carotovorum* (pME6010::*hqiA*) y *P. carotovorum* (pME6010). Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre el crecimiento de ambos cultivos.



**Figura 56. Influencia de *hqiA* sobre la virulencia de *Pectobacterium carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> sobre patatas.** Rodajas de patatas inoculadas con *Pectobacterium carotovorum* (pME6010::*hqiA*), *Pectobacterium carotovorum* (pME6010), la cepa silvestre y medio LB.

La evaluación del impacto de *hqiA* en las funciones reguladas por QS en este patógeno de plantas se realizaron mediante distintos medios (véase apartado 3.4) para evaluar los fenotipos de los cultivos de *P. carotovorum* (pME6010::*hqiA*), *P. carotovorum* (pME6010) y a la cepa silvestre. Los resultados mostraron que la expresión de *hqiA* en *P. carotovorum* inhibe la producción de las enzimas proteasa, pectinasa, fosfatasa alcalina y DNasa bajo nuestras condiciones de ensayo. Además, las motilidades de tipo swarming y swimming también se vieron afectadas (Fig. 57).



**Figura 57. Influencia de la expresión de *hqiA* en algunos fenotipos de *Pectobacterium carotovorum* CECT 225<sup>T</sup>.** Detección de AHLs con los biosensores *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZRL4) y *Chromobacterium violaceum* CV026 en *Pectobacterium carotovorum* (pME6010::*hqiA*) (a), *Pectobacterium carotovorum* expresando el vector vacío pME6010 (b) y la cepa salvaje (c).

También se evaluó el impacto de *hqiA* sobre *Agrobacterium fabrum* C58 (Piper *et al.*, 1999; Llamas *et al.*, 2005; M Torres *et al.*, 2016), otra bacteria patógena de plantas productora de AHLs. En esta bacteria, el sistema QS regula la producción de factores de virulencia y la formación de tumores en distintos tipos de plantas (de Cleene, 1979). Actualmente estamos llevando a cabo ensayos sobre plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) con *A. fabrum* (pME6010::*hqiA*), *A. fabrum* (pME6010) y la cepa silvestre. Los resultados obtenidos en los primeros ensayos realizados son similares al caso de *P. carotovorum*, donde se produjo una reducción de la virulencia respecto a la cepa silvestre. Aunque en ningún caso han aparecido tumores en las lechugas inoculadas con *A. fabrum* (pME6010::*hqiA*), las plantas han sufrido un menor deterioro respecto a los controles (Fig. 58). Sin embargo, en este caso, los resultados son preliminares y aún no se han realizado las repeticiones necesarias para poder confirmarlos.



**Figura 58.** Influencia de la expresión de *hqiA* sobre la virulencia de *Agrobacterium fabrum* C58 sobre plantas de lechuga. Parte aérea y raíces de lechugas inoculadas con *Agrobacterium fabrum* (pME6010::*hqiA*), *Agrobacterium fabrum* expresando el vector vacío pME6010, la cepa silvestre y medio LB.



### 4.2.3. Discusión

En las últimas décadas, los sistemas QS y QQ se han descrito en muchas bacterias procedentes de distintos ambientes acuáticos y terrestres (Williams *et al.*, 2007; Grandclément *et al.*, 2015). Sin embargo, son muy escasos los estudios de QS y su inhibición en bacterias extremófilas, y especialmente en microorganismos halófilos (Farah *et al.*, 2005; Montgomery *et al.*, 2013). De hecho, es muy limitada la información relacionada con las moléculas intercambiadas en estos microorganismos adaptados a hábitats extremos caracterizados por una elevada salinidad, niveles bajos de oxígeno y a veces alta alcalinidad (Rodríguez-Valera, 1988). La primera descripción de la existencia de moléculas QS en un ambiente hipersalino fue realizada por Llamas *et al.* (2005). Se demostró que la capacidad de producir AHLs era común entre diversas cepas productoras de exopolisacáridos de *Halomonas*, uno de los géneros más abundantes en estos ambientes (Llamas *et al.*, 2005). Además, ésta era una característica común presente en otras 43 especies de la familia *Halomonadaceae* que también produjeron moléculas AHLs (Tahrioui *et al.*, 2013). Estos resultados nos hicieron pensar que la comunicación QS era un rasgo extendido en este tipo de bacterias y que podría tener algún papel importante en la colonización y supervivencia en los ambientes salinos. Por otra parte, hasta la fecha no se han descrito bacterias halófilas con capacidad para degradar AHLs enzimáticamente. Por ello, en un estudio paralelo a esta tesis, hemos evaluado la actividad QQ de 21 bacterias halófilas de la familia *Halomonadaceae* que son abundantes en suelos hipersalinos y que producen AHLs (Llamas *et al.*, 2005; Martínez-Checa *et al.*, 2013; Tahrioui *et al.*, 2013). Para ello, se llevó a cabo un ensayo de difusión en agar utilizando los biosensores *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) y *C. violaceum* CV026. Sin embargo, ninguna de las cepas ensayadas inhibió la activación de los biosensores. Podría darse el caso de que alguna de ellas produjera enzimas QQ, pero que no pudieran detectarse mediante el ensayo de difusión en placa Petri debido a sus propias AHLs (Llamas *et al.*, 2005; Tahrioui *et al.*, 2013).

Por tanto, los estudios sobre QS y QQ en ambientes hipersalinos son limitados y hasta muy recientemente, la mayoría de nuestro conocimiento se basaba únicamente en estrategias dependientes de cultivo, ignorando así una gran parte de la diversidad microbiana de un ambiente y el gran potencial funcional de las comunidades bacterianas que pueblan un hábitat complejo y extremo (Williamson *et al.*, 2005; Nichols, 2007).

Consecuentemente a lo expuesto, decidimos completar nuestro estudio con técnicas de ecología molecular (amplificación de genes de QQ por PCR y construcción y búsqueda de genes en una librería

metagenómica ambiental) para comprobar si lográbamos detectar más enzimas con actividad QQ. En lo relativo a la librería metagenómica, decidimos realizarla a partir de un suelo salino descartando el hacerla a partir de las muestras de agua de mar tomadas en los criaderos, pues en este campo están trabajando otros autores y ya existen datos al respecto (Romero *et al.*, 2012). Además, el suelo salino elegido pertenece a Rambla Salada, un hábitat perfectamente caracterizado por nuestro grupo y donde se han realizado numerosos estudios de ecología clásica y molecular (Luque *et al.*, 2012; Martínez-Checa *et al.*, 2013; Oueriaghli *et al.*, 2013)

Además de la búsqueda de potenciales enzimas quorum quenching en metagenomas y en librerías metagenómicas, las estrategias de amplificación por PCR también dan una idea de los genes QQ de bacterias cultivables y no cultivables que puede haber en una muestra. En nuestro caso, utilizando pares de primers diseñados en esta tesis o descritos por otros autores, hemos intentado identificar diversas enzimas QQ en muestras de suelo, agua y sedimentos salinos de España y Marruecos. Sin embargo, bajo nuestras condiciones de ensayo no hemos amplificado enzimas QQ en ninguna de las muestras.

Debido a que la amplificación de genes de QQ mediante PCR no dió resultado, ni tampoco la búsqueda previa de actividad degradadora de AHLs en bacterias halófilas cultivables, se planteó la pregunta de si podrían existir en los ambientes salinos otras enzimas de quorum quenching de microorganismos no cultivables diferentes a las lactonasas y acilasas descritas hasta el momento.

Las aproximaciones mediante metagenómica basadas en secuenciación *shotgun* o en librerías de fósmidos dan una información muy diferente a la encontrada mediante las técnicas clásicas de cultivo. De hecho, estas estrategias revelaron una frecuencia más baja pero una diversidad más elevada de bacterias productoras o degradadoras de AHLs (Rusch *et al.*, 2007; Riaz *et al.*, 2008; Romero, *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta sólo homólogos de genes de QQ en diversos metagenomas acuáticos y terrestres, Romero *et al.* (2012) mostró que la frecuencia varió de 0,05 a 0,4 homólogos por Mbp. Sin embargo, los genes de QS y QQ conservan bajos niveles de homología entre ellos, por lo que muchos homólogos identificados *in silico* no son funcionales y otros muchos no llegan a ser identificados. En este contexto, el uso de librerías de fósmidos puede ser una buena alternativa que permite ensayar la actividad degradadora o productora de AHLs en diversos clones. Mediante esta metodología se han identificado nuevos tipos de genes de QS y QQ (Riaz *et al.*, 2008; Schipper *et al.*, 2009; Bijtenhoorn *et al.*, 2011; Nasuno *et al.*, 2012; Tannières *et al.*, 2013), pero la frecuencia sigue siendo muy baja. De hecho, estudios recientes han

mostrado que la obtención de homólogos positivos varía entre  $4,82 \times 10^{-4}$  y  $3,3 \times 10^{-3}$  por Mbp (Riaz *et al.*, 2008; Nasuno *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, en la librería metagenómica generada a partir de un suelo salino se obtuvo un único clon tras el ensayo de 250.000 clones, lo que corresponde a una frecuencia estimada de  $1 \times 10^{-4}$  clones por Mbp. Tal y como se había demostrado en el capítulo anterior, la frecuencia de bacterias degradadoras de AHLs es más elevada en medios marinos que terrestres. Por el contrario, no se detectó ningún gen relacionado con la producción de moléculas QS. Debido a que previamente se habían aislado bacterias productoras de AHLs en el mismo sitio de muestreo (Llamas *et al.*, 2005; Tahrioui *et al.*, 2013), no se puede ignorar un posible problema de expresión parcial e insuficiente de algunos genes en *E. coli*, como ya se ha descrito en algunas librerías metagenómicas (Uchiyama y Miyazaki, 2009).

El cribado de la librería metagenómica y su posterior análisis *in silico* permitió identificar un único gen (*hqiA*) en el fósido f10/17.1H capaz de conferir a *E. coli* la capacidad de degradar AHLs. La caracterización química mediante HPLC/MS de la actividad enzimática codificada en el gen *hqiA* pone de manifiesto una actividad de tipo lactonasa. La actividad de HqiA se caracteriza por degradar un amplio rango de moléculas AHLs con y sin sustituciones de tipo oxo- e hidrox-, mostrando una mayor actividad sobre las moléculas AHLs de cadena acil larga. Hasta la fecha se han descrito varios tipos de lactonasas, tales como AiiA, AiiB, AidH, AttM, AhIK, QsdA y QlcA. La mayoría de estas enzimas han sido identificadas mediante estrategias dependientes de cultivo. La única enzima lactonasa de tipo AiiA obtenida tras el cribado de una librería de fósidos fue QlcA, y fue propuesta como un nuevo tipo de enzima lactonasa según los análisis filogenéticos (Riaz *et al.*, 2008). Todas estas enzimas pueden agruparse en dos grupos bien diferenciados: i) las metalohidrolasas de zinc que abarcan las enzimas de tipo AiiA, AiiB, AttM, AhIK, QsdA, QlcA y las fosfotriesterasas y ii) las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas con un único miembro caracterizado (AidH). Estos tipos de enzimas presentan motivos funcionales conservados como HXDH-H-D en AiiA, AiiB, AidH, AttM, AhIK y QlcA, G-VL-HEH para QsdA o G-S-GG en AidH que permiten su identificación *in silico* (Dong *et al.*, 2002; Carlier *et al.*, 2003; Riaz *et al.*, 2008; Uroz *et al.*, 2008; Mei *et al.*, 2010). Sin embargo, HqiA no contiene los motivos estructurales típicamente encontrados en otras lactonasas como AiiA, AttM, AhIK, QlcA, QsdA o AidH, lo que sugiere que representa una nueva familia de lactonasas no relacionada con las metalohidrolasas de zinc. Un análisis *in silico* ha revelado que HqiA tiene una alta homología con otras enzimas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, aunque no con las relacionadas con AidH. De hecho, HqiA tiene homología con las enzimas del grupo de CSHasas, en el que miembros han mostrado la capacidad de romper enlaces éter, éster o amido. La homología más alta

de HqiA fue obtenida con enzimas de tipo isocorismatasas y *N*-carbamoilsarcosina amidasas. A las enzimas isocorismatasas se le han asignado diversas funciones biológicas, pero nunca relacionadas con la degradación de moléculas AHLs. Por ejemplo, HqiA muestra una homología elevada con PhzD, que se ha descrito como una isocorismatasa involucrada en la síntesis de fenazina en *Pseudomonas aeruginosa* (Parsons *et al.*, 2003). Hasta la fecha se han caracterizado tres enzimas acilasas en *P. aeruginosa*, pero aún no se ha identificado ninguna lactonasa. Por ello, se evaluó la actividad degradadora de AHLs de la isocorismatasa PhzD, aunque dicho gen no degradó las moléculas ensayadas en nuestras condiciones de ensayo. Quizás la caracterización funcional de esta enzima isocorismatasa PhzD expandiría esta lista con una nueva lactonasa, y además se comprendería mejor la regulación del sistema QS de *P. aeruginosa*. Otra de las funciones descritas de las enzimas isocorismatasas es su participación en la ruta de síntesis de sideróforos en *Escherichia coli* y en *Vibrio vulnificus*, al igual que la enzima acilasa PvdQ (Rusnak *et al.*, 1990; Litwin *et al.*, 1996; Yeterian *et al.*, 2010)

Respecto al origen taxonómico del inserto de ADN ambiental clonado en el fósido f10/17.1H, los análisis *in silico* (búsqueda mediante BLAST y análisis filogenéticos) revelaron que las secuencias de 31 de los 46 ORFs mostraron una alta homología con *Deltaproteobacteria*, sugiriendo que el inserto de ADN podría pertenecer a este grupo bacteriano. Además, 25 de esos 31 ORFs mostraron homología con bacterias reductoras de sulfato, un grupo de microorganismos ubicuo en los ambientes hipersalinos, donde el sulfato es un compuesto inorgánico abundante (Ollivier *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 2007). Curiosamente, en los estudios previos de nuestro grupo sobre la diversidad procarionta en Rambla Salada mediante técnicas de ecología molecular (Oueriaghli *et al.*, 2013) no se detectaron géneros de bacterias reductoras de sulfato. Por otra parte, una gran proporción de los ORFs con homología con *Deltaproteobacteria* (13 ORFs) presentó homología con sistemas de quimiotaxis y motilidad. Probablemente, este tipo de genes proporcionan una ventaja competitiva para la colonización bacteriana de suelos hipersalinos. Genes similares de quimiotaxis se observan también en las secuencias de genomas de *Desulfobacula toluolica* o *Desulfatibacillum alkenivorans*, pero la organización de genes es diferente. De hecho, en el inserto ambiental clonado en el fósido f10/17.1H, muchos de los genes *che* están dispuestos unos al lado de otros, mientras que en los genomas disponibles de *Desulfobacula* o *Desulfatibacillum* aparecen físicamente separados y organizados en clústers más pequeños. Sin embargo, este tipo de organización de genes *che* en clústers más grandes se ha encontrado en otros taxa bacterianos, como *Sinorhizobium*, *Rhizobium* o *Azospirillum* (Sourjik *et al.*, 2000; Scharf *et al.*, 2016). En *Sinorhizobium meliloti*, la quimiotaxis está

regulada por un sistema QS, sin embargo, en nuestro caso no se ha encontrado esa relación (Hoang *et al.*, 2008). Además, debido a que los ensayos de complementación de los mutantes *cheA* y *cheW* con el fósido f10/17.1H no restauraron el fenotipo de *E. coli*, no se pudo verificar la funcionalidad de los genes homólogos *che* del inserto del fósido. Estos resultados pueden deberse a la expresión parcial e insuficiente en *E. coli* o a una homología insuficiente de estos genes.

Además de los ORFs pertenecientes a *Deltaproteobacteria*, el análisis filogenético puso de manifiesto que al menos 11 ORFs se correspondían con otros grupos (*Alfa-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia* y *Bacteroidetes*) y estaban insertados entre los ORFs de *Deltaproteobacteria*. Esta organización de genes, junto con el cambio notable en el contenido en G+C y la ausencia de elementos móviles, sugiere una transferencia horizontal de genes (HGT). Éste es un mecanismo universal empleado por las bacterias para adquirir nuevas funciones que les permitan adaptarse a hábitats con distintas presiones selectivas. La presencia de eventos de HGT ya se ha descrito previamente en otros suelos hipersalinos (Parnell *et al.*, 2010), lo que sugiere que también ha podido ocurrir en el suelo de Rambla Salada. La funcionalidad de estos 11 genes no se ha ensayado aún, pero la presencia de dichos genes heredados por HGT sugiere que deben conceder una ventaja selectiva. Curiosamente, el ORF29 (*hqiA*) que codifica una enzima lactonasa es el único en el fósido asignado a la clase *Alfaproteobacteria*, y tiene una elevada homología con genes de isocorismatasas encontrados en genomas de especies bacterianas pertenecientes al género *Hyphomonas*. Aunque se había descrito con anterioridad la degradación de algunas moléculas AHLs en *Hyphomonas* sp. (Romero *et al.*, 2011), aún no se ha descrito el tipo de enzima QQ implicada, aunque los resultados de acidificación obtenidos revelan una actividad distinta a una lactonasa. De forma similar a lo ocurrido en nuestro trabajo, un análisis *in silico* en el genoma de *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 (una bacteria reductora de sulfato) reveló la presencia de un gen anotado de tipo *aiiA*, con una elevada homología con miembros de la clase *Firmicutes*. La identificación de otro posible caso de HGT de un gen de una lactonasa sugiere que la transferencia horizontal de genes ocurre regularmente entre los miembros de la clase *Deltaproteobacteria* y otros taxa y que distintos genes de QQ pueden intercambiarse para obtener alguna ventaja evolutiva. De hecho, recientemente, se ha descrito la presencia de enzimas QQ como desintoxicadoras de moléculas señal exógenas (Bar-Rogovsky *et al.*, 2013)

Aunque el papel fisiológico real de las enzimas degradadoras de AHLs aún permanece indeterminado (Grandclément *et al.*, 2015), éstas representan una alternativa prometedora al uso de productos químicos y

antibióticos para el tratamiento de enfermedades reguladas por QS, por ejemplo en acuicultura y en agricultura. Nuestros ensayos de QQ muestran que la expresión del gen *hqiA* y la enzima HqiA no sólo degradaron un amplio rango de AHLs, sino que también interfirieron la producción de AHLs en el patógeno de corales *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193, en el que se introdujo el gen *hqiA* por conjugación. Además, se demostró que dos de sus fenotipos y posibles factores de virulencia, la producción de enzima quitinasa y la motilidad tipo swimming, se inhibían completamente. Aunque aún no se ha confirmado que estas funciones sean factores de virulencia en *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, la motilidad y la actividad quitinolítica sí son factores de virulencia en otras numerosas especies de *Vibrio* (Frederiksen *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015; Yang y Defoirdt, 2015). La actividad QQ de *hqiA* también se verificó en las bacterias fitopatógenas productoras de AHLs *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225<sup>T</sup> y *Agrobacterium fabrum* C58 (Fuqua y Winans, 1994; Piper *et al.*, 1999). En el caso de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* también se demostró que la expresión de *hqiA* influía distintos fenotipos regulados por QS, como enzimas de maceración o la motilidad, que se inhibían o perturbaban, confirmando así resultados previos de otros estudios (Pirhonen *et al.*, 1993; Carlier *et al.*, 2003; Smadja *et al.*, 2004; Cui y Harling, 2005; Uroz *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2010).

También se evaluó la actividad de la enzima purificada HqiA mediante su adición a cultivos puros de los patógenos marinos *V. mediterranei* VibC-Oc-97 y *V. owensii* VibC-Oc-106. Aunque los resultados de interrupción de la patogenicidad gracias a la expresión de *hqiA* o a la adición de HqiA son similares a los obtenidos en otros estudios con otras enzimas lactoneras como AiiA, AttM, AidH, QlcA o QsdA, se abren nuevas perspectivas en términos de diversidad de enzimas (Dong *et al.*, 2000; Carlier *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2008). Además, el uso conjunto de enzimas degradadoras de AHLs diferentes puede ser una buena estrategia para combatir de forma efectiva a las bacterias patógenas.

Aunque se han descrito enzimas QQ de tipo lactonasa en otros microorganismos extremófilos, como en las arqueas termófilas e hipertermófilas *Geobacillus kaustophilus*, *Sulfolobus islandicus*, *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* y *Vulcanisaeta moutnovskia* (Hiblot *et al.*, 2012, 2015; Xue *et al.*, 2013; Bzdrenga *et al.*, 2014) y en *Deinococcus radiodurans*, una bacteria muy resistente a la radiación (Koch *et al.*, 2014), este trabajo es la primera descripción de una enzima degradadora de AHLs en un ambiente hipersalino, probablemente perteneciente a una bacteria halófila. La caracterización genética y química de este clon ha permitido la identificación de una nueva clase de enzimas degradadoras de AHLs (*hqiA*) no relacionadas con otros tipos de enzimas descritos

previamente. Futuros ensayos son necesarios para demostrar su función biológica y para determinar si las AHLs son su sustrato real o no.



## **5. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

1. El ambiente marino es una fuente abundante de microorganismos con actividad quorum quenching. De los 596 aislados procedentes de criaderos de peces y moluscos de Lugo y Granada, 22 cepas, en su mayoría pertenecientes a las familias *Alteromonadaceae* y *Pseudoalteromonadaceae*, presentan una elevada capacidad para degradar tanto moléculas AHLs sintéticas como las producidas por bacterias. Las cepas PP2-663 y PQQ-42 se han ensayado en experimentos *in vivo* con moluscos y corales y han interferido la virulencia de patógenos controlada por AHLs, por lo que podrían utilizarse en el futuro en el sector de la acuicultura. En este trabajo se describen por primera vez las moléculas AHLs producidas por tres de estos patógenos y su correlación con posibles factores de virulencia.

2. En los suelos salinos, la presencia de enzimas quorum quenching es poco frecuente. La construcción de una librería metagenómica de un suelo salino de Rambla Salada y el análisis de 250.000 clones han permitido la identificación de un único clon con actividad quorum quenching. La caracterización de dicho clon ha permitido la identificación de una nueva familia de enzimas degradadoras de AHLs no relacionadas con las enzimas descritas previamente. La enzima identificada se ha ensayado *in vivo* frente a bacterias patógenas de los sectores de la acuicultura y de la agricultura, y debido a su elevada actividad quorum quenching posee numerosas potenciales aplicaciones biotecnológicas.



## Conclusions

**1. The marine environment is an abundant source of microorganisms with quorum quenching activity. Of the 596 isolates studied, 22 strains have shown a high capacity to degrade both synthetic AHL-type signal molecules and natural AHLs produced by pathogenic bacteria, whose molecules and correlated phenotypes have been described for the first time in this work. In the screenings carried out in the hatcheries in Lugo and Granada (Spain), most of the selected strains belong to the families Alteromonadaceae and Pseudoalteromonadaceae. Strains PP2-663 and PQQ-42 have been tested in vivo with mollusks and corals and have interfered with the AHL-controlled virulence of marine pathogenic bacteria. Therefore, these strains could be used in the future in the aquaculture sector.**

**2. In saline soils, the presence of quorum quenching enzymes is rare. The construction and the testing of 250,000 clones of a metagenomic library of a saline soil sample taken in Rambla Salada (Spain) have allowed the identification of a single clone with quorum quenching activity. However, the characterization of this clone has allowed the identification of a new family of AHL-degrading enzymes not related to previously described enzymes. The enzyme identified has been tested in vivo against pathogenic bacteria of the aquaculture and agriculture sectors, and due to its high quorum quenching activity it has numerous potential biotechnological applications.**



## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S., Al-Fori, M., Gunasekera, S.P., Sudesh, K., and Paul, V.J. (2013) Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 759–772.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., and Barton, M.D. (2006) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1103–1113.
- Al-Amoudi, S., Essack, M., Simões, M.F., Bougouffa, S., Soloviev, I., Archer, J.A.C., et al. (2016) Bioprospecting Red sea coastal ccosystems for culturable microorganisms and their antimicrobial potential. *Mar. Drugs* **14**: 1–14.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Austin, B. and Zhang, X.H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 119–124.
- Balado, M., Souto, A., Vences, A., Careaga, V.P., Valderrama, K., Segade, Y., et al. (2015) Two catechol siderophores, acinetobactin and amonabactin, are simultaneously produced by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* sharing part of the biosynthetic pathway. *ACS Chem. Biol.* **10**: 2850–2860.
- Bar-Rogovsky, H., Hugenmatter, A., and Tawfik, D.S. (2013) The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J. Biol. Chem.* **288**: 23914–23927.
- Barbey, C., Crepin, A., Bergeau, D., Ouchiha, A., Mijouin, L., Taupin, L., et al. (2013) *In planta* biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* involves silencing of pathogen communication by the Rhodococcal gamma-lactone catabolic pathway. **8**: 1–9.
- Barr, H.L., Halliday, N., Cámara, M., Barrett, D.A., Williams, P., Forrester, D.L., et al. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **46**: 1046–1054.
- Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. (1993) Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. (eds) Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., and Rosenberg, E. (2003) Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4236–4242.
- Besemer, J. and Borodovsky, M. (2005) GeneMark: web software for

- gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* **33**: 451–454.
- Bhargava, N., Sharma, P., and Capalash, N. (2010) Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**: 349–360.
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., and Streit, W.R. (2011) BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on *N*-acylhomoserine lactones. *J. Biotechnol.* **155**: 86–94.
- Bjarnsholt, T., van Gennip, M., Jakobsen, T.H., Christensen, L.D., Jensen, P.Ø., and Givskov, M. (2010) *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect. *Nat. Protoc.* **5**: 282–293.
- Bokhove, M., Nadal Jimenez, P., Quax, W.J., and Dijkstra, B.W. (2010) The quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 686–691.
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., et al. (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**: 2897–2912.
- Bozec, Y.-M. and Mumby, P.J. (2014) Synergistic impacts of global warming on the resilience of coral reefs. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**: 20130267–20130267.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brandwein, M., Al-Quntar, A., Goldberg, H., Mosheyev, G., Goffer, M., Marin-Iñiesta, F., et al. (2016) Mitigation of biofilm formation on corrugated cardboard fresh produce packaging surfaces using a novel thiazolidinedione derivative integrated in acrylic emulsion polymers. *Front. Microbiol.* **7**: 1–9.
- Brown, C. and Tettelbach, L. (1988) Characterization of a nonmotile *Vibrio* sp. pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **74**: 195–204.
- Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L., and Gram, L. (2005) Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Organ.* **65**: 43–52.
- Buchholtz, C., Nielsen, K.F., Milton, D.L., Larsen, J.L., and Gram, L. (2006) Profiling of acylated homoserine lactones of *Vibrio anguillarum* *in vitro* and *in vivo*: influence of growth conditions and serotype. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 433–445.
- Bullock, W., Fernandez, J., and Stuart, J. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**.
- Bzdrenga, J., Daudé, D., Rémy, B., Jacquet, P., Plener, L., Elias, M., and

- Chabrière, E. (2016) Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chem. Biol. Interact.*
- Bzdrenga, J., Hiblot, J., Gotthard, G., Champion, C., Elias, M., and Chabrière, E. (2014) SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase. *BMC Res. Notes* **7**: 333.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Döllz, H., Millanao, A., and Buschmann, A.H. (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* **15**: 1917–1942.
- Cao, Y., He, S., Zhou, Z., Zhang, M., Mao, W., Zhang, H., and Yao, B. (2012) Orally administered thermostable *N*-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 1899–1908.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., and Faure, D. (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4989–4993.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Chakrabarty, P., and Chatterjee, A.K. (2010) Regulation of motility in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: quorum-sensing signal controls FlhDC, the global regulator of flagellar and exoprotein genes, by modulating the production of RsmA, an RNA-binding protein. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **23**: 1316–1323.
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., and Yao, B. (2010) High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microb. Cell Fact.* **9**: 39.
- Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 3672–3676.
- Chong, T.M., Koh, C.L., Sam, C.K., Choo, Y.M., Yin, W.F., and Chan, K.G. (2012) Characterization of quorum sensing and quorum quenching soil bacteria isolated from Malaysian tropical montane forest. *Sensors* **12**: 4846–4859.
- Chow, J.Y., Yang, Y., Tay, S.B., Chua, K.L., and Yew, W.S. (2014) Disruption of biofilm formation by the human pathogen *Acinetobacter baumannii* using engineered quorum-quenching lactonases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 1802–1805.
- Chu, W., Zhou, S., Zhu, W., and Zhuang, X. (2014) Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Sci. Rep.* **4**: 5446.
- Chung, W.O., Park, Y., Lamont, R.J., McNab, R., Barbieri, B., and

- Demuth, D.R. (2001) Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a luxS protein. *J. Bacteriol.* **183**: 3903–3909.
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., and Faure, D. (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ. Microbiol.* **9**: 1511–1522.
- de Cleene, M. (1979) Crown gall: economic importance and control. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss* **134**: 551–554.
- Croxatto, A., Pride, J., Hardman, A., Williams, P., Cámara, M., and Milton, D. (2004) A distinctive dual-channel quorum sensing system operates in *Vibrio anguillarum*. *Mol. Microbiol.* **52**: 1677–1689.
- Cui, X. and Harling, R. (2005) *N*-acyl-homoserine lactone-mediated quorum sensing blockage, a novel strategy for attenuating pathogenicity of Gram-negative bacterial plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **111**: 327–339.
- Defoirdt, T., Boon, N., and Bossier, P. (2010) Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog.* **6**: 1–6.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., and Verstraete, W. (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: An unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**: 69–88.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2008) Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J.* **2**: 19–26.
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2006) Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6419–6423.
- Defoirdt, T., Miyamoto, C.M., Wood, T.K., Meighen, E.A., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2007) The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environ. Microbiol.* **9**: 2486–2495.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 251–258.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J.J., Kim, J., et al. (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.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., and Paul, V. (2011) Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**: 893–905.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., and Paul, V. (2009) Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**: 413–427.

- Dong, Y., Gusti, A., Zhang, Q., Xu, J., and Zhang, L. (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1754–1759.
- Dong, Y., Wang, L., and Zhang, L. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**: 1201–1211.
- Dong, Y., Xu, J., Li, X., and Zhang, L. (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3526–3531.
- Dong, Y. and Zhang, L. (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* **43**: 101–109.
- Eberl, L. (2006) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 103–110.
- Elston, R. (1984) Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *J World Maricul Soc* **15**: 284–300.
- Espada, A., Anta, C., Bragado, A., Rodríguez, J., and Jiménez, C. (2011) An approach to speed up the isolation of hydrophilic metabolites from natural sources at semipreparative level by using a hydrophilic-lipophilic balance/mixed-mode strong cation exchange-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry system. *J. Chromatogr. A* **1218**: 1790–1794.
- FAO, O. de las N.U. para la A. y la A. (2016) El Estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A., and Guiliani, N. (2005) Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7033–7040.
- Felix, K.C. da S., Oliveira, W.J. de, Mariano, R. de L.R., and Souza, E.B. de (2014) Lettuce genotype resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Sci. Agric.* **71**: 287–291.
- Foti, M., Sorokin, D.Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E.E., Pimenov, N. V., et al. (2007) Diversity, activity and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2093–2100.
- Frederiksen, R.F., Paspaliari, D.K., Larsen, T., Storgaard, B.G., Larsen, M.H., Ingmer, H., et al. (2013) Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology* **159**: 833–847.
- Frias, J., Olle, E., and Alsina, M. (2001) Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Society* **69**: 3431–3434.
- Fuqua, W., Parsek, M., and Greenberg, E. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439–468.
- Fuqua, W. and Winans, S. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence

- of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**: 2796–2806.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**: 269–275.
- Gao, F. and Zhang, C. (2006) GC-Profile: a web-based tool for visualizing and analyzing the variation of GC content in genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**: 686–691.
- García-Aljaro, C., Vargas-Cespedes, G.J., and Blanch, A.R. (2012) Detection of acylated homoserine lactones produced by *Vibrio* spp. and related species isolated from water and aquatic organisms. *J. Appl. Microbiol.* **112**: 383–389.
- García-Contreras, R., Maeda, T., and Wood, T.K. (2016) Can resistance against quorum-sensing interference be selected? *ISME J.* 1–7.
- García-Contreras, R., Maeda, T., and Wood, T.K. (2013) Resistance to quorum-quenching compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 6840–6846.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., et al. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bact.* **178**: 6618–6622.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., Decker, S. de, Saulnier, D., and Roux, F. le (2006) Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 570–580.
- González, J.E. and Keshavan, N.D. (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 859–875.
- Goulden, E.F., Hall, M.R., Bourne, D.G., Pereg, L.L., and Høj, L. (2012) Pathogenicity and infection cycle of *Vibrio owensii* in larviculture of the ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*). *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2841–2849.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 221–224.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., and Faure, D.D. (2015) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**: 86–116.
- Grover, N., Plaks, J.G., Summers, S.R., Chado, G.R., Schurr, M.J., and Kaar, J.L. (2016) Acylase-containing polyurethane coatings with anti-biofilm activity. *Biotechnol. Bioeng.* **113**: 2535–2543.
- Gupta, P., Chhibber, S., and Harjai, K. (2015) Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns* **41**: 153–162.
- Gutierrez, J. and Crowder, T. (2009) Transition state analogues of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 251–257.
- Hada, H.S., West, P. a., Lee, J. V., Stemmler, J., and Colwell, R.R.

- (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 1–4.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 384–397.
- He, Z., Liang, J., Tang, Z., Ma, R., Peng, H., and Huang, Z. (2015) Role of the *luxS* gene in initial biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 60–68.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., et al. (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**: 232–237.
- Helman, Y. and Chernin, L. (2015) Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 316–329.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., et al. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**: 87–102.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. (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.
- Hiblot, J., Bzdrenga, J., Champion, C., Chabriere, E., and Elias, M. (2015) Crystal structure of VmoLac, a tentative quorum quenching lactonase from the extremophilic crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia*. *Sci. Rep.* **5**: 8372.
- Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., and Elias, M. (2012) Structural and Enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*. *PLoS One* **7**.
- Higgins, D.A., Pomianek, M.E., Kraml, C.M., Taylor, R.K., Semmelhack, M.F., and Bassler, B.L. (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**: 883–886.
- Hoang, H.H., Gurich, N., and González, J.E. (2008) Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **190**: 861–871.
- Hoegh-Guldberg, O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshw. Res.* **50**: 839.
- Holden, M.T.G., Chhabra, S.R., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N.J., Hill, P.J., et al. (1999) Quorum-sensing cross talk: Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **33**: 1254–1266.

- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J.M., et al. (2014) Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One* **9**: 1–8.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., and Leadbetter, J.R. (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil *Pseudomonas* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5941–5949.
- Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu, P., Shen, J., Shao, Z., and Liu, Z. (2012) QsdH, a novel AHL lactonase in the RND-type inner membrane of marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* strain 1A01261. *PLoS One* **7**: 1–12.
- Ivanova, K., Fernandes, M.M., Francesko, A., Mendoza, E., Guezguez, J., Burnet, M., and Tzanov, T. (2015) Quorum-quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**: 27066–27077.
- Izzati Mohamad, N., Yin, W., and Chan, K. (2015) Whole-genome sequence of quorum-sensing *Vibrio tubiashii* strain T33. *Genome Announc.* **3**: e01362-14-e01362-14.
- Jayaraman, A. and Wood, T.K. (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**: 145–167.
- Jeffrey, S. and Humphrey, G. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz* **167**: 191–194.
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F., and Guse, D.G. (1957) Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.* **73**: 590–591.
- Kalia, V.C. and Purohit, H.J. (2011) Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**: 121–140.
- Kalia, V.C., Wood, T.K., and Kumar, P. (2014) Evolution of Resistance to Quorum-Sensing Inhibitors. *Microb. Ecol.* **68**: 13–23.
- Kaur, G., Rajesh, S., and Princy, S.A. (2015) Plausible drug targets in the *Streptococcus mutans* quorum sensing pathways to combat dental biofilms and associated risks. *Indian J. Microbiol.* **55**: 349–356.
- Kievit de, T. and Iglewski, B. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**: 4839–4849.
- Kim, J.H., Choi, D.C., Yeon, K.M., Kim, S.R., and Lee, C.H. (2011) Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 1601–1607.
- Kim, O., Cho, Y., Lee, K., Yoon, S., Kim, M., Na, H., et al. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 716–721.

- Kiran, S., Sharma, P., Harjai, K., and Capalash, N. (2011) Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Microbiol.* **3**: 1–12.
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2014) *Deinococcus radiodurans* can interfere with quorum sensing by producing an AHL-acylase and an AHL-lactonase. *FEMS Microbiol. Lett.* **356**: 62–70.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., and Rosenberg, E. (2001) *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1383–1388.
- Kushner, D. and Kamekura, M. (1988) Physiology of halophilic bacteria. In, Rodriguez-Valera, F. (ed), *Halophilic bacteria*. Boca Raton: CRC Press, pp. 109–138.
- Labh, S.N. and Shakya, S.R. (2014) Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* **2**: 153–156.
- Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. (2014) Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int. J. Biol. Sci.* **10**: 550–565.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., et al. (2015) Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci* **7**: 471–496.
- Lagana, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zaccone, R., and Delia, S. (2011) Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from italian aquaculture farms. *New Microbiol.* **34**: 53–63.
- Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In, Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, UK, pp. 115–148.
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., et al. (2011) Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.* **3**: 762–781.
- Lawyer, F., Stoffel, S., Saiki, R., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D. (1989) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* **264**: 6427–6437.
- Leadbetter, J.R. and Greenberg, E.P. (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 6921–6926.
- Litwin, C.M., Rayback, T.W., and Skinner, J. (1996) Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect. Immun.* **64**: 2834–2838.
- Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Gronquist, M., Eberhard, A., and 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.
- Lotz, M., Tamplin, M., and Rodrick, G. (1983) Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Ann Clin Lab Sci* **13**: 45–48.
- Lowery, C. a, Dickerson, T.J., and Janda, K.D. (2008) Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chem. Soc. Rev.* **37**: 1337–1346.
- Luppy, C. and Ruby, E.G. (2005) *Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization. **187**: 3620–3629.
- Luque, R., González-Domenech, C.M., Llamas, I., Quesada, E., and Béjar, V. (2012) Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles* **16**: 205–213.
- Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L.R., Tomás, M., and Wood, T.K. (2012) Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J.* **6**: 493–501.
- Manefield, M., de Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, M., Peter, S., and Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145**: 283–291.
- Manefield, M., Rasmussen, T., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., and Givskov, M. (2002) Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**: 1119–1127.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 614–629.
- Marketon, M.M. and Gonzalez, M.M. (2002) Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *Society* **184**: 3466–3475.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 208–212.
- Martín-Platero, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and 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., and Quesada, E. (2004) *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wildfowl reserve in Malaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1329–32.
- Martínez-Checa, F., Oueriaghli, N., Gonzalez-Domenech, C.M., Muyzer, G., Ventosa, A., Quesada, E., and Béjar, V. (2013) Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment in the southeast of Spain.

- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., et al. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. *Microbiology* **143**: 3703–3711.
- McHugh, M.L. (2011) Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem. Medica* 203–209.
- Mei, G., Yan, X., Turak, A., Luo, Z., and Zhang, L. (2010) AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel *N*-acylhomoserine lactonase. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4933–4942.
- Miller, V.L. and 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**: 2575–83.
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M., and 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., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* **179**: 3004–3012.
- Mizuno, C.M., Kimes, N.E., López-Pérez, M., Ausó, E., Rodríguez-Valera, F., and Ghai, R. (2013) A hybrid NRPS-PKS gene cluster related to the bleomycin family of antitumor antibiotics in *Alteromonas macleodii* strains. *PLoS One* **8**: 1–12.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangl, J.L., and Grant, S.R. (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **15**: 363–371.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., and Défago, G. (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 71–81.
- Montgomery, K., Charlesworth, J.C., LeBard, R., Visscher, P.T., and Burns, B.P. (2013) Quorum sensing in extreme environments. *Life* **3**: 131–148.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. (2008) *N*-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**: 124–130.
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., and Ikeda, T. (2008) Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactonase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem.* **72**: 1887–93.
- Mourey, A. and Kilbertus, G. (1976) Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. Appl. Bacteriol.* **40**: 47–51.
- Nagel, K., Schneemann, I., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., and Imhoff, J. (2012) Beneficial effects of 2,4-diacetylphloroglucinol- producing pseudomonads on the marine alga *Saccharina latissima*. *Aquat. Microb. Ecol.* **67**: 239–249.
- Nahn, D., Cam, D., Wille, M., Defoirdt, T., Bossier, P., and Sorgeloos, P. (2010) Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1007–1016.
- Naik, K. and Kowshik, M. (2014) Anti-quorum sensing activity of AgCl-TiO<sub>2</sub> nanoparticles with potential use as active food packaging material. *J. Appl. Microbiol.* **117**: 972–983.
- Nakai, T. and Park, S.C. (2002) Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.* **153**: 13–18.
- Nasuno, E., Kimura, N., Fujita, M.J., Nakatsu, C.H., Kamagata, Y., and Hanada, S. (2012) Phylogenetically novel LuxI / LuxR-type quorum sensing systems isolated using a metagenomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 8067–8074.
- Natrah, Fm., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2011) Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **13**: 109–126.
- Nealson, K., Platt, T., and Hastings, J. (1970) Cellular control of synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**: 313–322.
- Nealson, K.H. and Hastings, J.W. (2006) Quorum sensing on a global scale: Massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2295–2297.
- Ng, F.S.W., Wright, D.M., and Seah, S.Y.K. (2011) Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 1181–1186.
- Nhan, D.T., Cam, D.T.V., Wille, M., Defoirdt, T., Bossier, P., and Sorgeloos, P. (2010) Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1007–1016.
- Nichols, D. (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 351–357.
- Nikapitiya, C. (2012) Bioactive secondary metabolites from marine microbes for drug discovery. *Adv. Food Nutr. Res.* **65**: 363–87.
- O'Toole, G. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449–461.

- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L., and Mah, R. a (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**: 27–38.
- Ortori, C.A., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., and 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.
- Osorio, C.R., Rivas, A.J., Balado, M., Fuentes-Monteverde, J.C., Rodríguez, J., Jiménez, C., et al. (2015) A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 5867–5879.
- Oueriaghli, N., Béjar, V., Quesada, E., and Martínez-Checa, F. (2013) Molecular ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities within the athalassohaline environment of Rambla Salada, Spain. *Microb. Ecol.* **66**: 297–311.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., et al. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* **42**: 206–214.
- Paillard, C., Le Roux, F., and Borrego, J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**: 477–498.
- Papaioannou, E., Wahjudi, M., Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Setroikromo, R., and Quax, W.J. (2009) Quorum-quenching acylase reduces the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4891–4897.
- Park, S., Kang, H., Jang, H., Koo, B., Yum, D., Park, S., et al. (2005) Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2632–2641.
- Park, S., Lee, S., Oh, T., Oh, J., Koo, B., Yum, D., and Lee, J. (2003) AhID, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**: 1541–1550.
- Parkinson, J.S. (1976) *CheA*, *cheB*, and *cheC* genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis. *J. Bacteriol.* **126**: 758–770.
- Parkinson, J.S. (1978) Complementation analysis and deletion mapping of *Escherichia coli* mutants defective in chemotaxis. *J. Bacteriol.* **135**: 45–53.
- Parks, T., Leuther, K., Howard, E., Johnston, S., and Dougherty, W. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem.* **216**: 413–417.
- Parnell, J., Rompato, G., Latta IV, L.C., Pfrender, M.E., van Nostrand, J.D., He, Z., et al. (2010) Functional biogeography as evidence of

- gene transfer in hypersaline microbial communities. *PLoS One* **5**:
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 4360–5.
- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E., and Ladner, J.E. (2003) Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry* **42**: 5684–5693.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L., and Fernández, F. (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* **70**: 127–131.
- Pickett, M.J., Greenwood, J.R., and Harvey, S.M. (1991) Tests for detecting degradation of gelatin: Comparison of five methods. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2322–2325.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **17**: 362–370.
- Piper, K.R., Beck Von Bodman, S., Hwang, I., and Farrand, S.K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1077–1089.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and 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.
- Ploeg, J.R. Van Der (2005) Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J. Bacteriol.* **187**: 3980–3989.
- Pöllumaa, L., Alamäe, T., and Mäe, A. (2012) Quorum sensing and expression of virulence in *Pectobacteria*. *Sensors* **12**: 3327–3349.
- Popat, R., Crusz, S. a., Messina, M., Williams, P., West, S. a., and Diggle, S.P. (2012) Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**: 4765–4771.
- Prado, S., Montes, J., Romalde, J.L., and Barja, J.L. (2009) Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *Int. Microbiol.* **12**: 107–114.
- Prado, S., Romalde, J., Montes, J., and Barja, J. (2005) Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Organ.* **67**: 209–215.
- Quesada, E., Bejar, V., and Calvo, C. (1993) Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* **49**: 1037–1041.
- Quiñones, B., Dulla, G., and Lindow, S.E. (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **18**: 682–693.
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W., Ekmann, K., Larsen,

- J., et al. (2004) An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 350–359.
- Rasko, D.A. and Sperandio, V. (2010) Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 117–128.
- Rémy, B., Plener, L., Elias, M., Daudé, D., and Chabrière, E. (2016) Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques? *Ann. Pharm. Françaises* **74**: 413–420.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2008) A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ. Microbiol.* **10**: 560–570.
- Rodriguez-Valera, F. (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In, Rodriguez-Valera, F. (ed), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press, pp. 3–30.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., and Ramos-Cormenzana, A. (1981) Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb. Ecol.* **7**: 235–243.
- Romero, M., Acuña, L., and Otero, A. (2012) Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Pat. Biotechnol.* **6**: 2–12.
- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Cámara, M., and Otero, A. (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol. Lett.* **280**: 73–80.
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A.B., and Otero, A. (2012) Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 6345–6348.
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A.B., Roca-Rivada, A., Cabello, A.M., and Otero, A. (2011) Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 205–217.
- Romero, M., Muras, A., Mayer, C., Buján, N., Magariños, B., and Otero, A. (2014) *In vitro* quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. *Dis. Aquat. Organ.* **108**: 217–225.
- Romero, M., Ruben Avendaño-Herrera, Magariños, B., Cámara, M., and Otero, A. (2010) Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**: 131–139.
- Rosenberg, E. and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 143–159.
- Rosenberg, E., Kushmaro, A., Kramarsky-Winter, E., Banin, E., and

- Yossi, L. (2009) The role of microorganisms in coral bleaching. *ISME J.* **3**: 139–146.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., et al. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol.* **5**: 398–431.
- Rusnak, F., Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G.A., and Walsh, C.T. (1990) Subcloning of the enterobactin biosynthetic gene *entB*: expression, purification, characterization and substrate specificity of isochorismatase. *Biochemistry* **29**: 1425–1435.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (80-. ). **239**: 487–91.
- Sakai, T., Hirae, T., Yuasa, K., Kamaishi, T., Matsuyama, T., Miwa, S., et al. (2007) Mass mortality of cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*. *Fish Pathol.* **42**: 141–147.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandoz, K.M., Mitzimberg, S.M., and Schuster, M. (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 15876–81.
- Scharf, B.E., Hynes, M.F., and Alexandre, G.M. (2016) Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Mol. Biol.* **90**: 549–559.
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., and Streit, W.R. (2009) Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 224–233.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., and Hertel, W.M. (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**: 87–98.
- Seemann, T. (2014) Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**: 2068–2069.
- Sewald, X., Saum, S., Palm, P., Pfeiffer, F., Oesterheld, D., and Muller, V. (2007) Autoinducer-2-producing protein LuxS, a novel salt- and chloride-induced protein in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 371–379.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K. (1997) Detecting and characterizing *N*-acylhomoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6036–41.
- Shepherd, R.W. and Lindow, S.E. (2009) Two dissimilar *N*-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 45–53.
- Sievers, F. and Higgins, D. (2014) Clustal Omega, accurate alignment of

- very large numbers of sequences.
- Singh, B.N., Upreti, D.K., Singh, B.R., Defoirdt, T., Gupta, V.K., De Souza, A.O., et al. (2016) Bactericidal, quorum quenching and anti-biofilm nanofactories: a new niche for nanotechnologists. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–16.
- Singh, N., Patil, A., Prabhune, A., Raghav, M., and Goel, G. (2016) Diverse profiles of *N*-acyl-homoserine lactones in biofilm forming strains of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence* 1–7.
- Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., et al. (2006) Quorum quenching by an *N*-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *74*: 1673–1682.
- Skerman, V., McGowan, V., and Sneath, P. (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **30**: 225–420.
- Skindersoe, M., Ettinger-Epstein, P Rasmussen, T., Bjarnsholt, T., de Nys, R., and Givskov, M. (2008) Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar Biotechnol* **10**: 56–63.
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., and Orange, N. (2004) Involvement of *N*-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **17**: 1269–1278.
- Smith, P. (2008) Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. Sci. Tech.* **27**: 243–264.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. (2000) VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J. Bacteriol.* **182**: 782–788.
- Steindler, L. and Venturi, V. (2007) Detection of quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**: 1–9.
- Sun, S., Tay, Q.X.M., Kjelleberg, S., Rice, S.A., and McDougald, D. (2015) Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* **9**: 1812–1820.
- Taga, M.E. and Bassler, B.L. (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100 Suppl**: 14549–14554.
- Tahrioui, A., Schwab, M., Quesada, E., and Llamas, I. (2013) Quorum sensing in some representative species of *Halomonadaceae*. *Life* **3**: 260–275.
- Tang, K., Zhang, Y., Yu, M., Shi, X., Coenye, T., Bossier, P., and Zhang, X. (2013) Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Sci. Rep.* **3**: 2935.
- Tannières, M., Beury-Cirou, A., Vigouroux, A., Mondy, S., Pellissier, F., Dessaux, Y., and Faure, D. (2013) A metagenomic study highlights phylogenetic proximity of quorum-quenching and xenobiotic-degrading amidases of the AS-family. *PLoS One* **8**:

- Tanwar, N., Singh, R.P., Das, A.K., and Gadhvi, I.K. (2013) The occurrence of bleaching stripe disease in *Gracilaria corticata* and controlling of the disease using quorum quenching approach. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: n/a-n/a.
- Teather, R.M. and Wood, P.J. (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 777–780.
- Thin, N., Yen, V., Dierckens, K., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2008) An acyl homoserine lactone-degrading microbial community improves the survival of first-feeding turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **285**: 56–62.
- Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2008) A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* **10**: 1–12.
- Tommonaro, G., Abbamondi, G.R., Iodice, C., Tait, K., and De Rosa, S. (2012) Diketopiperazines produced by the halophilic archaeon *Haloterrigena hispanica* activate AHL bioreporters. *Microb. Ecol.* **63**: 490–495.
- Tommonaro, G., Abbamondi Gennaro, R., Toksoy Oner, E., and Nicolaus, B. (2015) Investigating the quorum sensing system in halophilic bacteria., pp. 189–207.
- Toranzo, A., Magariños, B., and Romalde, J. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquac. Ann Rev Fish Dis Spec. Issue* **246**: 37–61.
- Toranzo, A.E. and Barja, J. (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Norwest of Spain. *Dis. Aquat. Organ.* **9**: 73–82.
- Torres, M., Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., and Llamas, I. (2013) *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures. *Microbiol. Res.* **168**: 547–554.
- Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A.A., Quesada, E., and Llamas, I. (2016) Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture. *Front. Microbiol.* **7**:646.
- Tubiash, H. and Otto, S. (1986) Bacterial problems in oysters. Pathology in marine aquaculture. *EAS spec. pub.* **9**: 232–242.
- Uchiyama, T. and Miyazaki, K. (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 616–622.
- Uroz, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., and 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., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., et al. (2003) Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**: 1981–1989.
- Uroz, S., Dessaux, Y., and Oger, P. (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the Yin and Yang of bacterial communication. *ChemBioChem* **10**: 205–216.
- Uroz, S. and Heinonsalo, J. (2008) Degradation of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 271–278.
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.T., Faure, D., and Dessaux, Y. (2008) A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1357–1366.
- Ushijima, B., Smith, A., Aeby, G.S., and Callahan, S.M. (2012) *Vibrio owensii* induces the tissue loss disease Montipora white syndrome in the Hawaiian reef coral *Montipora capitata*. *PLoS One* **7**: e46717.
- Venturi, V., Venuti, C., Devescovi, G., Lucchese, C., Friscina, A., Degrassi, G., et al. (2004) The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules *in vitro* and *in planta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**: 179–183.
- Vera, H. and Power, D. (1980) Culture media. In, *Lennette E H, Ballows A, Housler W J Jr, Shadomy H J, editors. Manual of clinical microbiology.*, pp. 965–999.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 655–671.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**: 3–11.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., Thomas, S., Spiers, A.J., and Shanthi, S. (2014) Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation *in vitro* and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Mar. Biotechnol.* **16**: 707–715.
- Wang, T., Guan, W., Huang, Q., Yang, Y., Yan, W., Sun, B., and Zhao, T. (2016) Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac-5 of *Acidovorax citrulli*. *Microb. Pathog.* **100**: 133–140.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Brucoleri, R., et al. (2015) AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **43**: W237–W243.
- Weerasekara, N.A., Choo, K.H., and Lee, C.H. (2016) Biofouling control: bacterial quorum quenching *versus* chlorination in membrane bioreactors. *Water Res.* **103**: 293–301.
- Wilkinson, W. (2008) Status of coral reefs of the world Reef,G.C.R.M.N.

- and Centre, and R.R. (eds) Townsville, Australia.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Cámara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**: 1119–1134.
- Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C., Allen, H.K., and Handelsman, J. (2005) Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6335–6344.
- Woodcock, D., Crowther, P., Doherty, J., Jefferson, S., De Cruz, E., Noyer-Weidner, M., et al. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469–3478.
- Wu, Y., Cheng, C., and Li, Y. (2009) Cloning and expression of chitinase A from *Serratia marcescens* for large-scale preparation of *N,N*-diacetyl chitobiose. *J. Chinese Chem. Soc.* **56**: 688–695.
- Xavier, K.B. and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 191–197.
- Xue, B., Chow, J.Y., Baldansuren, A., Yap, L.L., Gan, Y.H., Dikanov, S.A., et al. (2013) Structural evidence of a productive active site architecture for an evolved quorum-quenching GKL lactonase. *Biochemistry* **52**: 2359–2370.
- Yang, Q. and Defoirdt, T. (2015) Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environ. Microbiol.* **17**: 960–968.
- Yang, Q., Han, Y., and Zhang, X.H. (2011) Detection of quorum sensing signal molecules in the family *Vibrionaceae*. *J. Appl. Microbiol.* **110**: 1438–1448.
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., et al. (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **70**: 5635–5646.
- Yeon, K.M., Lee, C.H., and Kim, J. (2009) Magnetic enzyme carrier for effective biofouling control in the membrane bioreactor based on enzymatic quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 7403–7409.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**: 1447–1459.
- Yu, M., Tang, K., Liu, J., Shi, X., Gulder, T.A.M., and Zhang, X.H. (2013) Genome analysis of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 reveals various survival advantages in marine environment. *BMC Genomics* **14**: 707.
- Zhang, H., Wang, L., and Zhang, L. (2002) Genetic control of quorum-

sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4638–43.

Zhang, L. (2003) Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* **8**: 238–244.