

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología



**Mecanismos de inhibición de *quorum sensing*:
estudio en la microbiota de invertebrados marinos
y análisis *in silico* en el medio ambiente**

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

José Carlos Reina Cabello
Tesis Doctoral, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Carlos Reina Cabello
ISBN: 978-84-1306-664-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63974>

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

Asimismo, durante la realización de la tesis doctoral, el Doctorando ha disfrutado de las siguientes becas o contratos:

Contrato: Formación de Profesorado Universitario (FPU15/01717)

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Duración: 31/10/2016 - Fecha de lectura de la tesis doctoral

Beca: Estancias breves en centros extranjeros

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Duración: 04/09/2017-01/11/2017

Lugar: Université Paris-SUD, Orsay, Francia

Beca: Movilidad Internacional para Estudiantes de Doctorado

Entidad financiadora: Universidad de Granada

Duración: 03/09/2018-30/11/2018

Lugar: San Diego State University, San Diego, California, Estados Unidos

Beca: Estancias breves en centros extranjeros

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Duración: 03/06/2019-30/09/2019

Lugar: University of Nottingham, Nottingham, Reino Unido

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados:

Título: A Quorum-Sensing inhibitor strain of *Vibrio alginolyticus* blocks QS-controlled phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*

Revista: Marine Drugs (Q1)

Volumen: 17

Páginas: E494

Año: 2019

Autores: José Carlos Reina; Ignacio Pérez-Victoria; Jesús Martín; Inmaculada Llamas

DOI: 10.3390/md17090494

Título: *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-degrading strains isolated from marine invertebrate microbiota attenuate the virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*

Revista: Marine Biotechnology (Q1)
Año: 2019
Volumen: 21
Páginas: 276-290
Autores: José Carlos Reina; Marta Torres; Inmaculada Llamas
DOI: 10.1007/s10126-019-09879-w

Del mismo modo, los resultados de la Tesis han sido presentados en las siguientes comunicaciones a Congresos:

Título: AhaP, una enzima *quorum quenching* adaptada al frío identificada en *Psychrobacter* sp. M9-54-1, aislada de la microbiota de pepinos de mar
Nombre del congreso: II Jornadas Jóvenes Investigadores Facultad de Farmacia
Tipo de aportación: Comunicación oral
Año: 2020
Lugar: Granada, España
Autores: José Carlos Reina

Título: El medio marino: una valiosa fuente de compuestos que inhiben los sistemas de comunicación y controlan las enfermedades bacterianas
Nombre del congreso: XXVII Congreso Nacional de Microbiología (SEM 2019)
Tipo de aportación: Comunicación tipo póster
Año: 2019
Lugar: Málaga, España
Autores: José Carlos Reina; Marta Torres; Inmaculada Llamas

Título: La microbiota de invertebrados marinos como fuente de enzimas *quorum quenching*
Nombre del congreso: XXVII Congreso Nacional de Microbiología (SEM 2019)
Tipo de aportación: Comunicación tipo póster
Año: 2019
Lugar: Málaga, España
Autores: Pedro Antonio Pérez; José Carlos Reina; Inmaculada Llamas

Título: Moléculas inhibitoras de QS identificadas a partir de *Vibrio alginolyticus* aislado de la microbiota de invertebrados marinos
Nombre del congreso: II Congreso/IV Jornadas de Investigadores en Formación Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI 2019)
Tipo de aportación: Comunicación tipo póster
Ámbito: Nacional
Año: 2019
Lugar: Granada, España
Autores: José Carlos Reina; Miguel Rodríguez; Ignacio Pérez-Victoria; Jesús Martín; Inmaculada Llamas

Título: Cepas aisladas de la microbiota de invertebrados marinos con actividad *quorum quenching* como herramientas de biocontrol en la lucha contra la vibriosis

Nombre del congreso: XVII Reunión del Grupo Especializado en Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad y XII del Grupo de Microbiología del Medio Acuático de la Sociedad Española de Microbiología

Tipo de aportación: Comunicación oral

Ámbito: Nacional

Año: 2018

Lugar: Sitges, España

Autores: José Carlos Reina; Marta Torres; Inmaculada Llamas

Título: Análisis de la abundancia de los sistemas *quorum sensing* y *quorum quenching* en metagenomas de diferentes ambientes marinos y terrestres

Nombre del congreso: I Congreso Nacional / III Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad

Tipo de aportación: Comunicación oral

Ámbito: Nacional

Año: 2018

Lugar: Granada, España

Autores: José Carlos Reina; Purificación López-García; Philippe Deschamps; Inmaculada Llamas

Título: Análisis de la abundancia de los sistemas *quorum sensing* y *quorum quenching* en 60 metagenomas ambientales

Nombre del congreso: XV Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos

Tipo de aportación: Comunicación oral

Ámbito: Nacional

Año: 2018

Lugar: Matalascañas, España

Autores: José Carlos Reina; Inmaculada Llamas

Título de la aportación: *Quorum sensing* inhibition mechanisms in sea anemones and holothurians microbiota

Nombre del congreso: FEMS 7TH Congress of European Microbiologists

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Ámbito: Internacional

Año: 2017

Lugar: Valencia, España

Autores: José Carlos Reina; Elisabeth León-Palmero; Jesús Martín; Ignacio Pérez-Victoria; José Fernando Reyes; Isabel Reche; Victoria Béjar; Inmaculada Llamas

Título de la aportación: Characterization of AHL-degrading enzymes found in *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from *Holothuria* spp. and *Anemonia sulcata*

Nombre del congreso: FEMS 7TH Congress of European Microbiologists

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Ámbito: Internacional

Año: 2017

Lugar: Valencia, España

Autores: José Carlos Reina; Jesús Martín; Ignacio Pérez-Victoria; José Fernando Reyes; Nazaret Ruiz; Victoria Béjar; Inmaculada Llamas

Título: Los animales invertebrados marinos como fuente de bacterias con actividades biológicas: identificación de cepas con actividad *quorum quenching*

Nombre del congreso: II Jornadas de Investigadores en Formación. Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI 2017)

Tipo de aportación: Comunicación oral

Ámbito: Nacional

Año: 2017

Lugar: Granada, España

Autores: José Carlos Reina; Inmaculada Llamas

Título de la aportación: Inhibición de *quorum sensing* por especies aisladas de la microbiota de anémonas y pepinos de mar.

Nombre del congreso: IV Workshop de Jóvenes Biotecnólogos

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Ámbito: Autonómico

Año: 2017

Lugar: Granada, España

Autores: José Carlos Reina; Jesús Martín; José Fernando Reyes; Ignacio Pérez-Victoria; Inmaculada Llamas

Título de la aportación: Sistemas de inhibición de la comunicación celular tipo *quorum sensing* presentes en la microbiota de animales pertenecientes a los filos *Cnidaria* y *Echinodermata*.

Nombre del congreso: XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos

Tipo de evento: Comunicación oral

Ámbito: Nacional

Año: 2016

Lugar: Alicante, España

Autores: José Carlos Reina; Elisabeth León-Palmero; Isabel Reche; Inmaculada Llamas; Emilia Quesada

**“Daría todo lo que sé por la
mitad de lo que desconozco”**
René Descartes, 1596-1650

Índice

Índice de Figuras	17
Índice de Tablas.....	21
Índice del Anexo.....	23
Abreviaturas	25
Resumen	27
Summary.....	29
1. Introducción	31
1.1. Sistemas <i>quorum sensing</i>.....	31
1.1.1. Definición de los sistemas <i>quorum sensing</i>	31
1.1.2. Tipos de moléculas autoinductoras	32
1.1.3. Funciones controladas por <i>quorum sensing</i>	35
1.1.4. Sistemas <i>quorum sensing</i> mediados por moléculas AHLs.....	36
1.1.5. Métodos de detección de sistemas <i>quorum sensing</i> mediados por AHLs: cepas bioindicadoras.....	38
1.2. Interferencia de sistemas <i>quorum sensing</i>	39
1.2.1. Concepto de interferencia de sistemas <i>quorum sensing</i>	39
1.2.2. Mecanismos de inhibición de <i>quorum sensing</i> no enzimáticos	40
1.2.3. Mecanismos de degradación enzimática de <i>quorum sensing</i> : <i>quorum quenching</i>	44
1.3. Medios salinos como fuente de moléculas con actividad biológica.....	48
1.3.1. Interés biotecnológico del medio salino	48
1.4. Aplicaciones biotecnológicas de la interferencia de <i>quorum sensing</i>.....	52
1.4.1. Acuicultura	52
1.4.2. Agricultura.....	54
1.4.3. Otras aplicaciones	55
2. Objetivos.....	61
3. Material y métodos	63
3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	63
3.2. Medios de cultivo	65
3.3. Antimicrobianos	68
3.4. Moléculas AHLs	69
3.5. Otras soluciones	69
3.6. Ensayo de antagonismo	72
3.7. Estudios de inhibición de sistemas <i>quorum sensing</i> mediante mecanismos no enzimáticos	72
3.7.1. Ensayos de la actividad inhibidora de sistemas <i>quorum sensing</i>	72
3.7.2. Obtención de extractos celulares y comprobación de la actividad inhibidora de <i>quorum sensing</i>	73
3.7.3. Fraccionamiento bioquímico de los extractos celulares mediante cromatografía e identificación de los compuestos activos.....	73
3.8. Estudios de la interferencia de <i>quorum sensing</i> mediante mecanismos enzimáticos: <i>quorum quenching</i>.....	74
3.8.1 Ensayo de difusión en placa para analizar la actividad <i>quorum quenching</i>	74
3.8.2. Determinación de actividad lactonasa	76
3.8.3. Localización de la actividad <i>quorum quenching</i>	76

3.8.4. Análisis de la actividad <i>quorum quenching</i> mediante HPLC/MS	77
3.9. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la interferencia de <i>quorum sensing</i>.....	77
3.9.1. Cocultivos <i>in vitro</i> de cepas que interfieren con sistemas <i>quorum sensing</i> y las bacterias patógenas .	77
3.9.2. Determinación de la expresión de características fenotípicas y factores de virulencia tras la pérdida de AHLs	78
3.9.3. Ensayos en tubérculos de patatas.....	79
3.9.4. Ensayos en artemias.....	80
3.10. Técnicas moleculares	80
3.10.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	80
3.10.2. Reacciones de PCR	81
3.10.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	83
3.10.4. Secuenciación de ADN	83
3.10.5. Identificación taxonómica.....	84
3.10.6. Otros programas bioinformáticos utilizados para determinar relaciones filogenéticas	84
3.10.7. Base de datos de tirosín-decarboxilasas	84
3.10.7. Digestión de ADN	85
3.10.8. Reacción de ligación de ADN y transformación bacteriana	85
3.10.9. Expresión y purificación de proteínas	86
3.10.10. Electroforesis en geles de proteínas	87
3.10.11. Cuantificación de la actividad <i>quorum quenching</i> usando biosensores de tipo <i>E. coli</i>	87
3.10.12. Determinación de las constantes catalíticas de enzimas <i>quorum quenching</i>	87
3.11. Técnicas metagenómicas y bioinformáticas	88
3.11.1. Metagenomas empleados.....	88
3.11.2. Bases de datos de proteínas <i>quorum quenching</i>	90
3.11.3. Análisis metagenómicos.....	92
4. Resultados.....	97
4.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de inhibir los sistemas <i>quorum sensing</i> mediante mecanismos no enzimáticos	97
4.1.1. Resumen/Summary.....	97
4.1.2. Selección de cepas productoras de compuestos inhibidores de <i>quorum sensing</i>	99
4.1.3. Caracterización de la cepa de <i>Vibrio alginolyticus</i> M3-10, inhibidora de <i>quorum sensing</i>	102
4.1.4. Discusión	115
4.2. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de inhibir los sistemas <i>quorum sensing</i> mediante enzimas <i>quorum quenching</i>	119
4.2.1. Resumen/Summary.....	119
4.2.2. Selección de cepas con actividad <i>quorum quenching</i>	121
4.2.3. Caracterización de las cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> con actividad <i>quorum quenching</i> ..	125
4.2.4. Caracterización de la cepa <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1 con actividad <i>quorum quenching</i>	135
4.2.5. Caracterización las bacterias con actividad <i>quorum quenching</i> pertenecientes a los géneros <i>Microbulbifer</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rheinheimera</i> , <i>Ruegeria</i> y <i>Pseudomonas</i>	144
4.2.6. Discusión	153
4.3. Análisis metagenómico de la abundancia de enzimas <i>quorum quenching</i>	161
4.3.1. Resumen/Summary.....	161
4.3.2. Análisis de la abundancia de las enzimas <i>quorum quenching</i> en 60 metagenomas pertenecientes a diversos ambientes naturales	163
4.3.3. Discusión	176
4.4. Caracterización del centro activo de enzimas <i>quorum quenching</i>	181
4.4.1. Resumen/Summary.....	181
4.4.2. Determinación de los aminoácidos esenciales para la actividad <i>quorum quenching</i> tipo lactonasa..	183

4.4.3. Discusión	190
5. Discusión	193
6. Conclusiones	197
6. Conclusions	199
7. Bibliografía	201
Anexo.....	233

Índice de Figuras

Figura 1. El calamar <i>E. scolopes</i> , en el que se describió la simbiosis con <i>A. fischeri</i> cuya bioluminiscencia dependía de QS.	32
Figura 2. Ejemplos de moléculas que pueden actuar como autoinductoras de QS.....	34
Figura 3. Esquema general del sistema QS mediado por AHLs.....	37
Figura 4. Esquema de los mecanismos de inhibición de QS.	40
Figura 5. Ejemplos de moléculas con actividad QSI.	43
Figura 6. Tipos de mecanismos de degradación enzimática (<i>quorum quenching</i>) de moléculas señal tipo AHL.	44
Figura 7. Ejemplos de compuestos QSIs obtenidos a partir de bacterias marinas.	50
Figura 8. Esquema del ensayo de inhibición de QS.....	73
Figura 9. Esquema del ensayo de QQ en placa petri.....	75
Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología seguida para la asignación taxonómica de cada uno de los homólogos.....	95
Figura 11. Screening de inhibición de sistemas QS en placa microtiter.....	99
Figura 12. Ensayo de inhibición del sistema QS de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 mediante difusión en placa.	100
Figura 13. Cromatografía <i>flash</i> de baja resolución llevada a cabo al extracto de <i>V. alginolyticus</i> M3-10.	104
Figura 14. Fraccionamiento mediante cromatografía semipreparativa HPLC de la unión de las fracciones 12 y 13 previamente obtenidas mediante cromatografía CombiFlash (A). Ensayo QSI con las fracciones 12, 13 y 14 (B).....	105
Figura 15. Estructura de las moléculas tiramina y <i>N</i> -acetiltiramina.	105
Figura 16. Crecimiento de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 en presencia de tiramina (verde) y <i>N</i> -acetiltiramina (azul).....	107
Figura 17. Actividad QSI de tiramina (verde) y <i>N</i> -acetiltiramina (azul) en la producción de violaceína en <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.	108
Figura 18. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en presencia de tiramina (verde) y <i>N</i> -acetiltiramina (azul).....	109
Figura 19. Actividad QSI de tiramina y <i>N</i> -acetiltiramina.....	110
Figura 20. Árbol filogenético neighbor-joining basado en los valores de ANIb de las distintas cepas de <i>V. alginolyticus</i>	113
Figura 21. Diagrama obtenido con BRIG de las secuencias cromosómicas de las cepas de <i>V. alginolyticus</i> más cercanas a M3-10, que han sido usadas como referencia..	114
Figura 22. Ejemplo de los resultados obtenidos en el ensayo QQ de difusión en placa con las cepas seleccionadas..	123
Figura 23. Determinación de la localización de la enzima QQ de M9-54-2 mediante ensayo de difusión en placa con C10-HSL.....	126
Figura 24. Amplificación mediante PCR del gen acilasa de la cepa M9-54-2 (A). Comprobación de la actividad QQ de los clones de <i>E. coli</i> que expresaban el gen acilasa de las cepas M3-1 (2), M3-13 (2) y M9-54-1 (3) (B).	127
Figura 25. Análisis filogenético de las enzimas degradadoras de AHLs detectadas en las cepas de <i>S. maltophilia</i> basado en las secuencias de aminoácidos usando el algoritmo neighbour-joining (A). Estructura propuesta de la acilasa de M9-54-2 de <i>S. maltophilia</i> , QuiP de <i>P. aeruginosa</i> y PvdQ de <i>P. aeruginosa</i> utilizando el programa Phyre2 (B).....	128
Figura 26. Análisis del tipo de enzima QQ de <i>E. coli</i> pGEMT::m9-54-2 a pH 7 y pH 2 frente a C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa (A) y mediante HPLC (B), en el que se expresa el área bajo la curva.	129
Figura 27. Efectos sobre la producción de AHLs y la movilidad tipo <i>swimming</i> de los patógenos <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225T y <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de la cepa <i>S. maltophilia</i> M9-54-2 con actividad QQ.	131
Figura 28. Ensayo en rodajas de patata infectadas con <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225T en ausencia y presencia de la cepa M9-54-2. A. <i>P. carotovorum</i> (1), <i>S. maltophilia</i> M9-54-2 (2), cocultivo de <i>P. carotovorum</i> y <i>S. maltophilia</i> M9-54-2 (3) y medio LB estéril (4) (A). Porcentaje de maceración en cada condición (B).....	133
Figura 29. Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>A. salina</i> tras 48 y 72h de incubación en cada condición.....	134
Figura 30. Degradación de AHLs comerciales a distintas temperaturas por parte de la cepa <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1.....	136

Figura 31. Análisis del tipo de enzima QQ de la cepa M9-54-1 a pH 7 y pH2 frente a C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa revelado con <i>C. violaceum</i> VIR07 (A) y mediante HPLC (B), en el que se expresa el área bajo la curva.	137
Figura 32. Detección de la actividad QQ de las proteínas 2034 y 322 expresadas en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	138
Figura 33. Árbol filogenético de la acilasa de <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1 comparada con otras acilasas (A). Estructura propuesta de la acilasa AhaP de <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1 comparada con la de PvdQ de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (B).	139
Figura 34. Actividad QQ de la acilasa AhaP expresada en pGEX4T-2 frente a distintas AHLs.	141
Figura 35. Efecto de la expresión de <i>ahaP</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1. Efecto sobre la movilidad tipo <i>swarming</i> (A). Efecto sobre la producción de luminescencia del biosensor <i>lecA::lux</i> en presencia de AHLs (B).	142
Figura 36. Degradación de extractos de AHLs naturales por parte de <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1.	143
Figura 37. Producción de AHLs (A) y gelatinasa (B) en <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193, así como supervivencia de nauplios de <i>A. salina</i> tras la infección con <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1 (C). 1. Monocultivo de <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193. 2. Cocultivo de <i>V. coralliilyticus</i> y <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1.	144
Figura 38. Detección de la producción de AHLs de tres cepas de vibrios patógenos en presencia y ausencia de bacterias QQ mediante ensayo de difusión en placa.	146
Figura 39. Efecto de las cepas QQ <i>A. junii</i> M2-40 y <i>R. aquimaris</i> M3-127 sobre la producción de amilasa (A) y de <i>P. pachastrellae</i> M2-35 y <i>M. echini</i> M3-111 sobre la producción de hemolisina (B) tras el cocultivo con <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193. Como controles se muestran los cultivos puros de cada cepa.	148
Figura 40. Efecto de las cepas QQ <i>A. junii</i> M2-40 y <i>M. echini</i> M3-111 sobre la movilidad tipo <i>swarming</i> (LB 0,5% p/v, agar) tras el cocultivo con <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193.	148
Figura 41. Ensayo de difusión en placa con C10-HSL para determinar la actividad QQ de la cepa <i>M. echini</i> M3-111 en cultivo a pH neutro y tras acidificar a pH = 2.	149
Figura 42. Cuantificación mediante HPLC-MS de la actividad degradadora de C10-HSL de las cepas pertenecientes a los géneros <i>Microbulbifer</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rheinheimera</i> , <i>Ruegeria</i> y <i>Pseudomonas</i> tanto a pH 7 como tras la acidificación a pH 2.	150
Figura 43. Representación del porcentaje de supervivencia de los nauplios de <i>Artemia salina</i> a las 24, 48 y 72h tras una infección con <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de las cepas QQ.	152
Figura 44. Abundancia relativa de las enzimas QQ en cada uno de los metagenomas estudiados y en las distintas condiciones de homología aplicadas.	166
Figura 45. Mapa de calor de la abundancia de proteínas QQ en los distintos metagenomas siguiendo las condiciones de homología C.	167
Figura 46. Abundancia relativa en las condiciones de homología menos estrictas de las enzimas QQ y de otras proteínas con elevada tasa de transferencia horizontal de genes y proteínas de resistencia a antibióticos.	168
Figura 47. Asignación taxonómica de los homólogos de proteínas QQ en las condiciones C.	169
Figura 48. Árboles filogenéticos de los homólogos a QuiP seleccionados en las condiciones A (11 homólogos), B (20 homólogos) y C (28 homólogos).	171
Figura 49. Alineamiento múltiple de las secuencias de QuiP y las proteínas lcl Ga0154020_100033138 y lcl Ga0116211_10093894, los homólogos seleccionados con las condiciones C más lejanos y cercanos, respectivamente, a QuiP.	172
Figura 50. Árbol filogenético de los homólogos a PvdQ seleccionados en las condiciones C.	173
Figura 51. Alineamiento múltiple de las secuencias de PvdQ y las proteínas lcl Ga0153948_100004331 y lcl Ga0114930_10000007162, los homólogos seleccionados con las condiciones C más lejanos y cercanos, respectivamente, a PvdQ.	174
Figura 52. Árbol filogenético de los homólogos a AttM seleccionados en las condiciones C.	175
Figura 53. Alineamiento múltiple de las secuencias de QuiP y las proteínas lcl Ga0132257_1010067871, lcl Ga0157367_10914512, lcl Ga0153915_100226824 y lcl Ga0123519_100408991.	176
Figura 54. Efectos de la mutación D38A en la enzima HqiA con respecto a la actividad lactonasa.	184
Figura 55. Efectos de la mutación C177A en la enzima HqiA con respecto a la actividad lactonasa.	184
Figura 56. Árbol neighbor-joining de isocorismatasas relacionadas filogenéticamente con HqiA, indicando la presencia de cisteína en la posición 177, junto con un conjunto de lactonasas con actividad QQ.	185
Figura 57. Alineamiento de aminoácidos de las enzimas isocorismatasas PhzD, isocorismatasa de <i>Rhodopirelulla baltica</i> y HqiA.	186
Figura 58. Ensayo de difusión en placa para determinar la actividad QQ de las enzimas isocorismatasas purificadas HqiA, PhzD e isocorismatasa de <i>R. baltica</i> frente a C12-HSL.	187

Figura 59. Modelización de los centros activos de los enzimas HqiA (A) y PhzD (B).	189
Figura 60. Ensayo QQ de difusión en placa con la enzima purificada PhzD Y125A/G155C.	190

Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de funciones celulares controladas por QS.....	36
Tabla 2. Principales grupos y familias de enzimas QQ frente a AHLs.....	47
Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones biotecnológicas de la interrupción de los sistemas QS.	58
Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características.....	63
Tabla 5. Cepas marinas objeto de estudio.	64
Tabla 6. Vectores utilizados en este trabajo y sus características.	65
Tabla 7. Antimicrobianos utilizados en este trabajo.....	69
Tabla 8. <i>Primers</i> utilizados en este trabajo.	82
Tabla 9. Número de acceso de las proteínas tirosín-decarboxilasas utilizadas para buscar homólogos.....	85
Tabla 10. Metagenomas analizados en este trabajo junto con su código de acceso en JGI.....	88
Tabla 11. Enzimas QQ utilizadas en nuestra base de datos para encontrar homólogos.	91
Tabla 12. Condiciones establecidas para la selección de homólogos en base a su cercanía a las proteínas de la base de datos.	92
Tabla 13. Proteínas con elevada capacidad de transferencia horizontal de genes utilizadas.	93
Tabla 14. Proteínas de resistencia a antibióticos utilizadas.....	94
Tabla 15. Cepas seleccionadas en el primer screening de inhibición de QS y origen de las mismas.....	99
Tabla 16. Identificación taxonómica y halo de inhibición de la producción de violaceína de las 23 cepas con actividad QSI.....	101
Tabla 17. Capacidad de inhibición de la producción de violaceína de los extractos del pellet celular y del sobrenadante de las cinco cepas con actividad QSI más activas.....	102
Tabla 18. Determinación de algunos fenotipos en <i>C. violaceum</i> ATCC 14274 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 tras el cultivo en ausencia y en presencia del extracto de <i>V. alginolyticus</i> M3-10.....	103
Tabla 19. Valores de ANIb entre la cepa M3-10 y el resto de cepas de <i>V. alginolyticus</i>	112
Tabla 20. Cepas seleccionadas en el primer screening de actividad QQ.	121
Tabla 21. Identificación taxonómica de las 21 cepas seleccionadas por su elevada actividad QQ.....	122
Tabla 22. Actividad QQ de las 19 cepas seleccionadas frente a distintas AHLs comerciales.....	124
Tabla 23. Actividad QQ de las cepas de <i>S. maltophilia</i> frente a los extractos crudos de AHLs de bacterias patógenas.....	130
Tabla 24. Efecto de la actividad QQ de la cepa <i>S. maltophilia</i> M9-54-2 sobre diferentes características fenotípicas de los patógenos <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225T y <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193 en cocultivo.	132
Tabla 25. Homólogos a proteínas QQ encontrados en el genoma de <i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1.	138
Tabla 26. Efecto de las cepas QQ sobre diferentes fenotipos de la cepa <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193 en cocultivo respecto a los monocultivos.	147
Tabla 27. Localización de la actividad QQ en las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros <i>Microbulbifer</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rheinheimera</i> , <i>Ruegeria</i> y <i>Pseudomonas</i>	151
Tabla 28. Abundancia absoluta de homólogos a las 28 enzimas QQ estudiadas en los 60 metagenomas analizados.....	164
Tabla 29. Parámetros cinéticos frente a AHLs de las enzimas HqiA e isocorismatasa de <i>R. baltica</i>	188

Índice del Anexo

Figura Suplementaria 1. Espectros UV-Vis (DAD) y HRMS de <i>N</i> -acetiltiramina (dos espectros superiores) y tiramina (dos espectros inferiores) detectados después del análisis LC-DAD-HRMS de las tres fracciones de HPLC semipreparativa que demostraron actividad QSI.	233
Figura Suplementaria 2. Espectro de RMN 1H de las fracciones de HPLC 12 (verde), 13 (rojo) y 14 (azul), (500 MHz, CD3OD).	234
Figura Suplementaria 3. Expansión de la Figura Suplementaria 2, indicando las señales comunes aromáticas encontradas en los tres espectros.....	234
Figura Suplementaria 4. Expansión de la figura Suplementaria 2, indicando las señales alifáticas comunes encontradas en los tres espectros.....	235
Figura Suplementaria 5. Espectro de RMN 1H de la fracción 13 (rojo) y del estándar de <i>N</i> -acetiltiramina (azul) (500 MHz, CD3OD).	235
Figura Suplementaria 6. Expansión del espectro de la figura suplementaria 5, indicando la identificación de las señales aromáticas de <i>N</i> -acetiltiramina.	236
Figura Suplementaria 7. Otra expansión de la figura suplementaria 5, indicando la identificación de señales alifáticas de <i>N</i> -acetiltiramina.....	236
Figura Suplementaria 8. Espectro de RMN 1H de la fracción de HPLC activa número 12 (verde), la misma fracción inyectada junto con tiramina pura (rojo) y el estándar de tiramina (azul) (500 MHz, CD3OD)..	237
Figura Suplementaria 9. Espectros HSQC de la fracción activa 12 de HPLC (arriba), <i>N</i> -acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo).	238
Figura Suplementaria 10. Espectros HSQC de la fracción activa 13 de HPLC (arriba), <i>N</i> -acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo).	239
Figura Suplementaria 11. Espectros HSQC de la fracción activa 14 de HPLC (arriba), <i>N</i> -acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo).	240
Tabla Suplementaria 1. Asignación de RMN (carbonos protonados) de tiramina y <i>N</i> -acetiltiramina observados en las 3 fracciones activas de HPLC (500 MHz, CD3OD).	241
Tabla Suplementaria 2. Asignación de RMN (carbonos protonados) de los estándares de tiramina y <i>N</i> -acetiltiramina (500 MHz, CD3OD).	241

Abreviaturas

(R)-3-OH-MAME	(R)-metil-3-hidroxi-3-miristato
3-OH-PAME	Metil éster del ácido 3-hidroxi-3-palmitico
ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL	N-acil homoserina lactona
AI-2	Autoinductor-2
AIP	Péptido autoinductor
AM	Agar Marino
ANIb	Identidad de nucleótidos media basada en BLAST
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva
CAI	Cetonas autoinductoras
CM	Caldo Marino
Cm	Cloranfenicol
DKP	Dicetopiperacina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSF	Factor de señal difundible
ECC	Extracto celular crudo
Gm	Gentamicina
GST	Glutathion-S-transferasa
HHQ	2-heptil-4-quinolona
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSL	Homoserina lactona
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JGI	Joint Genome Institute
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
LC-DAD-HRMS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución-detector de array de diodo
MBP	Proteína de unión a maltosa
MOPS	ácido morfolin-propanosulfónico
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PQS	2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona
QQ	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
QSIs	Inhibidores de <i>quorum sensing</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAM	S-adenosil metionina
SFSW	Agua de mar filtrada y esterilizada
SHK	Sensor de histidina quinasa
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA

Tc	Tetraciclina
TCBS	Medio tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
TSB	Caldo triptona-soja
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido

Resumen

La comunicación bacteriana *quorum sensing* (QS) controla la producción de factores de virulencia en numerosas especies patógenas, regulando así el desarrollo de distintas enfermedades infecciosas bacterianas. Estos sistemas están caracterizados por la síntesis y detección de moléculas autoinducidas, cuya concentración depende de la densidad celular que, cuando es elevada, desencadena la expresión y/o represión de determinados genes. El interés en el conocimiento de estos sistemas se ha incrementado en los últimos años, en parte, debido al desarrollo de resistencias bacterianas frente a los antibióticos que se suelen utilizar en el tratamiento de las enfermedades. Por ello, la interferencia con los sistemas QS supone una alternativa novedosa y respetuosa con el medio ambiente en la lucha frente a dichas infecciones. La interrupción de estos sistemas implicaría la inhibición o atenuación de la virulencia de los patógenos sin afectar a su crecimiento, y en consecuencia, una menor incidencia de resistencias.

En este trabajo se han estudiado los mecanismos de interferencia de los sistemas QS en bacterias aisladas de la microbiota de invertebrados marinos. Estos animales son una fuente muy importante, e inexplorada hasta la fecha, de compuestos con dicha actividad biológica. Entre ellas se seleccionaron 23 bacterias pertenecientes al género *Vibrio* que interfieren con los sistemas QS siguiendo un mecanismo no enzimático, lo que se conoce como *quorum sensing inhibition* (QSI). Una de ellas destacó por la producción de tiramina y *N*-acetiltiramina, responsables de la actividad QSI. Por otro lado, se seleccionaron 21 bacterias productoras de enzimas que degradan las moléculas autoinducidas *N*-acil homoserina lactonas (AHL), denominadas enzimas *quorum quenching* (QQ). Se caracterizaron los mecanismos de degradación enzimática, destacando la abundancia de enzimas tipo acilasa, así como su potencial uso en la reducción de la virulencia de patógenos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Dada la importancia de los mecanismos de degradación de tipo QQ, también se han empleado técnicas bioinformáticas y metagenómicas para determinar la abundancia de las enzimas QQ en numerosos ambientes de orígenes muy diversos, utilizando metagenomas de libre acceso. Se demuestra la abundancia de las enzimas QQ en los mismos, confirmando además que las lactonasa suelen ser más abundantes que las acilasas.

Por último, utilizando como modelo la enzima HqiA con actividad lactonasa, encontrada en nuestro grupo de investigación en un trabajo anterior, se caracterizó el centro activo responsable de dicha actividad y se identificó otra enzima QQ del mismo grupo en una bacteria en la que no se había descrito anteriormente.

En resumen, esta tesis doctoral abarca el estudio de los mecanismos de interferencia de los sistemas QS desde distintos ángulos, demostrando la importancia de los mismos y su potencial aplicación biotecnológica.

Summary

Quorum sensing (QS) bacterial communication controls the production of virulence factors in numerous pathogenic species, thus regulating the development of different bacterial infectious diseases. These systems are characterized by the production and detection of autoinducers, which is cell-density dependent. Once a threshold concentration is reached, autoinducers regulate target gene expression in many microorganisms. Interest in understanding QS systems has been increasing in the last few years, due in part of the development of bacterial resistances to antibiotics that are used in the treatment of bacterial infections. Therefore, QS inhibition is a novel and eco-friendly alternative in the fight against such infections. QS interruption would imply the inhibition or attenuation of the pathogens virulence without affecting their growth, thus provoking less resistances.

In this work, QS disruption mechanisms in the microbiota of marine invertebrates have been studied. Marine invertebrate symbiotic microorganisms are considered to be an underexplored source of new bioactive molecules. Among them, 23 strains belonging to the genus *Vibrio* were selected for their ability to interfere with QS following a non-enzymatic mechanism (QSI). One of them stood out for the production of tyramine and *N*-acetyltyramine, the compounds responsible of its QSI activity. Secondly, 21 strains were selected for their ability of producing *N*-acylhomoserin lactone (AHL)-degrading enzymes, called *Quorum Quenching* (QQ) enzymes. The inhibition mechanisms were characterized, highlighting the abundance of acylase-like enzymes. Moreover, the potential use of QQ enzymes in the reduction of the virulence of pathogens through *in vitro* and *in vivo* assays was evaluated.

Given the increasing importance of QQ inhibition mechanisms, bioinformatics and metagenomics have also been used to determine the QQ enzyme abundance in numerous environments from very diverse origins, using free access metagenomes. The abundance of QQ systems in different environments has been demonstrated, confirming that lactonases are usually more abundant than acylases.

Lastly, the active site responsible of the QQ activity was found in the HqiA isochorismatase with lactonase activity, a new enzyme found by our research group in a previous work. This information has been used to identify for the first time the QQ activity in a group of isochorismatases in other bacteria.

To sum up, this Doctoral Thesis covers the study of QS inhibition systems from different points of view, demonstrating the importance of them and its potential biotechnological application.

1. Introducción

1.1. Sistemas *quorum sensing*

1.1.1. Definición de los sistemas *quorum sensing*

En 1970 se habló por primera vez de la capacidad de los microorganismos de comunicarse entre sí, basándose en el hecho de que la producción de bioluminiscencia de *Aliivibrio fischeri* solo se producía cuando las células alcanzaban una elevada concentración (Nealson et al., 1970). Desde entonces son muy numerosas las investigaciones que se han realizado en este ámbito. El término *quorum sensing* (QS) que describe este tipo de comunicación, fue acuñado por primera vez en 1994 (Fuqua et al., 1994). Se trata de un mecanismo de comunicación bacteriana dependiente de la densidad celular mediante el cual las bacterias son capaces de controlar la expresión de determinados genes, y está mediado por la difusión y el reconocimiento de moléculas señal, también llamadas autoinductoras. Estas moléculas se acumulan en el medio extracelular hasta alcanzar una elevada concentración, conocida como valor crítico, que desencadena la activación o la represión de la expresión de determinados genes (Garg et al., 2014; González y Keshavan, 2006; Jayaraman y Wood, 2008). Las moléculas autoinductoras permiten a las bacterias percibir y responder a fluctuaciones en el medio ambiente externo y coordinar su comportamiento mediante la alteración de la expresión de ciertos genes (Haque et al., 2019; Prescott y Decho, 2020) permitiendo a los microorganismos responder a dichas fluctuaciones a nivel de comunidad.

De manera general, el funcionamiento de los distintos tipos de sistemas QS es similar. Las moléculas señal se sintetizan intracelularmente, para con posterioridad salir al exterior de la célula mediante difusión simple o secreción activa. Conforme la densidad celular va aumentando, la concentración extracelular de moléculas autoinductoras también lo hace. Así, al alcanzar un valor crítico mínimo para la detección, las moléculas señal se unen a sus receptores y desencadenan cascadas de transducción de señal que se traducen en un cambio en la expresión génica de la población. El término autoinductor que se utiliza para referirse a las moléculas señal se debe al hecho de que una vez que se ha alcanzado el nivel crítico, uno de los genes cuya expresión se activa es el de las propias sintetas de moléculas señal, provocando así que aumenten aún más la concentración de estas moléculas (Girard, 2019). Así pues, los sistemas QS permiten a las bacterias sincronizarse y comportarse como una comunidad (Ng y Bassler, 2009).

Aunque ya se conocía que la expresión de determinados genes inducibles en las bacterias se debía a la acumulación de ciertos metabolitos en el medio (Nealson et al., 1970; Silverman et al., 1989), la primera vez que se definió por completo un sistema QS fue en 1996 en *A. fischeri*, una especie de la familia *Vibrionaceae* (Ruby, 1996). Esta bacteria marina vive en simbiosis en la cavidad del manto del calamar *Euprymna scolopes* (figura 1) de forma que por la noche es capaz de emitir luz permitiendo al calamar capturar a sus presas. La bacteria también sale beneficiada al vivir en un

entorno rico en nutrientes. La emisión de luz por parte de la bacteria está controlada por QS, y cuando se alcanza una alta densidad celular en la cavidad del manto del calamar se desencadena la expresión de la luciferasa (Ruby, 1996).

El sistema QS de *A. fischeri* está formado por una sintasa de moléculas señal del tipo *N*-acilhomoserina lactona (AHL), llamada LuxI, y un regulador transcripcional, que actúa como receptor de las mismas, llamado LuxR. LuxI sintetiza *N*-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL) que se une al grupo amino terminal de LuxR. Una vez activado el grupo carboxilo terminal de LuxR se une a la región promotora de los genes diana (Choi y Greenberg, 1991; Eglund y Greenberg, 1999; Fuqua et al., 1994). Cuando hay baja densidad celular, LuxI sintetiza 3-oxo-C6-HSL en muy bajas concentraciones, lo que hace que LuxR sea inestable y, por tanto, inactiva, ya que su estructura tridimensional no permite que el dominio amino terminal esté disponible. Conforme aumenta la densidad celular, se acumula mayor concentración de moléculas AHLs, que estabilizan, activan y dimerizan al receptor LuxR, lo que permite su unión al promotor del operón *luxICDABE*. De esta forma, se induce la actividad luciferasa y al mismo tiempo, se aumenta la expresión del gen *luxI*, lo que produce un aumento exponencial en la concentración de AHLs (Milton, 2006).



Figura 1. El calamar *E. scolopes*, en el que se describió la simbiosis con *A. fischeri* cuya bioluminiscencia dependía de QS.

1.1.2. Tipos de moléculas autoinducidas

Desde el punto de vista de las moléculas señal utilizadas, existen distintos tipos de sistemas QS que se muestran en la figura 2. En general, las bacterias gram negativas utilizan sistemas QS dependientes de moléculas señal del tipo *N*-acil homoserina lactona (AHLs) que fueron las primeras moléculas QS descritas y que se estudiarán con profundidad más adelante. Las bacterias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, utilizan oligopéptidos, llamados también péptidos autoinducidos (AIPs) como moléculas señal, que sufren modificaciones postransduccionales (Abisado et al., 2018; Scoffone et al., 2019). Éstos son sintetizados como precursores que posteriormente se procesan y secretan por transporte activo debido a su tamaño. Los

oligopéptidos varían desde 5 a 17 aminoácidos, pudiendo ser lineales o cíclicos, y a menudo contienen modificaciones inusuales en sus cadenas, como grupos isoprenilo o tiolactona. En estas bacterias existe un sistema de transducción de señal llamado sensor de histidina quinasa (SHK) que detecta los autoinductores, se autofosforila y transmite la información a través de una cascada de fosforilación. La fosforilación del regulador de respuesta modifica su unión al ADN y de esta forma se regula la transcripción (Henke y Bassler, 2004; Rutherford y Bassler, 2012).

Además de los dos grupos principales de autoinductores, el uso de otros tipos de moléculas señal también ha sido descrito en varios grupos bacterianos. Por ejemplo, *Burkholderia* spp, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp. y *Xylella* spp. usan ácidos grasos, conocidos en general como factor de señal difundible (DSF) (Ionescu et al., 2014; Zhou et al., 2017). *R. solanacearum* también es capaz de sintetizar metil-éster del ácido 3-hidroxipalmítico (3-OH-PAME) y (*R*)-metil-3-hidroximiristato ((*R*)-3-OH-MAME) para controlar la virulencia o la formación de biofilms (Flavier et al., 1997; Kai et al., 2015). *Legionella* spp. y *Vibrio* spp. utilizan también cetonas, conocidas como CAI-1. Estas cetonas fueron descubiertas en primer lugar en *V. cholerae* y posteriormente en *L. pneumophila* (Kelly et al., 2009; Tiaden y Hilbi, 2012). También se ha demostrado que el indol actúa como molécula QS en *Vibrio* (Yang et al., 2017) y en *Escherichia coli* (Bansal et al., 2007). En esta última, las moléculas epinefrina y noepinefrina actúan como señalizadoras (Bansal et al., 2007). Otras especies como *Pseudomonas aeruginosa* tienen un sistema múltiple en el que intervienen diferentes moléculas señal. Así, además de tener un mecanismo canónico mediado por AHLs, también poseen un sistema QS mediado por moléculas del tipo quinolonas (PQS y HHQ), que forma un circuito de QS interconectado en el que un sistema regula al otro y viceversa (Soukariéh et al., 2018b). Otras moléculas que han demostrado su capacidad de actuar como autoinductoras son las dicetopiperacinas (DKPs), que pueden actuar como activadoras de los sistemas QS (S.-J. Sun et al., 2020; Tommonaro et al., 2012) y como antagonistas (Sun et al., 2016) de los mismos.

Por último, cabe destacar la existencia de un mecanismo “universal” de comunicación bacteriana, mediada por moléculas del tipo furanosil-borato diéster, llamadas AI-2 (figura 2). La síntesis de estas moléculas es llevada a cabo por el gen *luxS*, y la presencia del mismo se ha encontrado en cientos de bacterias tanto gram positivas como gram negativas (Chen et al., 2002; Rutherford y Bassler, 2012). El hecho de que estén presentes en grupos bacterianos tan diversos hace que los sistemas mediados por estas moléculas constituyan una especie de “esperanto bacteriano” (Winans, 2002). Se ha demostrado incluso que las moléculas AI-2 regulan la microbiota intestinal debido a su capacidad de ser reconocidas por múltiples especies bacterianas (Thompson et al., 2015).

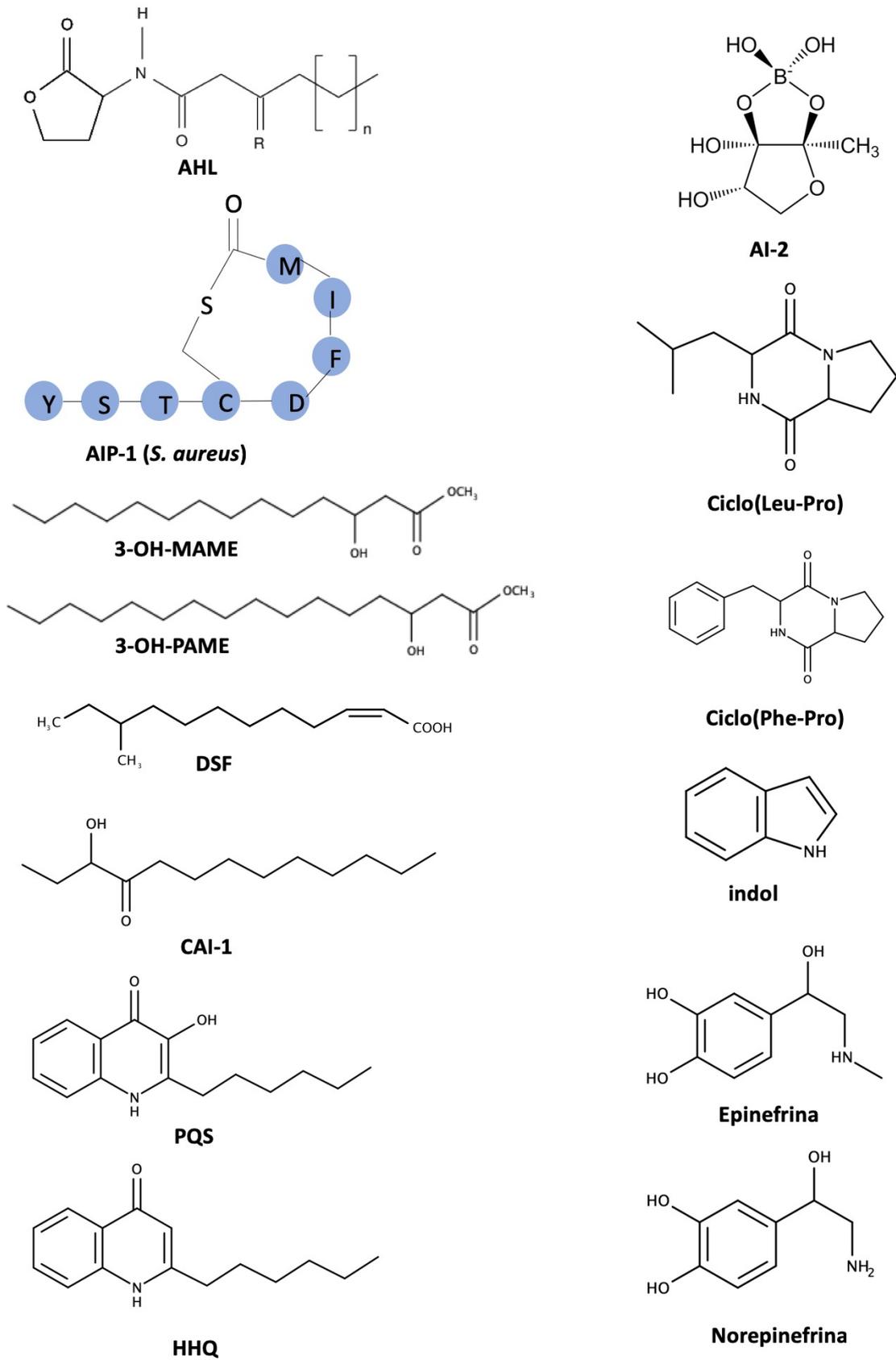


Figura 2. Ejemplos de moléculas que pueden actuar como autoinductores de QS.

1.1.3. Funciones controladas por *quorum sensing*

Desde que se describiera por primera la función de los sistemas QS en *A. fischeri* se ha demostrado que estos sistemas son capaces de controlar la expresión de numerosos genes, regulando así las actividades de las bacterias. Los sistemas QS controlan genes que regulan actividades que no son esenciales pero sí beneficiosas para las bacterias cuando se desarrollan en grupos y actúan de manera sincronizada (Rutherford y Bassler, 2012).

El papel de los sistemas QS es doble: por un lado, permiten a las bacterias “cuantificar” las bacterias que las rodean para ser conscientes de la densidad celular, y por otro lado, son capaces de conocer la tasa de difusión de las moléculas señal. Cuando hay una alta densidad celular y además la tasa de difusión es baja, es decir, las bacterias están asentadas en un mismo espacio, se alcanzará el nivel crítico de moléculas señal en el medio y se desencadenará la expresión de los genes controlados por QS. De esta forma, se consigue un ahorro energético básico para los microorganismos, que así sólo producirán metabolitos energéticamente caros, como lo son los factores de virulencia, cuando sean útiles (Heilmann et al., 2015). Las bacterias pueden intercambiar dos programas de expresión de genes: uno, que se desarrolla a bajas concentraciones celulares, para comportamientos asociales e individuales y otro, que se activa a altas concentraciones celulares, para comportamientos sociales y en grupo (Ng y Bassler, 2009; Rutherford y Bassler, 2012). Además, se ha demostrado que no solo la concentración de bacterias en el medio, sino también otros estímulos ambientales como la limitación de nitrógeno e hierro, el pH o la temperatura influyen en la expresión de genes tanto reguladores de QS como mediados por QS (Kalia et al., 2019). Las moléculas señal que regulan los sistemas QS generalmente son simples mediadores que controlan las funciones celulares. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que éstas pueden actuar por sí mismas como factores de virulencia y provocar un daño a otras especies, como es el caso de los precursores de las moléculas señal de *Pseudoalteromonas piscicida* sobre el alga unicelular *Emiliana huxleyi* (Harvey et al., 2016). No obstante, las propias moléculas AHLs también pueden facilitar la adhesión y establecimiento de algas (Twigg et al., 2014) promover el crecimiento de plantas e incluso promover la respuesta inmunitaria de las mismas (Vesty et al., 2020). También se ha demostrado que los sistemas QS tienen un papel relevante en el desarrollo de resistencias a antibióticos, al controlar la formación de biofilm y la expresión de bombas de flujo (Zhao et al., 2020).

Sin pretender realizar una extensa revisión, algunos ejemplos de funciones controladas por QS en distintos microorganismos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de funciones celulares controladas por QS.

Bacteria	Molécula AHL	Función controlada	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Indol	Formación de biofilm, control de movilidad	(Bansal et al., 2007)
<i>Helicobacter pylori</i>	AI-2	Control de movilidad	(Rader et al., 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AHLs, quinolonas, indol	Producción de elastasa, proteasa, hemolisina y rhamnolípidos, control de movilidad, formación de biofilm	(Lee et al., 2009; Lee y Zhang, 2015; Soukarieh et al., 2018b)
<i>Vibrio cholerae</i>	AI-2, CAI-1, indol	Producción de proteasa, formación de biofilm, control de movilidad	(Mueller et al., 2009; Ng y Bassler, 2009)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AHLs	Producción de proteasa, control de virulencia	(Natrah et al., 2012)
<i>Vibrio harveyi</i>	AHLs, AI-2, CAI-1, indol	Producción de proteasa, sideróforos y biofilm, control de movilidad	(Defoirdt et al., 2008; Yang et al., 2017)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	AHLs	Producción de enzimas degradadoras de la pared celular	(Helman y Chernin, 2015)
<i>Pseudomonas syringae</i>	AHLs	Producción de polisacáridos extracelulares, control de movilidad y de la virulencia	(Helman y Chernin, 2015)
<i>Xanthomonas campestris</i>	DSF	Producción de polisacáridos extracelulares y biofilm	(Zhou et al., 2017)
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	AHLs, AI-2	Control de movilidad, producción de hemolisina y caseinasa	(Torres et al., 2018)
<i>Vibrio mediterranei</i>	AHLs	Control de movilidad, producción de DNAsa y quitinasa	(Torres et al., 2018; Yang et al., 2011)
<i>Vibrio owensii</i>	AHLs	Control de movilidad, producción de hemolisina, amilasa, DNAsa, quitinasa y fosfatasa	(Torres et al., 2018)
<i>Xylella fastidiosa</i>	DSF	Producción de adhesinas y biofilm, control de virulencia	(Ionescu et al., 2014)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	3-OH PAME	Producción de exopolisacáridos y exoenzimas	(Flavier et al., 1997)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Péptidos	Producción de proteínas de superficie, hemolisinas y toxinas	(George y Muir, 2007)
<i>Clostridium perfringens</i>	Péptidos	Producción de toxinas	(Ohtani et al., 2009)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Péptidos	Formación de biofilm, control de la invasión y virulencia	(Riedel et al., 2009)

1.1.4. Sistemas *quorum sensing* mediados por moléculas AHLs

Los sistemas QS mediados por moléculas AHLs son propios de las bacterias gram negativas, siendo los más conocidos y estudiados hasta la fecha. En este trabajo nos centraremos en este tipo de QS al ser el sistema de comunicación de las bacterias objeto de nuestro estudio.

El sistema QS modelo fue descrito en 1994 (Fuqua et al., 1994) y está compuesto por el gen *luxI*, que codifica la proteína encargada de la síntesis de las moléculas AHL, y el gen *luxR*, que codifica el regulador transcripcional y actúa como receptor de las mismas. Cuando en el medio se alcanza la concentración crítica de moléculas AHLs necesaria para activar a los receptores, las proteínas LuxR se unen de forma específica al autoinductor. El complejo LuxR-autoinductor activa la expresión de los genes regulados por QS y la síntesis de nuevos autoinductores, originando un sistema regulador de retroalimentación positivo (figura 3).

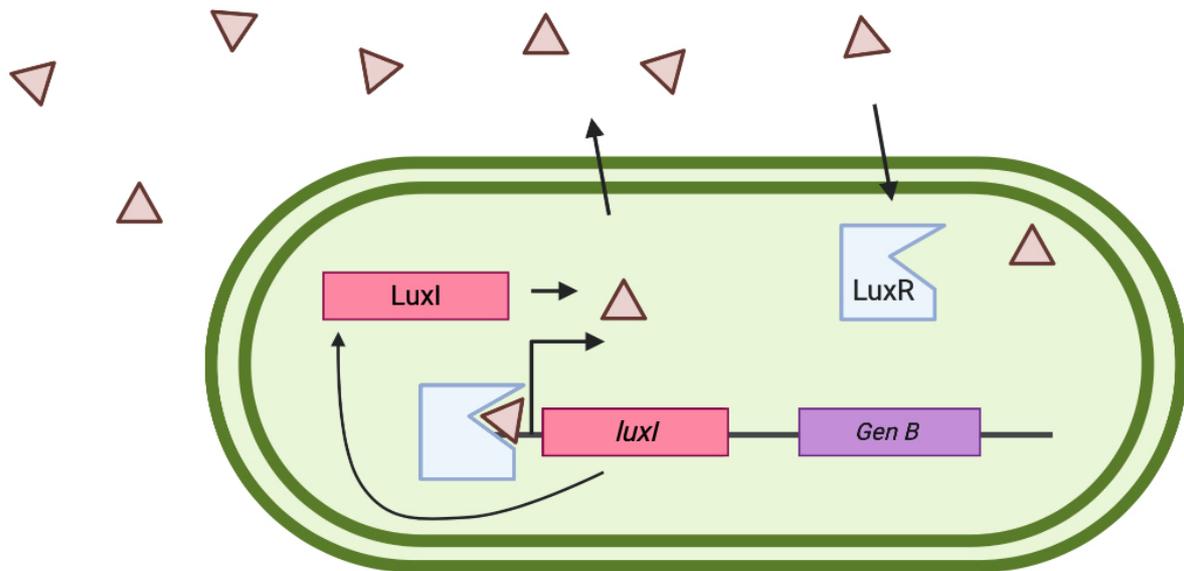


Figura 3. Esquema general del sistema QS mediado por AHLs.

El funcionamiento que se acaba de describir es el sistema canónico de QS mediado por AHLs, si bien existen otros sistemas en los que la pareja *luxI/luxR* puede ser sustituida por otras sintasas o receptores. Respecto a las sintasas, se conocen tres tipos de familia de sintasas: LuxI, LuxM y HdtS (Girard, 2019; Laue et al., 2000; Li y Nair, 2012; Milton et al., 2001) e incluso hay bacterias, como las pertenecientes al género *Vibrio*, en las que se combinan varias sintasas y receptores de QS. Por ejemplo, tras la descripción de QS en *A. fischerii*, se demostró la existencia de un segundo sistema mediado por AHLs en la misma bacteria, a través del par *ainS/ainR*. De hecho, la sintasa AinS pertenece a la familia LuxM, y comparte una baja homología con LuxI (Gilson et al., 1995; Kuo et al., 1994). A su vez, dada la especificidad de este sistema, las sintasas y los receptores son variables en las distintas especies para producir y reconocer AHLs específicas. En cualquier caso todos los sistemas QS mediados por AHLs constan de una sintasa de AHLs perteneciente a una de las tres familias mencionadas anteriormente y un receptor del tipo LuxR, como VanT (Croxatto et al., 2002) en *V. anguillarum*, LasR, RhlR y el “solo” QscR (un receptor que no está acoplado a ninguna sintasa) en *P. aeruginosa* (Gray et al., 1994; Lintz et al., 2011; Ochsner et al., 1994) o CviR en *Chromobacterium violaceum* (Chen et al., 2011), por nombrar algunos ejemplos. Como se acaba de mencionar estos sistemas

pueden estar interconectados entre sí. Además, la presencia de homólogos de LuxR “solos” que son capaces de detectar AHLs, pero carecen de sintasas y por tanto, que no sintetizan sus propias AHLs, está ampliamente distribuida, demostrándose la relevancia de estos sistemas (Hudaiberdiev et al., 2015; Prescott y Decho, 2020).

Las moléculas AHLs están formadas por un anillo lactónico, que constituye la parte hidrófila de la molécula y una cadena lateral de ácido graso, que es la parte hidrófoba (figura 2). Esta cadena suele tener un número par de entre 4 y 18 átomos de carbono, aunque se ha demostrado también la existencia de moléculas con un número impar de átomos de carbono, y pueden estar sustituidas en el carbono 3 del ácido graso o tener algún doble enlace en la cadena. En su biosíntesis intervienen dos precursores: S-adenosil metionina (SAM) y una proteína transportadora de grupos acilos (ACP) unida a la correspondiente cadena hidrocarbonada. Una vez sintetizadas, las moléculas AHL salen al exterior de la célula por difusión simple o transporte activo en función de la longitud de su cadena lateral (Ng y Bassler, 2009; Papenfort y Bassler, 2016; Rutherford y Bassler, 2012). En general, las moléculas AHLs pueden difundir libremente por la membrana, si bien existen algunos transportadores involucrados en su transporte (Fuqua et al., 2001; Minagawa et al., 2012).

1.1.5. Métodos de detección de sistemas *quorum sensing* mediados por AHLs: cepas bioindicadoras

La presencia de moléculas señal del tipo AHLs en el medio y, por ende, la existencia de sistemas de comunicación celular de tipo QS, puede ser fácilmente detectada gracias a bacterias bioindicadoras, también llamadas biosensores. Estas se han obtenido a partir de cepas que han perdido la capacidad de producir moléculas señal, pero mantienen intacto el gen receptor y, por tanto, pueden reconocer las moléculas autoinducidas exógenas. Todas las cepas biosensoras tienen acoplado algún sistema de revelado sencillo, de forma que al detectar a las moléculas señal se produzca una reacción fácilmente detectable. Los biosensores clásicos más utilizados para la detección de moléculas del tipo AHL son dos cepas de *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07 (McClellan et al., 1997; Morohoshi et al., 2008a) y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Shaw et al., 1997).

C. violaceum produce un pigmento de color púrpura de manera natural llamado violaceína cuya síntesis está regulada mediante QS. Las cepas CV026 y VIR07 tienen una mutación en el gen *luxI* que afecta a la capacidad de síntesis de las moléculas señal AHL, mientras que el regulador transcripcional permanece intacto. En presencia de AHLs exógenas producen un color púrpura fácilmente identificable (McClellan et al., 1997; Morohoshi et al., 2008a). La única diferencia entre ambas se corresponde con el tipo de moléculas señal que detectan. La cepa CV026 detecta moléculas AHL de 4 a 8 carbonos en su cadena lateral, aunque tiene mayor afinidad por C6-HSL (McClellan et al., 1997). Por su parte, la cepa VIR07 es especialmente sensible a AHLs de 10 átomos de carbono en su cadena lateral (Morohoshi et al., 2008a).

A. tumefaciens NTL4 (pZLR4) es una cepa en la que se ha realizado una fusión transcripcional del gen *lacZ* al gen *traG* (*traG::lacZ*). El gen *traG* está regulado

mediante QS, por lo que si en el medio extracelular hay moléculas señal AHLs se producirá color azul en presencia de X-gal. *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) detecta AHLs de cadena hidrocarbonada media o larga (C8-C12-HSL) (Shaw et al., 1997).

Además de los biosensores clásicos, se han diseñado otros sistemas de detección para ampliar el rango de AHLs a detectar, incluidas aquellas de gran número de átomos de carbonos (Steindler y Venturi, 2007; Llamas et al., 2004). Un ejemplo son las cepas biosensoras de *E. coli*. Esta bacteria no tiene de manera natural un sistema QS dependiente de AHLs, pero ha sido modificada genéticamente para producir luminiscencia en respuesta a la presencia de AHLs exógenas. Para ello, se le han transferido plásmidos que contienen el sistema *luxCDABE* de *Photorhabdus luminescens*, controlado por QS. Así, uniendo al operón *luxCDABE* distintos receptores de AHLs (*luxR* de *A. fischeri*; *ahyR* de *Aeromonas hydrophyla* y *lasR* de *P. aeruginosa*) se han construido los plásmidos pSB536, pSB401 y pSB1142 respectivamente, capaces de detectar las moléculas señal AHL de cadena corta, media y larga respectivamente (Winson et al., 1998). El uso de las luciferasas bacterianas es un buen sistema de detección de la expresión de genes, especialmente adecuado para el estudio de QS, en el que la expresión de genes sigue una dependencia temporal o de la densidad celular (Winson et al., 1998).

1.2. Interferencia de sistemas *quorum sensing*

1.2.1. Concepto de interferencia de sistemas *quorum sensing*

La interferencia de los sistemas QS se puede definir como cualquier tipo de proceso que modifique o altere de alguna manera los sistemas de comunicación bacteriana (Defoirdt, 2018). Es un proceso muy ubicuo en organismos eucariotas y procariotas. En organismos superiores se ha demostrado que, ante una infección, aprovechando la relativamente corta vida media de las moléculas señal AHLs, los hospedadores incrementan el pH y la temperatura, facilitando así la degradación de dichas moléculas (Boller y Felix, 2009; Felix et al., 1993).

La interferencia de los sistemas QS puede llevarse a cabo por varios mecanismos (figura 4) entre los que se incluyen la inhibición de la síntesis de las moléculas señal; la acción de anticuerpos o macromoléculas que retiran a las moléculas señal; la interferencia en el transporte de las moléculas señal; la inhibición de la recepción de la señal y la respuesta; y la degradación enzimática de las moléculas señal (conocido como *quorum quenching*, QQ). Los cuatro primeros mecanismos son conocidos como mecanismos de inhibición de QS (QSI) (Bhardwaj et al., 2013; Kalia et al., 2019).

Cabe destacar que algunos autores utilizan de manera indistinta los términos interferencia de QS y QQ (Bhardwaj et al., 2013; Fetzner, 2014; Kalia, 2013) mientras otros autores defienden que el término QQ se refiere exclusivamente al proceso de degradación enzimática de las moléculas señal y prefieren denominar al resto de mecanismos como interferencia o inhibición de QS (QSI) (Bhardwaj et al., 2013; Bzdrenga et al., 2017; Czajkowski y Jafra, 2009). En esta tesis doctoral se utilizará el

término QQ para referirse exclusivamente a la degradación enzimática de las moléculas señal.

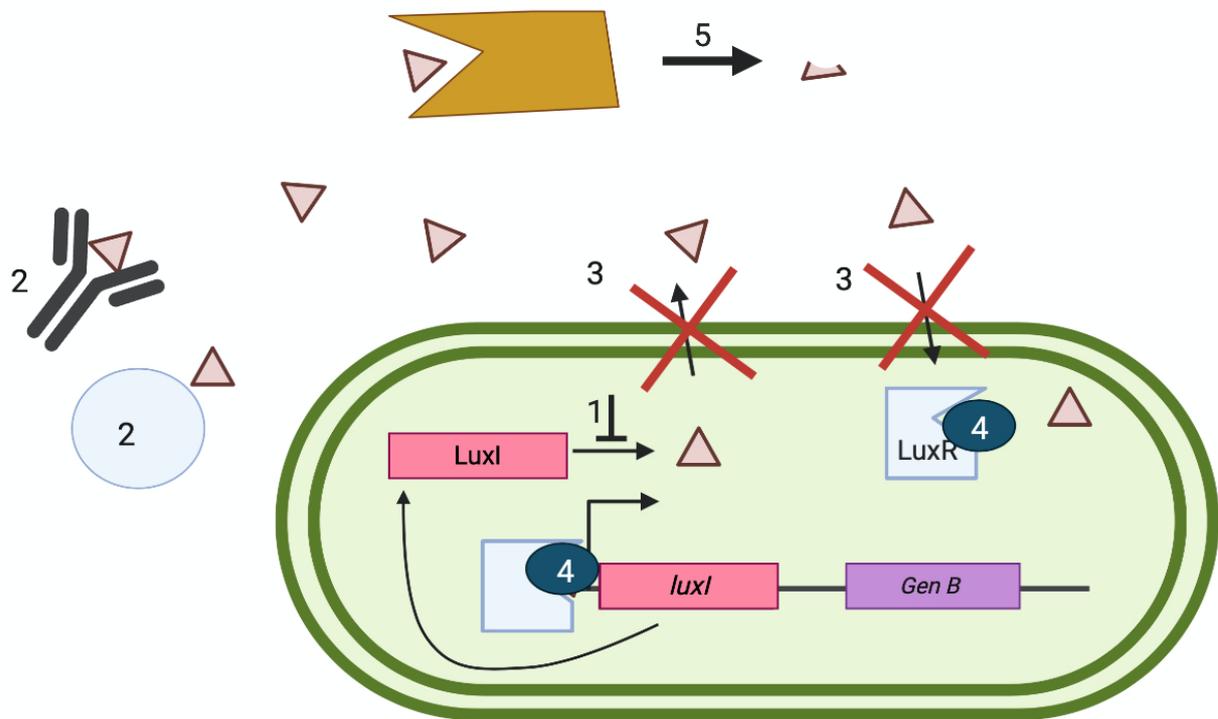


Figura 4. Esquema de los mecanismos de inhibición de QS. 1) Inhibición de la síntesis de las moléculas señal. 2) Acción de anticuerpos o macromoléculas que retiran moléculas señal. 3) Alteración del transporte de las moléculas señal. 4) Inhibición de la recepción de la señal y la respuesta. 5) Degradación enzimática de las moléculas señal (*quorum quenching*).

1.2.2. Mecanismos de inhibición de *quorum sensing* no enzimáticos

a) Inhibición de la síntesis de las moléculas señal

Existen numerosos compuestos capaces de inhibir la síntesis de moléculas señal al interferir en las rutas biosintéticas de las mismas. Por ejemplo, en el caso del sistema QS dependiente de moléculas del tipo AHL, su biosíntesis depende de S-adenosil metionina (SAM) y de la proteína transportadora de grupos acilos (ACP). Tanto SAM como ACP son esenciales para la bacteria, y la inhibición de la síntesis de estos precursores sería letal, pero concentraciones subinhibitorias de algunos compuestos han demostrado inhibir la síntesis de AHLs (Hoang y Schweizer, 1999). También se han descrito compuestos que inhiben la expresión del gen sintasa de las AHLs, como el inhibidor J8-C8 (Chung et al., 2011) o el indol-3-acético (Christensen et al., 2013) y del gen *luxS*, encargado de la síntesis de las moléculas AI-2 (Zhang et al., 2009).

b) Eliminación de moléculas señal por anticuerpos y macromoléculas

Se ha demostrado que macromoléculas como la apolipoproteína B secuestran péptidos que actúan como autoinductores en *Staphylococcus aureus* (Chung et al.,

2011) mientras que la albúmina secuestra AHLs en *P. aeruginosa* (Smith et al., 2017). También se han desarrollado anticuerpos monoclonales tanto frente a AHLs (Kaufmann et al., 2008) como a péptidos de *S. aureus* (Park et al., 2007).

c) Inhibición del transporte de las moléculas señal

Si bien se han encontrado transportadores involucrados en el transporte de las moléculas señal de cadena larga, la mayoría pueden difundir por la membrana (Fuqua et al., 2001). Aun así, el transporte de las AHLs mediante bombas de flujo no está bien descrito, y la información es escasa, y aunque tradicionalmente se creía que las moléculas de cadena lateral mayor de 8 átomos de carbono no podían difundir a través de la membrana (Fuqua et al., 2001) hoy en día se acepta que sí difunden y que los transportadores podrían estar implicados en disminuir la concentración intracelular de las AHLs tras su entrada (Minagawa et al., 2012; Moore et al., 2014). Hasta la fecha solo se ha conseguido un mutante de la bomba BpeAB-OprB de *Burkholderia pseudomallei* en el que la concentración de AHLs en el medio extracelular disminuía (Chan y Chua, 2005). También se ha investigado con la bomba MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. En este caso, el transportador facilita la salida de AHLs al medio externo, evitando que se acumulen en el interior celular. Se ha demostrado que, en ausencia del mismo, la respuesta del receptor de AHLs es mayor (Minagawa et al., 2012) por lo que en este caso, al sobreexpresar el transportador MexAB-OprM, se podría reducir la respuesta a las AHLs (Alcalde-Rico et al., 2018) ya que las AHLs no alcanzarían concentraciones elevadas en el interior celular. Dicho transportador podría incluso participar en la salida de los inhibidores de QS de la célula que actúen a otro nivel, y se han diseñado algunos inhibidores que son capaces de no ser reconocidos por la bomba MexAB-OprM, permitiendo así que alcancen concentraciones eficaces en el interior celular (Moore et al., 2014). En cualquier caso, parece un mecanismo difícil de explotar en la práctica.

Por otra parte, respecto a el mecanismo de QS mediado por AI-2, cabe destacar a la enzima LsrK, capaz de fosforilar a la señal AI-2 y evitar su entrada a la célula (Roy et al., 2010).

d) Inhibición de la recepción de la señal y la respuesta

Fue el primer mecanismo de inhibición de QS (QSI) descrito (Givskov et al., 1996) y fue encontrado por casualidad en el alga *Delisea pulchra*. Este mecanismo es el que generalmente se conoce como “inhibidores de QS (QSIs)”. El alga produce furanonas estructuralmente similares a las AHLs y compiten con ellas por la unión al receptor LuxR, reducen la estabilidad y la afinidad de unión al mismo (Manefield et al., 2002) y también son capaces de disminuir la capacidad de LuxR de actuar como regulador de la transcripción, al disminuir su habilidad de unión al ADN (Defoirdt et al., 2007). Por otra parte, también se ha demostrado que las furanonas inhiben el mecanismo mediado por moléculas AI-2 al unirse a la sintasa LuxS de manera covalente, bloqueando así su síntesis (Zang et al., 2009). El principal inconveniente de las furanonas para su uso como antagonista de QS es su elevada toxicidad (Kalia et al., 2019).

Hoy en día se ha demostrado que muchas moléculas tienen actividad inhibidora de QS, y pueden tener o no semejanza estructural a las moléculas señal (Natrah et al., 2011). Por ejemplo, el compuesto *N*-decanoil-L-homoserina bencil éster es un análogo estructural de las AHLs y es capaz de bloquear el receptor QscR (Weng et al., 2014). Otros compuestos sin semejanza a las AHLs como el ácido salicílico, nifuroxazida y clorzoxazona también tienen capacidad de unión al receptor LasR de *P. aeruginosa* (Yang et al., 2009). Algunos ejemplos más de moléculas con capacidad de inhibición de sistemas QS dependientes de AHLs son el tirosol, distintas DKPs (que, como se ha explicado con anterioridad, pueden actuar como activadores y/o inhibidores de QS) (Saurav et al., 2017) o la molécula hordenina (Zhou et al., 2019, 2018). Recientemente se ha demostrado que otros análogos, como piperina y tricostaquina, aislados de la pimienta negra, son capaces también de bloquear el sistema QS (Vázquez-Martínez et al., 2020). Algunos ejemplos de moléculas con actividad inhibidora de los sistemas QS dependientes de moléculas AHLs se muestran en la figura 5.

En lo que respecta a otros sistemas QS, también se han identificado inhibidores de la unión de las quinolonas, usadas como moléculas señal por *P. aeruginosa*, a su receptor PqsR (Lu et al., 2012) y de los sistemas QS mediados por péptidos en bacterias gram positivas (Sully et al., 2014).

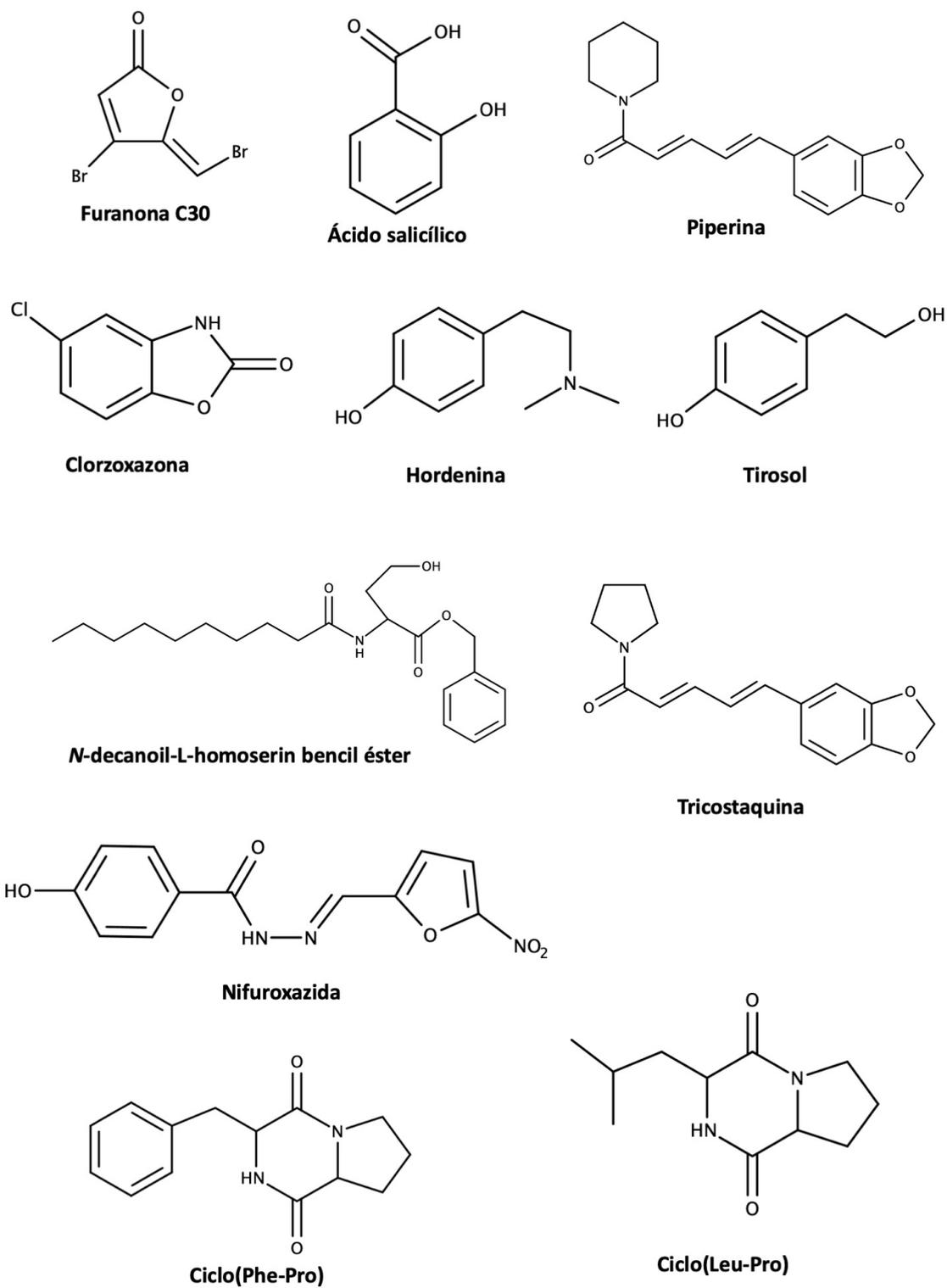


Figura 5. Ejemplos de moléculas con actividad QSI.

1.2.3. Mecanismos de degradación enzimática de *quorum sensing*: *quorum quenching*

El mecanismo de degradación enzimático de QS es el más conocido y sobre el que hay desarrollada una mayor investigación, especialmente en lo que se refiere a la degradación de sistemas mediados por moléculas AHLs en bacterias gram negativas. Se trata de enzimas que rompen o modifican la estructura de las moléculas señal, impidiendo así que éstas sean reconocidas por el regulador transcripcional y con ello no se active la expresión de genes (Grandclément et al., 2016). La mayoría de las enzimas QQ descritas hasta el momento son de origen bacteriano (Fetzner, 2014) si bien existen ejemplos de enzimas QQ en arqueas (Bzdrenga et al., 2014; Hiblot et al., 2012). Hasta la fecha se han descrito varios tipos de enzimas degradadoras de moléculas señal de tipo AHLs: lactonasas, acilasas y oxidorreductasas (figura 6). Las acilasas catalizan la hidrólisis del enlace amido de la molécula AHL, liberando una molécula de ácido graso y la homoserina lactona. Las lactonasas rompen anillo lactónico de las moléculas AHL, que queda abierto, formando una cadena *N*-acil homoserina. Esta reacción es reversible, y la molécula vuelve a su estado original si se acidifica el medio (Yates et al., 2002). Por último, las oxidorreductasas modifican las AHLs mediante la oxidación o reducción del ácido graso lateral sin degradar el compuesto, pero consiguiendo que no sean reconocidas por el receptor (Dong et al., 2007; Uroz et al., 2009; Uroz y Oger, 2017).

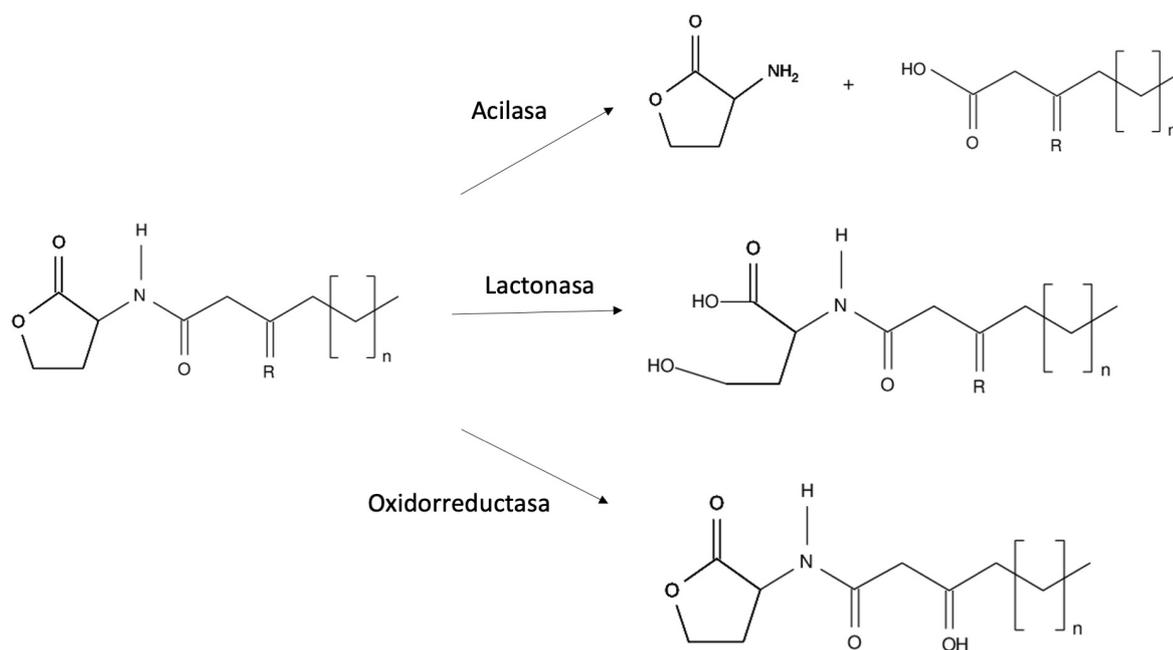


Figura 6. Tipos de mecanismos de degradación enzimática (*quorum quenching*) de moléculas señal tipo AHL.

a) Lactonasas

Las lactonasas fueron las primeras enzimas QQ en ser descubiertas. Concretamente, la primera enzima lactonasa descrita fue AiiA, presente en *Bacillus cereus*, en el año 2000 (Dong et al., 2000). Posteriormente se describieron otras como por ejemplo AttM

(Zhang et al., 2002), AhID (Park et al., 2003), AidC (Wang et al., 2012) o la más reciente AhIX (Liu et al., 2019). En general, las lactonasas tienen un amplio espectro de especificidad por los sustratos, hidrolizando AHLs con o sin sustituciones en el tercer carbono, con cierta preferencia por las AHLs de cadena media y larga (Fetzner, 2014). Todas ellas pertenecen a la familia de las metalo- β -lactamasas, el grupo mayoritario de lactonasas descrito (Q. Jiang et al., 2019) y tienen un dominio característico de unión a Zinc "HXHXDH" (Fetzner, 2014).

Existen otras familias de lactonasas como las fosfotriesterasas (PLL) que pertenecen a la superfamilia de las amidohidrolasas y tienen una estructura con 8 hélices alfa y 8 láminas beta intercaladas (Bzdrenga et al., 2017). A esta familia pertenecen enzimas como AhIA (también llamada QsdA) (Afriat et al., 2006), AidP (See-Too et al., 2017) ó AaL (Bergonzi et al., 2018). A este grupo pertenecen las enzimas descritas en las arqueas *Sulfolobus acidocaldarius* (SacPox) (Bzdrenga et al., 2014), *S. solfataricus* (SsoPox) (Hiblot et al., 2012) y *S. islandicus* (SisLac) (Hiblot et al., 2012). Debido a su elevada actividad y estabilidad y al amplio rango de moléculas AHLs que pueden degradar, las enzimas QQ derivadas de arqueas tienen prometedoras aplicaciones industriales (Bzdrenga et al., 2017). Otras familias de lactonasas son las paraoxonasas, entre las que se encuentran las derivadas de células epiteliales de mamíferos PON1, PON2 y PON3 (Bar-Rogovsky et al., 2013) e incluso lactonasas que pertenecen a la superfamilia de las α/β -hidrolasas, como AiiM o AidH (Mei et al., 2010; Wang et al., 2010).

Por último, se ha propuesto una nueva clase de enzimas QQ de tipo lactonasa que no pertenecen a ninguno de los grupos anteriormente descritos. Se trata de la lactonasa HqiA, que se identificó y caracterizó en nuestro laboratorio en una librería metagenómica construida a partir de un suelo hipersalino. Esta lactonasa tiene homología con enzimas isocorismatasas, como por ejemplo la isocorismatasa PhzD de *P. aeruginosa*, de la que, sin embargo, no se ha demostrado su actividad QQ. Las isocorismatasas están involucradas en diversas funciones pero de momento no se conoce su aplicación en la degradación de AHLs, más allá de la mencionada enzima (Torres et al., 2017).

b) Acilasas

Las acilasas, al igual que las lactonasas, se descubrieron por primera vez en el año 2000 (Leadbetter y Greenberg, 2000). Prácticamente todas las acilasas conocidas pertenecen a la familia de las Ntn-hidrolasas, que se distinguen por tener un nucleófilo N-terminal (Fetzner, 2014). En este grupo de acilasas, destacan las acilasas de penicilinas que han demostrado ser en múltiples ocasiones acilasas con una amplia promiscuidad de sustrato y en las que, con una estructura semejante a las acilasas de AHLs del tipo Ntn-hidrolasas, pueden degradar diversos sustratos, incluyendo las AHLs. En general, todas ellas tienen preferencia por las AHLs de cadena lateral media y larga, pero hay algunas acilasas son una excepción al poder degradar incluso C4-HSL (Romero et al., 2008). Al grupo de Ntn-hidrolasas pertenecen por ejemplo las acilasas PvdQ y QuiP de *P. aeruginosa* (Huang et al., 2006, 2003), AiiD y AaC de *Ralstonia* spp. (Chen et al., 2009; Lin et al., 2003), AidP de *Planococcus versutus* (See-Too et al., 2017) y Aptm01 de *Pseudoalteromonas tetraodonis* (Pan et al., 2019).

Por otra parte, también se ha descubierto la enzima QQ AiiO, perteneciente a otra familia de acilasas (Czajkowski et al., 2011) encontrada en *Ochrobactrum* sp. y que tiene homología con las α/β -hidrolasas. Hasta el momento, AiiO es el único representante de esta familia de acilasas, y no se ha encontrado ningún homólogo con actividad QQ (Bzdrenga et al., 2017). Otro ejemplo de enzima QQ perteneciente a una familia distinta a las Ntn-hidrolasas es QsdB, identificada en un metagenoma de suelo y que pertenece a la familia con actividad amidasa (Tannières et al., 2013). De nuevo, ningún homólogo con actividad QQ ha sido encontrado hasta la fecha.

En el caso de las lactonasas, la degradación de la AHL es reversible (se puede recircularizar la lactona a pH ácido), por lo que a diferencia de las acilasas, se deben tomar precauciones al usarlas (Bhardwaj et al., 2013). Además, el ácido graso que se genera es normalmente metabolizado rápidamente (Fetzner, 2014).

El papel fisiológico de las acilasas aún es desconocido, así como si estas enzimas tienen una elevada especificidad de sustrato por las AHLs. En general, las acilasas pueden servir tanto para ajustar el sistema QS endógeno, como para modular el sistema QS de otras especies bacterianas del ambiente o incluso para utilizar las AHLs como nutrientes o escapar de la toxicidad mediada por las mismas (Utari et al., 2017). Por otro lado, el hecho de que haya acilasas que tienen promiscuidad y que usan distintos sustratos como las mencionadas anteriormente penicilin-acilasas, del grupo de las Ntn-hidrolasas (Mukherji et al., 2014; Sunder et al., 2017) hace pensar que quizás las AHLs no sean el sustrato original de las AHLs, sino que éstas son moléculas degradadas por las acilasas debido a su similitud con otras moléculas de diferente función, y que, por tanto, no se pueda determinar su actividad fisiológica (Utari et al., 2017).

c) Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas catalizan la modificación de la cadena lateral de las AHLs impidiendo así su reconocimiento por parte de los receptores (Q. Jiang et al., 2019). Aunque no hay muchas enzimas de este grupo descritas, destaca la enzima producida por *Rhodococcus erythropolis* W2 (Uroz et al., 2005) y la enzima BpiB09, una oxidorreductasa que fue encontrada en un metagenoma de suelos en Alemania, junto a otras enzimas QQ de tipo lactonasa (Bijtenhoorn et al., 2011b; Schipper et al., 2009).

d) Otras enzimas *quorum quenching*

Hay que mencionar que, aunque las enzimas QQ degradadoras de moléculas AHLs son las más estudiadas y las mejor caracterizadas, existen enzimas que degradan a las moléculas AI-2, como LsrK, que modifica al autoinductor e impide su entrada a la célula (Roy et al., 2010). También se ha identificado una enzima QQ con actividad frente a AI-2 en un metagenoma acuático (Weiland-Bräuer et al., 2016). Otro grupo de enzimas son las llamadas dioxigenasas, que son activas frente a las quinolonas de *P. aeruginosa*, como AqdC y que incluso actúan en sinergia con enzimas QQ que

degradadan AHLs en el tratamiento de infecciones causadas por ese patógeno (Birmes et al., 2019). Por último, hay que señalar que no se han encontrado hasta la fecha mecanismos de degradación enzimática frente a los sistemas QS de bacterias gram positivas, mediadas por péptidos.

En la tabla 2 se muestra un resumen de los principales grupos y familias de enzimas QQ frente a moléculas AHLs, en las que nos centramos en esta tesis doctoral, y algunos ejemplos de cada una de ellas.

Tabla 2. Principales grupos y familias de enzimas QQ frente a AHLs.

Grupo	Familia	Ejemplos	Origen	Cita
Lactonasas	Metallo- β -lactamasas	AiiA	<i>Bacillus</i> spp.	Dong et al., 2000
		AttM	<i>Bacillus</i> spp.	Zhang et al., 2002
		AhID	<i>Arthrobacter</i> spp.	Park et al., 2003
		AidC	<i>Chryseobacterium</i> sp.	Wang et al., 2012
		AhIX	<i>Salinicola salaria</i>	Liu et al., 2019
	Fosfotriesterasas	AhIA (QsdA)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	Afriat et al., 2006
		AaL	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Bergonzi et al., 2018
	Paraoxonasas	PON1, PON2 y PON3	Células epiteliales de mamíferos	Bar-Rogovsky et al., 2013
	α/β -hidrolasas	AidH	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Mei et al., 2010
		JydB	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Ryu et al., 2020
Isocorismatasas	HqiA	Metagenoma de hábitat hipersalino	Torres et al., 2017	
Acilasas	Ntn-hidrolasas (incluyen a las acilasas de penicilinas)	PvdQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Huang et al., 2003
		QuiP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Huang et al., 2003
		MacQ	<i>Acidovorax</i> sp.	Kusada et al., 2017
	α/β -hidrolasas	AiiO	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Czajkowski et al., 2011
	Familia de la amidasa	QsdB	Metagenoma de suelo	Tannières et al., 2013
Oxidorreductasas	-	Oxidorreductasa de <i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	Uroz et al., 2005
	-	BpiB09	Metagenoma de suelo	Bijtenhoorn et al., 2011a

1.3. Medios salinos como fuente de moléculas con actividad biológica

1.3.1. Interés biotecnológico del medio salino

Los hábitats salinos e hipersalinos están distribuidos por todo el mundo, e incluyen los medios marinos, los lagos salinos e hipersalinos y las salinas y suelos hipersalinos, entre otros. Los microorganismos que habitan estos ambientes son fundamentalmente halófilos, aunque también hay presencia de halotolerantes (Oren, 2002; Ventosa, 2006). Todos estos microorganismos están adaptados a crecer en presencia de un elevado contenido iónico (principalmente de NaCl), y a menudo también soportan factores de estrés como valores de pH alcalinos, baja disponibilidad de oxígeno, temperaturas extremas o presencia de compuestos tóxicos (Corral et al., 2019; Oren, 2002).

Las peculiares características fisicoquímicas de los ambientes salinos hacen que los microorganismos halófilos sintetizen moléculas únicas y tengan rutas metabólicas especiales para amortiguar las condiciones de estrés que están presentes en estos hábitats. De hecho, se ha demostrado que las moléculas bioactivas producidas por los microorganismos halófilos tienen propiedades que difieren de aquellas encontradas en microorganismos de ambientes no salinos (Amjres et al., 2015; Bhatnagar y Kim, 2010; Chen et al., 2019; Y.-C. Chen et al., 2010; Llamas et al., 2012; Zhao et al., 2019). Hasta la fecha, se han descrito numerosos microorganismos que sintetizan exopolisacáridos (Ibrahim et al., 2020; M.-L. Sun et al., 2020) y enzimas como alfa-amilasas (Chang et al., 2013), endoglucanasas (Scapin et al., 2017) o lipasas (Li et al., 2014) que presentan propiedades únicas y prometedoras perspectivas para su aplicación biotecnológica.

Existen numerosos estudios que demuestran que el medio marino es una fuente muy importante y desconocida de compuestos con actividad biológica. Por ejemplo, ya en 1996 se tuvo constancia del potencial biotecnológico del medio marino gracias al descubrimiento del compuesto antitumoral Ecteinascidina 743, producido por un invertebrado marino (*Ectenaiscidia tunicata*) (García-Rocha et al., 1996). Este compuesto está siendo actualmente comercializado por la empresa PharmaMar bajo el nombre de Trabectedina (Yondelis®). Esta compañía también ha comercializado el compuesto anticanceroso de origen marino Plitidepsina (Aplidin®), que se está probando también por su capacidad antiviral frente a SARS-CoV-2 (Covid-19) (<https://www.diariofarma.com/2020/04/28/pharmamar-inicia-un-ensayo-con-aplidin-en-27-pacientes-con-covid-19>)

Los océanos representan la mayor biosfera del planeta, y los microorganismos marinos son abundantes, productivos y diversos. Estos microorganismos tienen rutas metabólicas variadas y constituyen una importante fuente de enzimas y moléculas con potencial biotecnológico (Tinta et al., 2019). Sin embargo, a los microorganismos marinos no se les ha prestado gran atención hasta el momento y hay muy poco conocimiento sobre las capacidades y el potencial bioactivo de los mismos

(Bhatnagar y Kim, 2010; Hughes y Fenical, 2012). Por su parte, los microorganismos asociados a los invertebrados marinos merecen especial atención ya que son excelentes candidatos para la búsqueda de bacterias simbiotes con actividad biológica (León-Palmero et al., 2018). Tanto los cnidarios, a los que pertenecen las anémonas, como las holoturias pertenecientes al filo *Echinodermata*, tienen una microbiota rica y variada que puede contener bacterias productoras de metabolitos desconocidos (Enomoto et al., 2012; Meron et al., 2013). Por todo ello, el medio salino y especialmente el medio marino y los invertebrados que lo habitan, se consideran una fuente inexplorada de moléculas con actividad biológica y es de gran relevancia su investigación (Bhatnagar y Kim, 2010; León-Palmero et al., 2018; Malve, 2016; Tinta et al., 2019; Torres et al., 2019).

1.3.2. Interés del medio salino en la inhibición de sistemas *quorum sensing*

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios relacionados con la inhibición de los sistemas QS se han centrado en el medio marino, mientras que existe poca información sobre la inhibición de QS en medios hipersalinos (Borges y Simões, 2019; Saurav et al., 2017).

a) Inhibición no enzimática

La producción de compuestos que inhiben los sistemas QS dependientes de AHLs por un mecanismo no enzimático en el medio marino ha sido demostrada en numerosas ocasiones (Zhao et al., 2019). Por el contrario, solo se han descrito algunos inhibidores en el medio hipersalino, como es el caso de las DKPs encontradas en tapetes microbianos hipersalinos (Abed et al., 2013) o el compuesto ácido 1,2-bencén-dicarboxílico di-isooctil éster, aislado de bacterias asociadas a suelos salinos (Singh et al., 2017). Volviendo al medio marino, destaca la ya mencionada furanona C-30, que fue el primer inhibidor descrito de QS y se encontró en el alga marina *Delisea pulchra* (Givskov et al., 1996). Desde entonces se han identificado distintos inhibidores de QS en bacterias marinas. Por ejemplo, las fenetilamidas producidas por la bacteria marina *Halobacillus salinus* que son análogos estructurales de las AHLs y actúan como inhibidores de QS al unirse al regulador transcripcional y receptor de las mismas (Teasdale et al., 2009). El ácido lingbioico, identificado en la cianobacteria *Lyngbya majuscula*, es capaz de bloquear al receptor LasR de *Pseudomonas aeruginosa* (Kwan et al., 2011). También en bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, como *V. alginolyticus*, se han identificado moléculas inhibidoras de QS como el 2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol, que se encontró en una cepa de esa especie asociada a un alga (Padmavathi et al., 2014). Por su parte, se ha demostrado que las moléculas DKPs, presentes en numerosas bacterias marinas, funcionan como moduladoras de los sistemas QS (Campbell et al., 2009). Por ejemplo, ciclo(Trp-Ser) producida por la bacteria marina *Rheinheimera aquimaris* es capaz de inhibir el sistema QS de *P. aeruginosa* (Sun et al., 2016) y distintas DKPs encontradas en bacterias aisladas de tapetes microbianos hipersalinos inhiben el sistema QS de la cepa biosensora *C. violaceum* (Abed et al., 2013). Las técnicas metagenómicas también se han aplicado para la búsqueda de compuestos QSI. En un estudio realizado por Yaniv y colaboradores se aisló un clon con actividad QSI en

un metagenoma de plancton del mar rojo, aunque no se caracterizó el compuesto responsable de la actividad (Yaniv et al., 2017).

Por otro lado, también se han identificado bacterias marinas con capacidad de inhibir los sistemas QS mediados por AI-2 (Liaqat et al., 2014) y por péptidos (Mansson et al., 2011).

En lo que respecta a la microbiota de los invertebrados marinos, existen algunos estudios que describen la producción de compuestos inhibidores de sistemas QS dependientes de AHLs. Entre ellos, se han identificado bacterias asociadas a corales, pertenecientes principalmente a los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*, con capacidad QSI (Golberg et al., 2013; Song et al., 2018). También se encontraron compuestos inhibidores de QS en bacterias asociadas a esponjas (Saurav et al., 2016) pertenecientes en este caso a grupos taxonómicos muy diversos, que incluyeron *Alphaproteobacteria*, *Bacilli* y *Actinobacteria*. Otros ejemplos son las fenetilamidas y dipéptidos cíclicos identificados en diversos géneros de bacterias gram positivas asociadas a invertebrados marinos (Teasdale et al., 2011) o la inhibición de QS de *P. aeruginosa* por bacterias pertenecientes a los taxa *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* asociadas a la microbiota de esponjas, mediante un mecanismo sin determinar (Gutiérrez-Barranquero et al., 2019). También destacan varios ejemplos de inhibidores de QS encontrados en especies pertenecientes al género *Vibrio* asociados a la microbiota de invertebrados marinos (Padmavathi et al., 2014; Song et al., 2018).

Algunos ejemplos de compuestos QSIs de origen marino mencionados anteriormente se muestran en la figura 7.

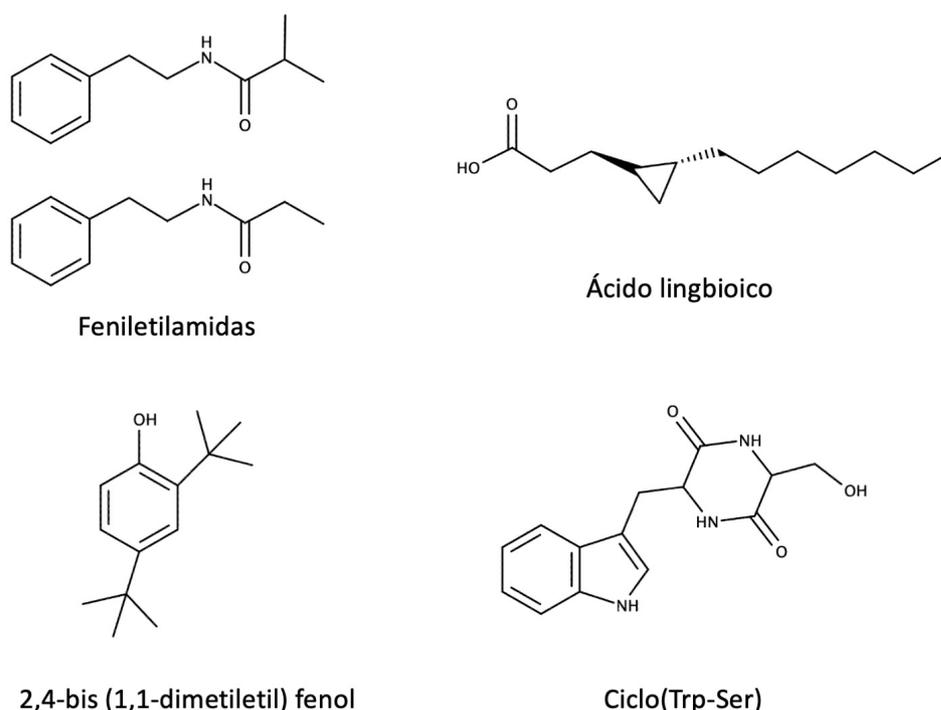


Figura 7. Ejemplos de compuestos QSIs obtenidos a partir de bacterias marinas.

b) *Quorum quenching*

Los mecanismos de degradación enzimática de QS están ampliamente distribuidos entre los microorganismos que habitan los ambientes marinos e hipersalinos y constituyen la forma más predominante de inhibición de la comunicación bacteriana (T. N. Wang et al., 2019). Entre las bacterias marinas y halófilas se han descrito las acilasas AiiC de *Anabaena sp.* (Romero et al., 2008), PfmA de *Pseudoalteromonas flavipulchra* (N. Liu et al., 2017) o la producida por la bacteria *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 (Torres et al., 2016). Del mismo modo, se han encontrado lactonasas como MomL (*Muricauda olearia*) (Tang et al., 2015), RmmL (*Ruegeria mobilis*) (Cai et al., 2018) ó Aii20J (*Tenacibaculum sp.*) (Mayer et al., 2015).

A partir de un metagenoma de un suelo hipersalino, tal y como se ha mencionado anteriormente, se identificó la enzima HqiA, que además constituyó una nueva familia de lactonasas (Torres et al., 2017).

Tal y como se ha revisado anteriormente, las lactonasas son más abundantes que las acilasas en la mayoría de los ambientes terrestres (Torres et al., 2019) ya que se pensaba que las acilasas eran más específicas (Muras et al., 2018). Sin embargo, en el medio salino se han encontrado mayoritariamente acilasas, siendo mucho mayor su abundancia relativa que la de las lactonasas, tanto mediante estudios clásicos (Torres et al., 2016, 2013) como con estudios metagenómicos *in silico* (Muras et al., 2018; Romero et al., 2012). Romero y colaboradores realizaron un análisis *in silico* de la presencia de enzimas QQ en metagenomas marinos de diverso origen: muestras del Océano Pacífico, de esqueletos de ballenas, y de bacterioplancton antártico y encontraron, como se ha adelantado anteriormente, una mayor prevalencia en la presencia de acilasas (Romero et al., 2012). Del mismo modo, en 2018, Muras y colaboradores también demostraron la mayor prevalencia de acilasas que de lactonasas en metagenomas del Mar Mediterráneo (Muras et al., 2018). En cualquier caso, ha quedado demostrado que las enzimas QQ están presentes en estos medios, pero, con la excepción de los mencionados trabajos, la información respecto a la presencia de enzimas QQ en los metagenomas de ambientes marinos y salinos es muy escasa.

El medio salino es un ambiente en el que ya se han encontrado moléculas y enzimas con distintos mecanismos de inhibición de los sistemas QS, aún debe ser estudiado con mayor profundidad para entender mejor los mecanismos y encontrar nuevos compuestos (Zhao et al., 2019). De hecho, los océanos contienen una rica biodiversidad microbiana en la que hay muchos compuestos bioactivos producidos por distintos microorganismos, indicando que el medio salino, y en especial el medio marino, pueden ser considerados una extraordinaria fuente de nuevos compuestos y enzimas con actividad inhibidora de los sistemas QS (Ma et al., 2018; Rehman y Leiknes, 2018; Romero et al., 2011).

1.4. Aplicaciones biotecnológicas de la interferencia de *quorum sensing*

Como se ha descrito anteriormente, los sistemas QS controlan numerosas funciones celulares, entre las que se incluyen la producción de biofilm, el control de la movilidad o la producción de enzimas líticas y toxinas. Por todo ello, la inhibición de QS se ha propuesto como una novedosa estrategia para luchar frente a las infecciones causadas por bacterias con sistemas QS y, con ello, frenar las pérdidas económicas causadas por las mismas (Grandclément et al., 2016; Torres et al., 2019). La estrategia en la que se basa el mecanismo general de interrupción de QS se conoce como “antivirulencia”, y su principal ventaja es que afecta a procesos celulares que no son esenciales para la vida de la bacteria, lo que podría disminuir la presión selectiva que ejerce la enzima o compuesto anti-QS (Borges y Simões, 2019). La interrupción de QS pretende “desarmar” a los patógenos, y así permitir que el sistema inmune del hospedador sea capaz de eliminar la infección (Saeki et al., 2020). La propia Organización Mundial de la Salud reconoce que las resistencias a antibióticos son un problema de salud global que amenaza la eficacia de los tratamientos médicos y que urge encontrar nuevos fármacos y dianas terapéuticas (WHO, 2017).

La interferencia de los sistemas QS es una estrategia novedosa y atractiva en la lucha frente a las infecciones bacterianas, al inhibir la producción de factores de virulencia sin afectar al crecimiento de la bacteria (Bzdrenga et al., 2017; Ye et al., 2019). Esta estrategia fue descrita en el 2000 por primera vez, con la descripción de una enzima que degradaba moléculas del tipo AHLs (Dong et al., 2000) y desde entonces ha sido estudiada en profundidad.

Una de las grandes ventajas de la interferencia de QS como estrategia frente a las infecciones es que al no frenar el crecimiento bacteriano, no se produce una presión selectiva que pueda inducir la aparición de resistencias (Bzdrenga et al., 2017). Sin embargo, parece que sí se pueden producir ciertas resistencias a la interferencia de QS (Defoirdt, 2018; Defoirdt et al., 2010; García-Contreras et al., 2013), si bien se ha determinado que las resistencias a las enzimas QQ serían las que menos posibilidad tendrían de aparecer (Defoirdt et al., 2010; García-Contreras et al., 2013). La interrupción de QS ya ha sido aplicada con éxito en los distintos campos que se recogen a continuación.

1.4.1. Acuicultura

En 2016, la producción de la acuicultura mundial fue de 80 millones de toneladas, frente a los 90,9 millones de toneladas procedentes de la producción de pesca de captura. Además, las mayores tasas de evolución de la acuicultura se dan en zonas en vía de desarrollo (África y Asia), siendo una herramienta vital para el acceso al pescado en estas comunidades. De hecho, entre los principales productores se encuentra Vietnam, Indonesia y Bangladesh. En este año 2020 se espera que la producción mediante acuicultura supere a la pesca tradicional, y en 2030 la acuicultura ya representará el 54,5 % de la producción mundial (FAO, 2018). Para

entender la magnitud de esta industria basta con comparar la evolución de los datos en los distintos años. Así, en 2017 en España se produjeron un total de 315.138 toneladas mediante acuicultura, con un valor de 580 millones, lo que supone un crecimiento de 9,6% en volumen de producción y 3,3% en valor con respecto a 2016 (https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/Medio_Marino.aspx).

Las enfermedades bacterianas son uno de los problemas más críticos en la acuicultura. Esto, unido a las estrictas regulaciones del uso de antibióticos y a la aparición de resistencias a los mismos, hace necesario encontrar nuevas estrategias alternativas al uso de los mismos (Grandclément et al., 2016).

Entre los principales patógenos que afectan a la acuicultura destaca la vibriosis, por producir altas tasas de mortalidad en casi cualquier tipo de organismo en acuicultura, desde moluscos a peces (Austin y Austin, 2012; Dubert et al., 2017). Otros patógenos importantes que afectan a la misma incluyen a distintas especies de *Photobacterium* o *Aeromonas* o incluso miembros de la familia *Pseudomonadaceae* (Austin y Austin, 2012). Los mencionados grupos de bacterias son gram negativas, y en muchas ocasiones se ha demostrado en las mismas la presencia de sistemas QS que controlan diversos factores de virulencia. Por ejemplo, en la familia *Vibrionaceae* la producción de AHLs es muy común (Rasmussen et al., 2014) y se ha demostrado que estas moléculas controlan diversos factores de virulencia en muchas especies patógenas de acuicultura como *V. anguillarum*, *V. harveyi* o *V. vulnificus* (Defoirdt et al., 2008; Milton et al., 1997; Valiente et al., 2009) o en otros miembros del mismo género como *Vibrio coralliilyticus*, *Vibrio mediterranei* y *Vibrio owensii*, en los que se ha demostrado que los sistemas QS mediados por AHLs regulan la producción de factores de virulencia como la producción de caseinasa, quitinasa o la movilidad (Torres et al., 2018).

En definitiva, se concluye que la patogenicidad de diversos microorganismos está directamente regulada por QS. Así, por ejemplo en *Vibrio coralliilyticus*, *Vibrio mediterranei* y *Vibrio owensii* su capacidad de producir la muerte tanto en el modelo de infección *Artemia salina* como en almejas estaba reducida en mutantes que producían enzimas QQ (Torres et al., 2018).

En otras familias como *Aeromonadaceae* también está descrito el control de factores de virulencia a través de la producción de AHLs (Lynch et al., 2002). Por ejemplo, en mutantes del receptor de AHLs de *A. hydrophila* se redujo la virulencia y se observó mayor supervivencia en larvas de lotas y células de carpas (Bi et al., 2007; Chu et al., 2011; Natrah et al., 2012).

La interrupción de QS ha sido probada con éxito en este campo. Respecto a la inhibición no enzimática, la información es más escasa, pero aún así hay varios ejemplos de éxito mediante esta estrategia. Por ejemplo, la furanona C-30 reduce la mortalidad de la trucha arcoíris causada por *V. anguillarum* (Rasch et al., 2004). También se ha demostrado que las furanononas brominadas protegen al modelo de infección *Artemia franciscana* de patógenos pertenecientes al género *Vibrio* gracias a la interferencia con el sistema mediado por AI-2 (Defoirdt et al., 2006). También han

sido probados extractos de actinomicetos en distintas especies de *Vibrio* con éxito, demostrando la capacidad de los inhibidores de QS de dispersar el biofilm causado por estos patógenos (You et al., 2007). Otro ejemplo es el uso de una baja concentración del extracto de pirogalol (extraído del té), que inhibe los sistemas QS y protege a las larvas de *Artemia franciscana* y de las gambas gigantes *Macrobrachium rosenbergii* del patógeno *V. harveyi*, si bien los datos parecen indicar que más que una inhibición de QS, los resultados se debieron a una producción de peróxidos (Defoirdt et al., 2013).

En relación al mecanismo de inhibición enzimática de los sistemas QS en acuicultura, sí existe en la actualidad mayor número de estudios (Torres et al., 2019). El uso de enzimas o cepas QQ se ha probado con éxito, por ejemplo, en peces cebras infectados con el patógeno *Aeromonas hydrophila* (Chu et al., 2014). También se ha demostrado que la adición de la enzima PfmA a nauplios de *Artemia* infectados con *P. aeruginosa* aumenta su supervivencia (N. Liu et al., 2017). Por su parte, la ya mencionada cepa QQ *Tenacibaculum* sp. 20-J ha demostrado ser capaz de disminuir la producción de AHLs en el patógeno *Edwardsiella tarda* (Romero et al., 2014) e incluso el uso de esta cepa en acuicultura está patentado (Otero et al., 2014). La adición de la cepa PQQ-42 de *A. stellipolaris* en tanques de cultivo también ha sido capaz de proteger a los corales de las infecciones de *V. mediterranei* gracias a la producción de una enzima QQ (Torres et al., 2016). Asimismo, la expresión de la enzima con actividad lactonasa HqiA en distintas cepas de *Vibrio* logró disminuir su virulencia y de hecho se observó mayor supervivencia en almejas tras su infección (Torres et al., 2018).

1.4.2. Agricultura

Entre los 10 patógenos más importantes que producen enfermedades infecciosas en la agricultura se encuentran bacterias como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya* spp., *Agrobacterium tumefaciens* o *Pectobacterium* spp. En el caso de *P. syringae*, ésta puede producir desde el moteo del tomate hasta el chancro sangrante del castaño de indias. *E. amylovora*, origina el fuego bacteriano en plantas ornamentales y frutales. Las especies de *Dickeya* causan podredumbre, principalmente de patatas, al igual que las especies de *Pectobacterium*. Por último, *Agrobacterium tumefaciens* causa tumores en diversas plantas (Mansfield et al., 2012).

En muchas especies bacterianas fitopatógenas se ha demostrado la presencia de sistemas QS mediados por AHLs que regulan la producción de enzimas hidrolíticas responsables de la virulencia (Dessaux et al., 2011; Mansfield et al., 2012). Por ejemplo, en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* o *P. atrosepticum*, causantes de la podredumbre blanda en patatas y zanahorias, se ha puesto de manifiesto que la producción de proteasas, pectinasas y celulasas depende de la producción de AHLs (Pirhonen et al., 1993). Del mismo modo, en otros patógenos mencionados anteriormente como *A. tumefaciens*, *E. amylovora*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum* o *Xanthomonas campestris* también se ha demostrado que las AHLs son los responsables del control de factores de virulencia (Quiñones et al., 2005; Venturi et al., 2004; von Bodman et al., 2003; Whitehead et al., 2001).

La información sobre los estudios de la interrupción de QS por vía no enzimática en agricultura es muy escasa. Se han probado con éxito con los compuestos piericidina A y glucopiericidina A que tienen actividad QSI y disminuyen los síntomas de podredumbre blanda en tubérculos de patata infectados con *P. carotovorum* (Kang et al., 2016). Del mismo modo, los inhibidores sintéticos derivados del imidazol también reducen los síntomas de las infecciones causadas por dicho patógeno (des Essarts et al., 2013). Por el contrario, la utilización de enzimas QQ en agricultura sí que ha sido utilizada en numerosas ocasiones. Por ejemplo, el gen de la lactonasa *aiiA* se consiguió expresar en plantas de lechuga y tabaco, y se consiguió reducir la infección provocada por *P. carotovorum* de forma muy eficaz (Dong et al., 2001, 2000). Ese mismo gen ha sido expresado también en *Amorphophallus konjac*, consiguiendo prevenir con éxito la infección causada por *P. carotovorum* (Ban et al., 2009). No obstante, no se han hecho ensayos con plantas transgénicas en el campo, ya que los ensayos con este tipo de organismos modificados genéticamente son mal aceptados por la sociedad y están altamente regulados por la legislación vigente (Bzdrenka et al., 2017; Helman y Chernin, 2015).

La eficacia de las enzimas QQ en la atenuación de la virulencia de los fitopatógenos también ha sido demostrada mediante la expresión de enzimas QQ en bacterias patógenas, consiguiendo mutantes con una menor producción de moléculas AHLs. Así, por ejemplo, la lactonasa HqiA ha sido introducida en *P. carotovorum* y su expresión ha logrado disminuir el daño que produce este patógeno en patatas (Torres et al., 2017). Del mismo modo, la expresión de la lactonasa AiiA en *Erwinia amylovora* reduce el daño que provoca en hojas de manzano (Molina et al., 2005). Otros ejemplos se pueden encontrar en la revisión de Kalia y colaboradores (2019).

Otra estrategia que se ha seguido en la agricultura consiste en el uso de bacterias productoras de enzimas QQ como herramientas de biocontrol en lugar de usar las enzimas o las plantas modificadas genéticamente (Helman y Chernin, 2015). El primer estudio se publicó en 2003, cuando Molina y colaboradores fueron capaces de reducir los síntomas de la infección en patatas por *P. carotovorum* usando bacterias que expresaban enzimas QQ (Molina et al., 2003). Desde entonces, hay numerosos experimentos, entre los que destacan el uso de cocultivos con *Rhodococcus* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Uroz et al., 2003). *Rhodococcus* tiene actividad QQ a través de la producción de la enzima lactonasa QsdA y es propia del suelo, por lo que puede ser una gran herramienta de biocontrol y bioestimulación (Barbey et al., 2013; Cirou et al., 2012). Otro ejemplo a destacar es la cepa *Pseudomonas segetis* P6, que es capaz de reducir *in vivo* la virulencia de los fitopatógenos *D. solani* y *P. atrosepticum* en tubérculos de patata, y de *P. carotovorum* en zanahorias cuando es utilizada en cocultivo con estos patógenos (Rodríguez et al., 2020).

1.4.3. Otras aplicaciones

Las bacterias QQ y sus enzimas han demostrado ser eficaces en la prevención de la formación del *fouling* en las membranas de los biorreactores usados en plantas de

tratamiento de aguas residuales a escala de laboratorio e incluso a nivel de plantas piloto (Lee et al., 2018, 2016). Los tratamientos que se han empleado incluyen tanto el bioaumento y la bioestimulación de bacterias productoras de enzimas QQ como la ingeniería de membranas o sistemas de liberación modificada de estas enzimas (Lee et al., 2018). También se ha demostrado la eficacia de la inhibición de QS, en este caso por vía no enzimática, para mitigar el biofouling que ocurre en las plantas desalinizadoras de agua (Katebian et al., 2016).

En lo que respecta al interés de la inhibición de los sistemas QS en Medicina, como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a los antibióticos es uno de los mayores desafíos actuales y es urgente la necesidad de encontrar nuevas estrategias para tratar las infecciones (WHO, 2017). Entre los principales patógenos multirresistentes a antibióticos sobre los que mayor atención se está poniendo a nivel de interrupción de QS se encuentra *P. aeruginosa* (Nathwani et al., 2014). De hecho, el 7,5% de las infecciones asociadas a los hospitales en Estados Unidos son debidas a este microorganismo (Bzdrenga et al., 2017). En este sentido, la inhibición de QS ha demostrado ser eficaz para evitar el daño al hospedador y luchar contra las infecciones provocadas por este patógeno, debido a que sus mecanismos de virulencia están controlados por sistemas QS (Soukarieh et al., 2018b). Por ejemplo, se han descrito algunos ensayos en los que se utilizan inhibidores de QS como el extracto de ajo, en pacientes con fibrosis quística infectados con *P. aeruginosa* (Bjarnsholt et al., 2005; Hurley et al., 2012). Otras moléculas QSIs que se han utilizado con éxito son las furanonas (Kim et al., 2008) (revisión en Proctor et al., 2020). También se han diseñado QSIs con potencial aplicación en infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística causadas por *P. aeruginosa*, en los que incluso se han realizado estudios farmacocinéticos (Sou et al., 2019). Otras investigaciones se han centrado en el uso concomitante de antimicrobianos y QSIs, como la llevada a cabo por Singh y colaboradores en 2019 en la que se demuestra que, mediante nanopartículas en las que se incluía una molécula QSI y el antimicrobiano ciprofloxacino, se conseguía reducir el biofilm producido por *P. aeruginosa* tanto *in vitro* como *ex vivo* en un modelo de infección tisular (N. Singh et al., 2019). Por su parte, en relación a los estudios realizados con enzimas QQ, se ha demostrado que se ha reducido la mortalidad de ratas infectadas por este patógeno mediante la administración de una formulación con lactonasa por vía inhalatoria (Hraiech et al., 2014) e incluso se ha demostrado que el uso combinado de enzimas QQ y antibióticos aumenta la eficacia de los mismos frente a infecciones causadas por *P. aeruginosa* en quemaduras en piel de ratas (Gupta et al., 2015). Hay ejemplos de uso combinado de distintas enzimas QQ (AqdC frente a quinonas y QsdA frente a AHLs) que originan un aumento en la supervivencia del modelo de infección en *Caenorhabditis elegans* (Birmes et al., 2019). Por otro lado, también se han descubierto inhibidores del sistema QS basado en quinolonas de *P. aeruginosa*, demostrando eficacia en la inhibición de biofilm (Soukarieh et al., 2018a).

Otra importante aplicación en la que se está investigando es el uso de catéteres funcionalizados con enzimas QQ. La infección por *P. aeruginosa* está muy relacionada con la colonización de catéteres por parte de este patógeno, que se adhiere a los mismos a través de la formación de biofilm. Distintos estudios han

demostrado la eficacia de las enzimas QQ en la prevención de la colonización de *P. aeruginosa* de estos catéteres (Costoya et al., 2019; Ivanova et al., 2015).

En definitiva, y como se ha visto en los anteriores apartados, la interrupción de los sistemas QS es una estrategia novedosa y prometedora en la lucha frente a las infecciones y daños causados por microorganismos en distintos campos, desde la acuicultura hasta la Medicina (Paluch et al., 2020). A continuación, en la tabla 3 se muestra un resumen con las aplicaciones de la interrupción de QS mencionadas, así como ejemplos de algunas de ellas.

Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones biotecnológicas de la interrupción de los sistemas QS.

Interrupción de QS	Aplicación	Patógeno	Sistema QS
Acuicultura			
Cinamaldehído (QSI)	Reducción de la virulencia en gamba gigante	<i>V. harveyi</i>	C6-HS
Pirogalol (QSI)	Reducción de la virulencia en gamba gigante	<i>V. harveyi</i>	C6-HS
Furanona C-30 (QSI)	Reducción de mortalidad de trucha arcoiris	<i>V. anguillarum</i>	O-C10
Patógenos que expresan HqiA (QQ)	Reducción de la virulencia en <i>Artemia salina</i> y almeja	<i>V. coralliilyticus</i> , <i>V. mediterranei</i> y <i>V. owensii</i>	AHLs, C4-OH-C
Cocultivos del patógeno con la cepa PQQ-42 (acilasa) (QQ)	Reducción de la mortalidad de corales	<i>V. mediterranei</i>	C4-OH-C
Enzima PfmA (QQ)	Reducción de mortalidad de <i>A. salina</i>	<i>P. aeruginosa</i>	C4-OH-C
Adición en el pienso de bacteria probiótica productora de AiiA (QQ)	Reducción de mortalidad de peces cebra	<i>A. hydrophila</i>	C4-OH-C
Agricultura			
Piericidina A y Glucopiericidina A (QSI)	Disminución de síntomas de podredumbre blanda en patata	<i>P. carotovorum</i>	C6-HS
Derivados del imidazol	Disminución de síntomas de podredumbre blanda en patata	<i>P. carotovorum</i>	C6-HS
Expresión en hojas de lechuga y tabaco de la lactonasa AiiA (QQ)	Disminución de daños a hoja de manzana	<i>P. carotovorum</i>	C6-HS

Tabla 3 (continuación). Ejemplos de aplicaciones biotecnológicas de la interrupción de los sistemas QS.

Interrupción de QS	Aplicación	Patógeno	Sistema QS
Adición de patógeno que expresa HqiA (QQ)	Disminución de síntomas de podredumbre blanda en patata	<i>P. carotovorum</i>	C6-HS
Adición de patógeno que expresa AiiA (QQ)	Disminución de daños a hoja de manzana	<i>E. amylovora</i>	3OC
Cocultivo del patógeno con <i>P. segetis</i> P6 (acilasa) (QQ)	Disminución de síntomas de podredumbre blanda en patata	<i>D. solani</i>	C6-
Cocultivo del patógeno con <i>P. segetis</i> P6 (acilasa) (QQ)	Disminución de síntomas de podredumbre blanda en patata	<i>P. atrosepticum</i>	O-C6- C8-
Cocultivo del patógeno con <i>P. segetis</i> P6 (acilasa) (QQ)	Disminución de síntomas de podredumbre em zanahoria	<i>P. carotovoum</i>	C6-HS
Otras aplicaciones			
Adición de bacterias QQ	Remediación de las membranas empleadas en los biorreactores para tratamientos de aguas residuales	Microorganismos productores de <i>biofouling</i>	
Vainillina, cinamaldehido, ácido kojico y furanona brominada (QSI)	Disminución de la producción de biofilm en las membranas	Microorganismos productores de <i>biofouling</i>	
Extractos de ajo (QSI)	Mayor eficacia de los antibióticos y del aclarado en un modelo de fibrosis quística en ratón	<i>P. aeruginosa</i>	C4-H
Furanona (QSI)	Reducción de biofilm <i>in vitro</i>	<i>P. aeruginosa</i>	C4-H
Administración de lactonasa inhalada Sso-Pox (QQ)	Reducción de la mortalidad de ratones	<i>P. aeruginosa</i>	C4-H
Administración de lactonasa QsdA en combinación con la enzima QQ AqdC, activa frente a quinolonas	Aumenta la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	C4-HS
Administración de lactonasa de <i>Bacillus</i> sp. ZA12 (QQ) y ciprofloxacino	Reducción de la virulencia en un modelo de quemadura murino	<i>P. aeruginosa</i>	C4-H
Inmovilización de acilasa de riñón porcino (QQ) en catéteres	Reducción de la producción de biofilm	<i>P. aeruginosa</i>	C4-H

2. Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral forman parte de una de las líneas de investigación que desarrolla el grupo de investigación BIO 188 “Exopolisacáridos Microbianos” de la Universidad de Granada, encaminada al estudio de la comunicación celular tipo QS en bacterias patógenas y su interferencia. Concretamente, este trabajo se encuentra enmarcado dentro de los objetivos del proyecto AGL2015-68806-R “Alternativa ecológica y sostenible para combatir la vibriosis en acuicultura: *quorum sensing* versus *quorum quenching*”.

La finalidad de este trabajo fue la selección y caracterización de bacterias productoras de nuevas enzimas y compuestos que interfirieran los sistemas QS, así como el estudio de los mecanismos implicados en esa inhibición, con el fin de poder utilizarlos *in vivo* como alternativa a los tratamientos antibióticos que se utilizan hoy en día para combatir las enfermedades infecciosas. Dado que el medio marino, y más concretamente los animales invertebrados marinos, son una fuente importante y desconocida en lo que respecta a estos compuestos de actividad biológica, este estudio se ha realizado con extensa colección de cepas bacterianas previamente aisladas de la microbiota de invertebrados marinos del tipo holoturias y anémonas, así como de sedimentos de los tanques de cultivo

Los objetivos de la tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Seleccionar y caracterizar nuevas bacterias capaces de interferir los sistemas *quorum sensing* a partir de una colección de aislados bacterianos, procedentes de la microbiota de organismos invertebrados marinos y sedimentos de los tanques de cultivo.
2. Caracterizar las enzimas o compuestos que interfieren en los sistemas *quorum sensing*.
3. Demostrar mediante ensayos de patogenicidad *in vivo* la efectividad de las bacterias marinas que interfieren con los sistemas *quorum sensing*.
4. Analizar la abundancia de las enzimas *quorum quenching* en una amplia variedad de metagenomas ambientales.

Objetivo adicional: profundizar en el mecanismo de acción de la enzima *quorum quenching* HqiA, previamente aislada por el grupo de investigación a partir de un metagenoma de suelo salino

3. Material y métodos

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado numerosas cepas bacterianas cuyas características se recogen en la siguiente tabla.

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

Cepa	Características	Referencia
Biosensores		
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Km ^R , <i>cvil</i> ::mini-Tn5, AHL- Detecta C4-HSL, C6-HSL y C8-HSL	Mcclean et al., 1997
<i>C. violaceum</i> VIR07	Km ^R , <i>cvil</i> ::Km ^R , AHL- Detecta C10-HSL y derivados	Morohoshi et al., 2008a
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZRL4)	Gm ^R , <i>traG</i> :: <i>lacZ</i> , AHL- Detecta C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL y derivados	Shaw et al., 1997
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	Cepa salvaje, sensible a Km	Morohoshi et al., 2008a
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pSB401)	<i>luxRI</i> :: <i>luxCDABE</i> , Tc ^R , detecta C6-C8-HSL y otras AHLs de cadena intermedia.	Winson et al., 1998
<i>E. coli</i> JM109 (pSB536)	<i>ahyR ahyI</i> :: <i>luxCDABE</i> ; Amp ^R ColE1 detecta C4-HSL y otras AHLs de cadena corta.	Winson et al., 1998
<i>E. coli</i> JM109 (pSB1142)	<i>lasR, lasRII</i> :: <i>luxCDABE</i> , Tc ^R , detecta C10-C14-HSL y otras AHLs de cadena larga.	Winson et al., 1998
Cepas de <i>E. coli</i> para la expresión de genes y purificación de proteínas		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>relA1, lacZΔM15, supE44, thi-1</i>	Woodcock et al., 1989
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44, recA1, hsdR17, gyrA46, thi, relA1, lac-F'</i>	Bullock y O., 1987
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	Cm ^R , <i>dcm ompT hsdS gal λ(DE3)</i>	Promega
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa salvaje	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>lecA</i> :: <i>luxCDABE</i>	Contiene construcción genómica de <i>lecA</i> fusionado a <i>luxCDABE</i>	Winzer et al., 2000
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>lasI</i> :: <i>luxCDABE</i>	Contiene construcción genómica de <i>lasIA</i> fusionado a <i>luxCDABE</i>	Kumari et al., 2006; Winson et al., 1998
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>rhII</i> :: <i>luxCDABE</i>	Contiene construcción de <i>rhII</i> fusionado a <i>luxCDABE</i>	Kumari et al., 2006; Winson et al., 1998
Cepas patógenas de corales, moluscos y plantas		
<i>Vibrio mediterranei</i> VibC-Oc-97	Patógeno de corales	Rubio-Portillo et al., 2014
<i>V. owensii</i> VibC-Oc-106	Patógeno de corales y moluscos	Rubio-Portillo et al., 2014
<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	Patógeno de corales	Rubio-Portillo et al., 2014
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225 ^T	Patógeno de plantas	Hauben et al., 1998

La colección de cepas marinas objeto de este estudio está formada por 827 aislados procedentes de la microbiota y heces de anémonas (*Anemonia sulcata* y *Actinia*

equina) y pepinos de mar (*Holothuria tubulosa* y *H. forskali*), así como de sedimentos de los tanques en los que se cultivaban. Estas cepas habían sido previamente aisladas por el grupo de investigación BIO 188 a partir de los animales invertebrados cultivados en las instalaciones de iMare Natural, S.L., en Motril, Granada (36° 44' 33.4" N 3°31' 12.1" O) (León-Palmero et al., 2018). Las cepas y sus características se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Cepas marinas objeto de estudio.

Muestra y número de cepas	Animal	Procedencia	Fotografía*
M1 (90 cepas)	<i>Anemonia sulcata</i>	Tentáculos	
M2 (102 cepas)	<i>Anemonia sulcata</i>	Intestino	
M3 (156 cepas)	<i>Holothuria tubulosa</i>	Intestino	
M4 (126 cepas)	<i>Holothuria tubulosa</i>	Líquido celómico	
M5 (126 cepas)	<i>Holothuria forskali</i>	Intestino	
M6 (66 cepas)	<i>Holothuria forskali</i>	Líquido celómico	
M7 (12 cepas)	<i>Actinia equina</i>	Tentáculos	
M8 (24 cepas)	<i>Actinia equina</i>	Intestino	
M9 (87 cepas)	<i>Holothuria</i> spp.	Heces	
M10 (38 cepas)	Sedimento del tanque		

*Las fotografías proceden de León-Palmero et al., 2018

Las condiciones de cultivo generales fueron las siguientes, excepto que se indique lo contrario en los apartados correspondientes. Las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* se crecieron en el medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. Los biosensores *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) se cultivaron en LB a 28°C. En el caso de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) el medio se suplementó con calcio (2,5mM CaCl₂·2H₂O) y magnesio (2,5mM MgSO₄·7H₂O). Las cepas marinas y las cepas de *Vibrio* se cultivaron en medio caldo marino (CM) a 28°C. La cepa patógena de plantas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T se creció en medio TSB o LB a 28°C. Los cultivos líquidos siempre se incubaron con una agitación de 120 rpm.

La conservación de las cepas a corto plazo se realizó mediante resiembras en medio sólido y a 4°C. Cuando se requerían guardar a largo plazo, se prepararon cultivos líquidos con una concentración final de glicerol de 25% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

Los plásmidos utilizados en este trabajo como vectores de clonación y expresión de genes se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Vectores utilizados en este trabajo y sus características.

Vector	Características	Referencia
pGEM-T-Easy	Ap ^R , vector de clonación de productos de PCR con cola de poli-T	Promega®
pME6000	Tc ^R , vector de amplio rango de hospedadores	Lefebre y Valvano, 2002
pJN105	Gm ^R , vector de amplio rango de hospedadores	Newman y Fuqua, 1999
pGEX-4T-2	Ap ^R , vector de expresión con cola de glutatión-S-transferasa	GE-Healthcare®
pMAL-c2TEV	Ap ^R , vector de clonación para expresión de proteínas con cola de proteína de unión a maltosa	New England Biolabs®
pET24b (+)	Km ^R , vector de clonación para expresión de proteínas con cola de histidina	Novagen®
pCold	Ap ^R , vector de expresión de proteínas con cola de histidina adaptado al frío	TaKaRa Bio®
pCold-GST	Ap ^R , vector de expresión de proteínas con cola de histidina y con cola de glutatión-S-transferasa adaptado al frío	TaKaRa Bio®

3.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se han utilizado en este trabajo se describen a continuación. En todos ellos, cuando fue necesario, el pH se ajustó a 7,0 ± 0,2 con NaOH 1M ó HCl 1M y la esterilización se llevó a cabo en autoclave a una temperatura de 121°C y a una presión de 1 atm durante 20 min. Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se utilizó Bacto-Agar (Difco®) a una concentración del 1,5% (p/v), excepto para los medios de ensayo de la movilidad. En la movilidad tipo swimming, se usó 0,3% (p/v) de agar, en el ensayo de swarming, 0,5% (p/v) de agar, y en la movilidad tipo twitching, un 1% (p/v).

Caldo marino (CM). Medio deshidratado comercial (Difco®) empleado para cultivar las bacterias marinas.

Medio CM tamponado. Utilizado para crecer la bacteria *Rhodospirella baltica*, consistente en medio CM suplementado con 5mM de Tris-HCl 0,1M pH 7,5.

Medio Agar marino (AM). Se preparó añadiendo agar al 1,5% (p/v) al medio CM comercial.

Medio Luria-Bertani (LB). Medio ordinario para el crecimiento de bacterias.

Bactotripton (Difco®).....	5 g
Extracto de levadura (Cultimed®).....	5 g
NaCl (Panreac®).....	10 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medio Tripton-Soja (TSB). Medio ordinario líquido deshidratado (Panreac®) para el crecimiento de bacterias patógenas de plantas.

Medio Tripton-Soja (TSA). Medio ordinario sólido deshidratado (Cultimed®) para el crecimiento de bacterias patógenas de plantas.

Medio AB (Chilton et al., 1974). Medio empleado para cultivar la cepa bioindicadora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), y revelar la presencia de moléculas señal AHLs. Una vez esterilizado se le adicionó 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 80 µg/ml.

Manitol (Panreac®).....	2 g
Tampón fosfato ^a 20X.....	50 ml
Solución de sales ^b 20X.....	50 ml
Bacto-Agar (Difco®).....	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

^aTampón fosfato (20X): K₂HPO₄, 60 g; NaH₂PO₄, 20 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

^bSolución de sales (20X): NH₄Cl, 20 g; CaCl₂·2H₂O, 0,2g; MgSO₄·7H₂O, 6 g; KCl, 3 g; FeSO₄·7H₂O, 0,05 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

El tampón fosfato y la solución de sales se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min. Tras enfriarse, se adicionaron al resto de componentes en condiciones estériles.

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

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

Los siguientes medios se emplearon para determinar actividades fenotípicas en las cepas afectadas en los ensayos de QQ:

Medio LB almidón y AM almidón (Barrow y Feltham, 1993). Medios utilizados para evaluar la actividad amilasa de cepas patógenas de plantas y de cepas marinas. Se prepararon añadiendo al medio LB o CM un 1% (p/v) de almidón y 1,5% (p/v) de agar. Para el revelado se vertió lugol en la placa.

Medio LB caseína y AM caseína (Barrow y Feltham, 1993). Medios utilizados para evaluar la actividad proteolítica de cepas patógenas de plantas y cepas marinas. Se realizaron preparando el medio LB o CM con la mitad de volumen final de agua y 1,5% (p/v) de agar. Una vez esterilizado el medio, se le añadió el mismo volumen de leche desnatada.

Medio LB Tween 20 y AM Tween 20 (Mourey y Kilbertus, 1976). Medios empleados para evaluar la actividad lipolítica de cepas patógenas de plantas y de bacterias marinas. Se prepararon añadiendo al medio LB o CM un 1% (v/v) de Tween 20 y 1,5% (p/v) de agar.

Medio LB Tween 80 y AM Tween 80 (Mourey y Kilbertus, 1976). Medios empleados para evaluar la actividad lipolítica de cepas patógenas de plantas y de cepas marinas. Se prepararon añadiendo al medio LB o CM un 1% (v/v) de Tween 80 y 1,5% (p/v) de agar.

Medio LB quitina (Wu et al., 2009). Medios empleados para evaluar la actividad quitinolítica de cepas patógenas de plantas y de cepas marinas. Se prepararon añadiendo al medio LB o CM un 1 % (p/v) de quitina soluble y 1,5% (p/v) de agar. La quitina insoluble (Sigma®) fue previamente solubilizada en HCl 10N y precipitada con etanol 96% (v/v) frío.

Medio LB-fosfatasa alcalina (PVK) y CM-fosfatasa alcalina (PVK) (Baird-Parker, 1963). Medios empleados para detectar la producción de la enzima fosfatasa alcalina en cepas patógenas de plantas o en cepas marinas. Se prepararon añadiendo 1 ml de fosfato de fenoftaleína 0,01% (p/v) (Merck) (previamente esterilizado por filtración) al medio LB o al medio CM junto con agar al 1,5% (p/v) tras su previa esterilización en autoclave.

Medio fosfatasa ácida (Pikovskaya, 1948) Medio empleado para detectar la producción de la enzima fosfatasa ácida. Antes de autoclavar, se ajustó el pH a 7,5.

Glucosa.....	5 g
MgCl ₂	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
KCl.....	0,1 g
NH ₄ NO ₃	2 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g
Agar.....	15 g
Agua destilada c.s.p. ...	1000 ml

Medio LB-esculina y AM-esculina (Choopun et al., 2002). Medios utilizados para detectar la hidrólisis de la esculina. Se prepararon a partir del medio LB o CM, adicionado de 1,5% de agar (p/v), 0,5% (p/v) de esculina y 0,05% (p/v) de cloruro férrico.

Medio DNAsa (Jeffries et al., 1957). Medio deshidratado (Cultimed®) empleado para detectar la producción de la enzima DNAsa. Para revelarlo se utilizó HCl 1N.

Medio gelatina. Medio deshidratado comercial (Difco®) para evaluar la hidrólisis de la gelatina.

Medio mínimo deficiente en hierro (MM) (Ren et al., 2005). Medio utilizado para la sobreproducción de pioverdina en *P. aeruginosa*.

K ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
K ₂ SO ₄	0,2 g
Succinato de sodio.....	9,15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medio agar sangre. Medio comercial (Beckton Dickinson) utilizado para evaluar la actividad hemolítica.

Medio mínimo M9 (Schleheck et al., 2009). Medio utilizado para cuantificar la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

Sales M9* 5X.....	20 ml
Glucosa 20% (p/v).....	2 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 µl
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1M.....	10 µl
Agua destilada c.s.p.	100 ml

*Solución de sales M9 5X: Na₂HPO₄·7H₂O, 64 g; KH₂PO₄, 15g; NaCl, 2,5 g; NH₄Cl, 5 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

3.3. Antimicrobianos

Los antimicrobianos utilizados se recogen en la tabla 7. En todos los casos se prepararon stocks de los mismos a una concentración 1000X. Cuando el disolvente utilizado fue agua bidestilada, las soluciones se esterilizaron por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm y se almacenaron a -20°C en alícuotas.

Tabla 7. Antimicrobianos utilizados en este trabajo.

Antimicrobiano	Disolvente	Concentración final
Gentamicina (Gm)	Agua bidestilada	50 µg/ml
Kanamicina (Km)	Agua bidestilada	50 µg/ml
Cloranfenicol (Cm)	Etanol 96% (v/v)	50 µg/ml
Ampicilina (Ap)	Agua bidestilada	100 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	Etanol 70% (v/v)	25 µg/ml (125 µg/ml en el caso de cepas de <i>E. coli</i>)

3.4. Moléculas AHLs

Las moléculas señal del tipo *N*-acilhomoserina lactonas (AHLs) fueron suministradas por la casa comercial Sigma®. Se prepararon stocks de las mismas a una concentración de 10 mM para ser usadas, excepto si se indica lo contrario, a una concentración final de 10 µM. Los stocks se prepararon en metanol 70% (v/v). Concretamente, las AHLs utilizadas fueron: *N*-butanoil-DL-homoserina lactona (C4-HSL), *N*-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-HSL), *N*-3-oxohexanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C6-HSL), *N*-octanoil-DL-homoserina lactona (C8-HSL), *N*-3-oxooctanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C8-HSL), *N*-decanoil-DL-homoserina lactona (C10-HSL), *N*-3-hidroxicanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C10-HSL), *N*-dodecanoil-DL-homoserina lactona (C12-HSL), *N*-3-oxododecanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C12-HSL) y *N*-tetradecanoil-DL-homoserina lactona (C14-HSL).

Cabe destacar que también se utilizaron otras AHLs no comerciales obtenidas por síntesis química y cedidas a nuestro laboratorio por cortesía del laboratorio del Dr. Miguel Cámara (Universidad de Nottingham): *N*-3-oxobutanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C4-HSL), *N*-3-hidroxiobutanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C4-HSL), *N*-3-hidroxihexanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C6-HSL), *N*-3-hidroxiocanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C8-HSL), *N*-3-oxodecanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C10-HSL), *N*-3-hidroxi-dodecanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C12-HSL), *N*-oxotetradecanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C14-HSL) y *N*-hidroxitetradecanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C14-HSL).

3.5. Otras soluciones

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

IPTG. La solución de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se preparó a una concentración de 200 mg/ml en agua bidestilada y posteriormente se esterilizó por filtración.

Buffer PBS. La solución tampón utilizada para realizar lavados de células y para las reacciones de QQ tiene la siguiente composición:

NaCl.....	8 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Agua destilada c.s.p. ...	1000 ml

Soluciones para la extracción de ADN genómico. Se utilizaron las soluciones descritas en el protocolo de extracción de ADN de Martín-Platero et al. (2007).

- Solución 1: sacarosa 10% (p/v); Tris-HCl 1 M (pH=8).
- Solución 2: Tris-HCl 1 M (pH=8); EDTA 0,5 M; NaCl 5 M; SDS 10% (p/v).
- Solución 3: acetato sódico 3M (pH=5).

Soluciones para la extracción de ADN plasmídico. Para la extracción de plásmidos se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución 1: glucosa 1% (p/v); Tris-HCl 25mM; EDTA 10 mM, (pH=8)
- Solución 2: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v)
- Solución 3: acetato potásico 3M, ácido acético glacial 11,5% (v/v).

Soluciones y reactivos para la electroforesis de ADN en geles de agarosa.

- Solución tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 10X): Tris 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 20 mM (pH=8).
- Solución tampón de carga para muestras de ADN 5X: Loading Buffer Blue (Bioline®).
- Solución para teñir el ADN (RedSafe) (Intron Biotechnology®).
- Marcador de peso molecular de ADN (Hyperladder I o Hyperladder IV) (Bioline®).

Soluciones y reactivos para el análisis de proteínas mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Gel apilador (para 10 ml)

Agua bidestilada	5,95 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	2,5 ml
10% (p/v) SDS	0,1 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8% p/v)	1,34 ml
10%(p/v) persulfato amónico (APS).	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Gel separador (para 10 ml)

Agua bidestilada	2,3 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,6 ml
10% (p/v) SDS	0,6 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0,8% p/v)	2 ml
10%(p/v) persulfato amónico (APS).	0,06 ml
TEMED	0,006 ml

Solución de tñido: azul coomasie R-250 0,1% (p/v); ácido acético glacial 10% (v/v); metanol 40% (v/v).

Solución de desteñido: ácido acético glacial 10% (v/v), metanol 20% (v/v).

Solución tampón de electroforesis (running buffer): Tris base 25mM, Glicina 200mM, SDS 0,1% (p/v)

Solución tampón de carga 5X: glicerol 30% (v/v); SDS 10% (v/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v); Tris pH 6,8 0,2 M; Azul de bromofenol 0,05% (v/v).

Soluciones para la purificación de proteínas. En función del tipo de purificación llevada a cabo (mediante colas de glutatión-S-transferasa, histidina o proteína de unión a maltosa) se utilizaron distintos buffers:

Tampón para purificación con GST:

Tris HCl.....	20 mM
EDTA.....	1 mM
NaCl.....	200 mM

Ajustar pH a 7,5

Para eluir la columna, añadir Glutation 10 mM

Tampón para purificación con MBP:

Tris HCl.....	20 mM
EDTA.....	1 mM
NaCl.....	200 mM

Ajustar pH a 7,5

Para eluir la columna, añadir Maltosa 10 mM

Tampón para purificación mediante colas de histidina: tampón comercial incluido en el kit QIAexpress Ni-NTA Fast Start®.

3.6. Ensayo de antagonismo

A partir de un cultivo de 24h en LB de las bacterias patógenas (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Vibrio* spp. y *P. carotovorum*) y con la ayuda de un hisopo estéril, se sembró una sobrecapa de cada microorganismo en medio sólido LB en placa petri. A continuación, se realizaron pocillos en las placas con ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se añadieron alícuotas de 100 μ l del sobrenadante de un cultivo de 24h de cada una de las cepas a ensayar. Tras 24h de incubación a 28°C, se midieron las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los pocillos.

3.7. Estudios de inhibición de sistemas *quorum sensing* mediante mecanismos no enzimáticos

3.7.1. Ensayos de la actividad inhibidora de sistemas *quorum sensing*

El primer screening de detección de actividad QSI se realizó en placa microtiter de 96 pocillos. El ensayo se llevó a cabo utilizando la metodología puesta a punto en este trabajo (figura 8A). Se partió de una placa microtiter con cultivos de 24h en CM de 200 μ l de cada una de las cepas a ensayar. Seguidamente, se transfirió un volumen de 20 μ l de los mismos a nueva placa microtiter de 96 pocillos que contenía 100 μ l de LB sólido, a la que posteriormente se añadieron 100 μ l de LB semisólido (0,7%), previamente inoculado con el biosensor *C. violaceum* ATCC 12472. Las placas se incubaron durante 24h a 28°C para que se desarrollara el color violeta debido al pigmento violaceína. Las cepas correspondientes a los pocillos en los que no aparecía color violeta fueron seleccionadas. En todos los casos se utilizaron como controles negativos pocillos a los que se transfirió 20 μ l de CM sin inocular.

La actividad inhibidora de sistemas QS de las cepas seleccionadas en el ensayo en placa microtiter se comprobó mediante ensayo de difusión en placa petri (figura 8B). Para ello, las cepas a ensayar se crecieron en medio CM durante 24h y 20 μ l de cada cultivo se depositaron en placas de LB a las que previamente se les había extendido una sobrecapa del biosensor *C. violaceum* ATCC 12472. Las placas se incubaron a 28°C durante 24h para permitir que se desarrollara el color violeta debido a la producción del pigmento violaceína. Tras la incubación se midió el halo de inhibición del color violeta. Este ensayo se repitió tres veces. Como control negativo se inocularon en cada placa 20 μ l de CM estéril.

Un esquema del proceso completo, incluyendo el primer ensayo en placa microtiter y el ensayo en placa petri, se muestra en la figura 8.

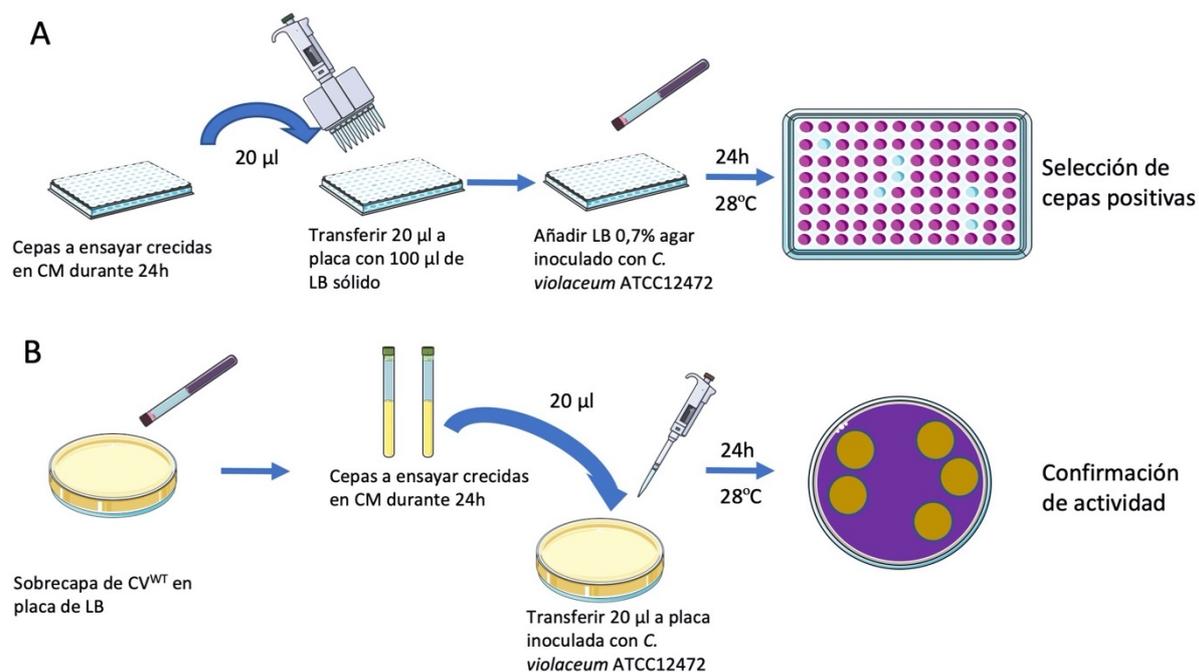


Figura 8. Esquema del ensayo de inhibici33n de QS. A. Ensayo en placa microtiter. B. Confirmaci33n en placa petri.

3.7.2. Obtenci33n de extractos celulares y comprobaci33n de la actividad inhibidora de *quorum sensing*

Los extractos metan33licos de las cepas seleccionadas por su capacidad de inhibici33n de los sistemas QS se prepararon siguiendo la metodolog33a descrita previamente por Saurav et al. (2016) y Teasdale et al. (2011). Para ello, las cepas a ensayar se crecieron en 20 ml de CM y se incubaron durante 5 d33as a 28°C. Tras centrifugar los cultivos, se separ33 el sobrenadante del pellet en cada caso. El pellet fue resuspendido en 25 ml de metanol puro, sonicado durante 15 min en un ba33o de agua a temperatura ambiente y posteriormente agitado durante 30 min. A continuaci33n, se centrifug33 y el sobrenadante se evapor33 para generar el correspondiente extracto, resuspendi33ndolo de nuevo en metanol puro a una concentraci33n final de 8 mg/ml. Del mismo modo, el sobrenadante de cada uno de los cultivos se mezcl33 con acetato de etilo y se decant33 para recoger la fase org33nica. Este proceso se repiti33 tres veces. Finalmente, se evapor33 para conseguir el extracto que nuevamente se resuspendi33 en metanol puro a una concentraci33n final de 8 mg/ml.

3.7.3. Fraccionamiento bioguiado de los extractos celulares mediante cromatograf33a e identificaci33n de los compuestos activos

El ensayo de fraccionamiento bioguiado para identificar los compuestos responsables de la actividad inhibidora de QS se realiz33 a partir de un cultivo de 3 L de la cepa seleccionada en medio CM a 28°C crecido durante 5 d33as. Seguidamente, se centrifug33 el cultivo y el pellet celular se extrajo con 600 ml de metanol puro, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez seco, el extracto metan33lico se resuspendi33 en 45 ml de metanol puro y se a33adi33 a los aproximadamente 3 L del

sobrenadante procedente del cultivo. La solución resultante se cargó en una columna rellena de la resina SP207ss (65g, 32 x 100 mm) y después se lavó con un volumen de agua. A continuación, se eluyó en un dispositivo CombiFlash®, usando un gradiente de concentración creciente de acetona en agua, a una velocidad de 8 ml/minuto, recogiendo 20 ml en cada fracción. Por cada etapa del gradiente se incrementó en un 20% (v/v) la concentración de acetona, y cada etapa duró 5 min, hasta llegar al 100% de acetona. Las fracciones se evaporaron y se comprobó su actividad inhibidora de QS a una concentración final de 0,8 mg/ml mediante ensayo de difusión en placa. Las fracciones activas se agruparon y se refraccionaron mediante HPLC semipreparativa (Atlantis Prep T3, 5 μ m, 10 x 150 mm, 15% (v/v) a 25 % (v/v) de acetonitrilo en agua durante 35 min, detección UV a 210 y a 280 nm, 3,6 ml/min, 1,8 ml/fracción) en un dispositivo GILSON GX-281 322H2 LC para generar así un total de 80 fracciones.

Las fracciones se secaron y posteriormente se resuspendieron en metanol puro, se diluyeron a tres concentraciones distintas y se determinó la actividad inhibidora de QS mediante ensayo de difusión en placa para facilitar la discriminación de la fracción más activa.

Las fracciones activas se analizaron posteriormente mediante LC-DAD-HRMS, en un espectrofotómetro Briker maXis QTOF acoplado a un cromatógrafo Agilent 1200 (Martín et al., 2014). La desreplicación se llevó a cabo usando las bases de datos de la Fundación MEDINA (Martín et al., 2014; Pérez-Victoria et al., 2016) para así identificar la estructura química de los compuestos en las fracciones bioactivas de HPLC. También se realizó un ensayo de RMN tras reconstituir cada fracción bioactiva en metanol deuterado. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker Avance II (500 y 125 Mhz para ^1H y ^{13}C , respectivamente, equipado con MicroCryoprobe de 1,7 mm, usando la señal residual del disolvente como referencia interna (δ_{H} 3,21 y δ_{C} 49,11 ppm para CD_3OD). Cuando fue necesario, se compararon los datos de los distintos espectros de LC-DAD-HRMS y RMN con los previamente identificados para las moléculas similares que fueron identificadas (Gutiérrez et al., 2006; Rustamova et al., 2019; Sun et al., 2015; Ye et al., 2017).

3.8. Estudios de la interferencia de *quorum sensing* mediante mecanismos enzimáticos: *quorum quenching*

3.8.1 Ensayo de difusión en placa para analizar la actividad *quorum quenching*

El ensayo de la actividad QQ frente a AHLs sintéticas en placa microtiter se llevó a cabo empleando la siguiente metodología. Se partió de una placa microtiter de 96 pocillos con cultivos de 24h en CM de 200 μ l de cada una de las cepas a ensayar. Seguidamente, en cada pocillo se añadió C10-HSL a una concentración final de 10 μ M y la reacción se incubó a 28°C durante 24h en agitación a 120 rpm. A continuación, 20 μ l de cada reacción de QQ se transfirió a una nueva placa microtiter, que contenía 200 μ l de LB semisólido (0,7% (p/v) de agar, previamente inoculado con el biosensor *C. violaceum* VIR07. Finalmente, se incubaron las placas durante 24h a 28°C para que se desarrollara el pigmento violaceína. Las cepas correspondientes a los pocillos

en los que no aparecía color violeta fueron seleccionadas. Como control negativo se utilizaron pocillos a los que se añadió CM estéril.

El ensayo de difusión en placa petri para determinar la actividad QQ frente a AHLs sintéticas se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita y que se muestra en la figura 9 (Romero et al., 2011; Torres et al., 2016). Para ello, se añadieron AHLs a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ a $300 \mu\text{l}$ de un cultivo de 24h de cada una de las cepas a ensayar, y la reacción se incubó a 28°C durante 24h en agitación. Como control negativo, se añadió la misma concentración de AHLs a $300 \mu\text{l}$ de CM estéril sin inocular, y se incubó en las mismas condiciones. Tras la incubación, se comprobó el pH para comprobar que no había subido por encima de $\text{pH} = 7$, lo que podría haber abierto el anillo de lactona por un mecanismo no enzimático. A continuación, se centrifugaron los cultivos durante 5 min a 13.000 rpm y alícuotas de $100 \mu\text{l}$ de los sobrenadantes se añadieron a pocillos realizados en la superficie de placas de LB o AB-Xgal a las que previamente se les había extendido una sobrecapa del correspondiente biosensor. Las placas se incubaron a 28°C durante 24h para su revelado. Aquellas cepas correspondientes a los pocillos en los que no se observara dicho color, se seleccionarían por su capacidad QQ.

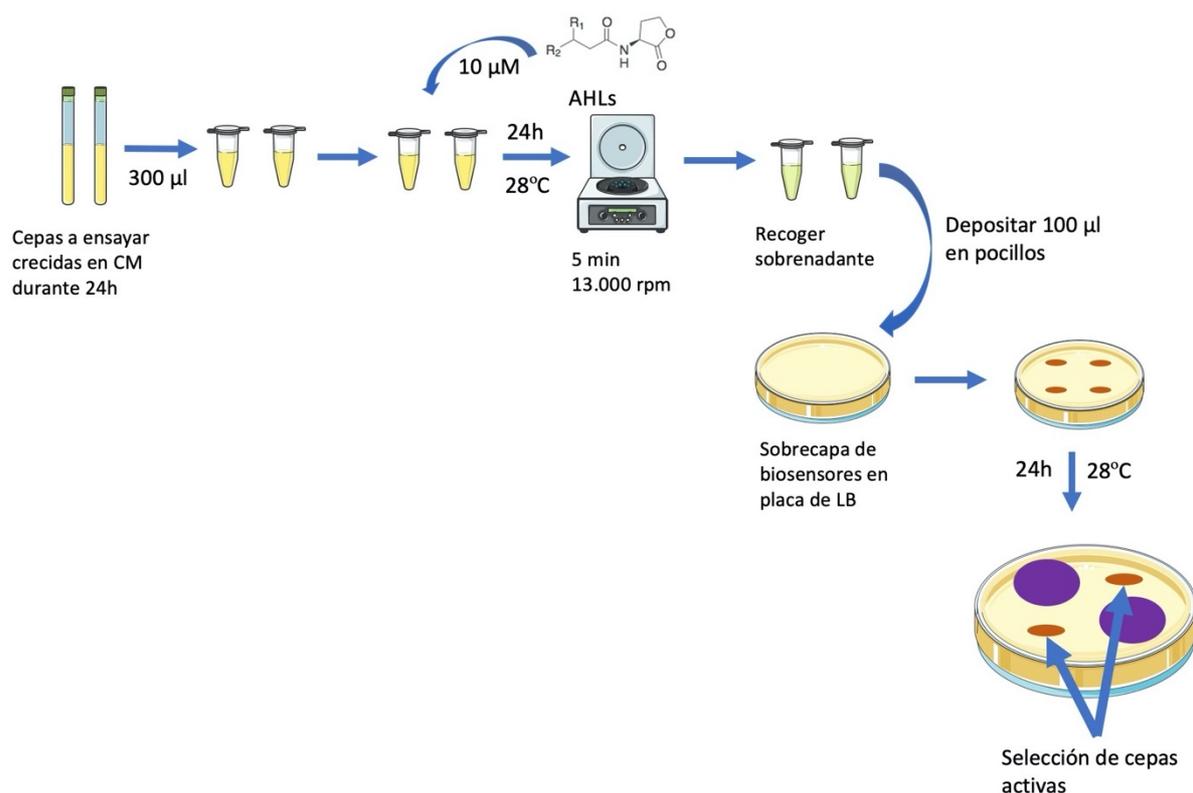


Figura 9. Esquema del ensayo de QQ en placa petri.

El ensayo de difusión en placa petri para determinar la actividad QQ frente a AHLs de origen natural, es decir, producidas por cepas patógenas, se realizó de forma similar al anterior, pero con algunas modificaciones. Antes de proceder al ensayo, las AHLs

de los patógenos se extrajeron siguiendo la metodología descrita previamente (Llamas et al., 2005; Marketon et al., 2002). Brevemente, 500 μ l de cultivos de 24h de las cepas patógenas se mezclaron dos veces con diclorometano o con acetato de etilo acidificado. Tras recuperar la fase orgánica, ésta se llevó a sequedad y las AHLs se resuspendieron en metanol 70 % (v/v) y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso. Concretamente, se resuspendieron en 20 μ l en el caso de *Vibrio* spp., 500 μ l para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, y 50 μ l para *P. aeruginosa* PAO1. Seguidamente, 5 μ l de cada extracto se añadieron a 5 ml de cultivos de 24h en CM de cada una de las bacterias marinas seleccionadas y tras su incubación a 28°C durante 24h en agitación, se detectaron las AHLs remanentes mediante el ensayo de difusión en placa descrito anteriormente. Como control, se realizó el mismo proceso de extracción con los medios de cultivo estériles, y dichos extractos se añadieron a las cepas a ensayar.

3.8.2. Determinación de actividad lactonasa

Se determinó si la capacidad de degradación de AHLs de las cepas seleccionadas se determinó era debida a una enzima lactonasa mediante un ensayo de acidificación (Uroz et al., 2005; Yates et al., 2002). Este ensayo se basa en el hecho de que, en condiciones ácidas, si la enzima QQ es de tipo lactonasa, la reacción es reversible y el anillo lactónico puede volver a cerrarse y la AHL recuperaría su estructura. Para ello, los cultivos de 24h de las cepas a ensayar se suplementaron con AHLs a una concentración final de 10 μ M. Tras 24h de incubación, los cultivos se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se separó en dos alícuotas. A una de ellas se les extrajo las AHLs tal y como se ha explicado anteriormente. La otra alícuota se acidificó con HCl 1 N hasta pH 2 y la reacción se incubó a 28°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, las AHLs se extrajeron y se resuspendieron en metanol 70% (v/v). Finalmente, las AHLs se detectaron utilizando el ensayo de difusión en placa descrito anteriormente. En cada condición de pH, como control se utilizó la misma concentración de AHLs en medio sin inocular.

3.8.3. Localización de la actividad *quorum quenching*

Para determinar si la actividad QQ de las bacterias seleccionadas se debía a enzimas que se secretaban o bien era una actividad intracelular, se realizó un ensayo de QQ con el sobrenadante y el lisado celular en cada caso, siguiendo la metodología descrita previamente (Romero et al., 2014). Brevemente, cultivos de 15 ml en CM de 24h de las cepas a ensayar se centrifugaron durante 5 min a 4.000 rpm. Por una parte, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana Millipore de 0,22 μ m para eliminar los restos celulares y se conservó a 4°C hasta su uso. Por otra parte, el pellet celular se lavó con 15 ml de PBS a pH 6,5 y tras una nueva centrifugación se resuspendió 15 ml del mismo buffer. Posteriormente, se sonicó en hielo durante 5 min con pulsos de 0,5 segundos y amplitud del 100% y así poder romper la pared y membrana celular. Tras su centrifugación durante 10 min a 4.000 rpm, el sobrenadante se recogió y filtró a través de un filtro Millipore® de 0,22 μ m para obtener el extracto celular crudo (ECC), que se conservó a 4°C hasta su uso. Finalmente, se

calculó la concentración de proteínas siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976) tanto del ECC como del sobrenadante que posteriormente se ensayaron frente a AHLs sintéticas siguiendo el ensayo de difusión en placa explicado anteriormente.

3.8.4. Análisis de la actividad *quorum quenching* mediante HPLC/MS

La actividad QQ de las cepas seleccionadas se confirmó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS). Para ello, se utilizó la metodología descrita previamente (Romero et al., 2011; Torres et al., 2016). Para ello, a 500 μ l de cultivos de 24h en CM de cada una de las cepas seleccionadas se les añadió AHL a una concentración final de 10 μ M. Esta mezcla se incubó a 28°C durante 24h en agitación y posteriormente las AHLs remanentes se extrajeron del sobrenadante con acetato de etilo acidificado. Se evaporó y el extracto seco se resuspendió en 400 μ l de acetonitrilo. Como control negativo, las AHLs se añadieron en igual concentración al medio sin inocular y se extrajeron y procesaron de la misma forma.

El análisis se realizó en los Servicios Técnicos del Centro de Instrumentación científica de la UGR con un cromatógrafo HPLC 1100 (Agilent) equipado con una precolumna C8 (2,1 μ m \times 12,5 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 μ m 150 mm, 5 μ m 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 cuádrupolo 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).

El análisis de las AHLs remanentes presentes en los cultivos mediante HPLC se realizó tanto en condiciones de pH 7 como pH 2 (apartado 3.8.2), en este último caso para comprobar si la actividad QQ era debido a una lactonasa.

3.9. Estudios *in vitro* e *in vivo* de la interferencia de *quorum sensing*

3.9.1. Cocultivos *in vitro* de cepas que interfieren con sistemas *quorum sensing* y las bacterias patógenas

Las cepas seleccionadas por su capacidad de interferir con los sistemas QS se cultivaron conjuntamente con cepas patógenas del género *Vibrio*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 productoras de AHLs. Para ello, a 5 ml de cultivos de 24h de cada una de las cepas seleccionadas, previamente ajustados a una concentración de aproximadamente 10¹¹

ufc/ml, se les añadió 50 μ l de un cultivo de 24h de cada una de las cepas patógenas, previamente ajustado a 10^8 ufc/ml y posteriormente se incubaron durante 24h a 28°C. En algunas ocasiones, los cocultivos se realizaron *in situ*, es decir, mezclando cultivos de 24h de la cepa a ensayar y la cepa patógena en una relación 100:1 y se inocularon directamente. Como controles se inocularon concentraciones similares de ambas cepas de forma separada en medio fresco, generando así los monocultivos correspondientes. Del mismo modo, se utilizaron medios sin inocular como controles negativos. En todos los ensayos, se realizaron recuentos en placa para cuantificar el crecimiento de las bacterias en cocultivo y en monocultivo.

3.9.2. Determinación de la expresión de características fenotípicas y factores de virulencia tras la pérdida de AHLs

a) Producción de AHLs

La detección de las AHLs remanentes en los cocultivos se realizó mediante un ensayo de difusión en placa tal y como se ha descrito anteriormente. Para ello, se depositaron en las placas petri un volumen de 100 μ l de cultivo en el caso de los ensayos con las cepas del género *Vibrio* y *P. aeruginosa* PAO1 y 2,5 μ l para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T debido a su gran producción.

b) Pruebas fenotípicas

La capacidad de los compuestos y enzimas inhibidoras de los sistemas QS de modificar la producción de características fenotípicas se evaluó mediante el uso de los medios específicos descritos en el apartado 3.2. En los diferentes cultivos en presencia y ausencia de compuestos QSI, se determinó la actividad amilasa, caseinasa, degradación de Tween 20 y Tween 80, quitinasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, degradación de esculina, DNAsa, gelatinasa y hemolisina. Para inocular dichos medios se utilizaron 10 μ l de los cultivos de 24h de las cepas a ensayar o de los cocultivos, excepto para las pruebas de movilidad bacteriana, en las que se utilizaron 2,5 μ l. Las pruebas se incubaron durante 7 días a 28°C y el resultado se obtuvo midiendo los halos alrededor de la zona donde se había colocado la gota de cultivo. En el caso de la prueba de la movilidad bacteriana, ésta se incubó durante 24h y se midió el diámetro de la migración de las células. En todos los casos se sembró tanto el cocultivo como los monocultivos de cada una de las cepas.

La formación de biofilms se evaluó siguiendo la metodología descrita por otros autores (O'Toole y Kolter, 1998). Para ello, se inocularon subcultivos 1:100 de los cocultivos y monocultivos en pocillos de placas microtiter de 6 o de 96 pocillos y tras 24h de incubación se cuantificaron las bacterias adheridas a la superficie mediante tinción con cristal violeta y posterior medida en el espectrofotómetro a 490 nm.

La producción de violaceína se cuantificó siguiendo la metodología previamente descrita (Choo et al., 2006). Para ello, 1 ml de un inóculo de 24h de *C. violaceum* ATCC 12472 se creció en presencia y ausencia de los extractos o enzimas objeto de estudio. Tras 24h de incubación, el cultivo se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min.

A partir del pellet celular se extrajo el pigmento violaceína con DMSO y se midió la absorbancia a 585 nm.

La producción de pioverdina se analizó siguiendo la metodología descrita anteriormente (Ren et al., 2005). Para ello, un cultivo de 24h de *P. aeruginosa* PAO1 se inoculó en una proporción 1:1000 en el medio mínimo deficiente en hierro MM descrito en el apartado 3.2. Tras 24h de incubación a 37°C, se midió el crecimiento mediante la absorbancia a 600 nm. Posteriormente 1 ml del cultivo se centrifugó y la absorbancia del sobrenadante se midió a 405 nm, correspondiente a la absorbancia de la pioverdina. La producción de pioverdina fue calculada en base a la relación DO₄₀₅/DO₆₀₀.

c) Ensayos de expresión de genes de virulencia

La expresión de los genes *lecA*, *lasI* y *rhII* de *P. aeruginosa* PAO1 que codifican la producción de lectinas, síntesis de 3-O-C12-HSL y C4-HSL, respectivamente, se cuantificó mediante ensayos de luminiscencia utilizando las construcciones plasmídicas PAO1 *lecA::luxCDABE* (Winzer et al., 2000), PAO1 *lasI::luxCDABE* y PAO1 *rhII::luxCDABE* (tabla 4). En estos biosensores se introdujeron tanto el plásmido que contenía la secuencia de una enzima QQ (pME6000::*ahaP*) como el plásmido vacío (pME6000).

Para realizar el ensayo, los cultivos de *P. aeruginosa* que contenían las construcciones plasmídicas se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,01 en medio fresco y se repartieron alícuotas de 200 μ l en pocillos de placas microtiter de 96 pocillos. Además, estos bioindicadores se crecieron en presencia de AHLs exógenas para aumentar la producción de luminiscencia y que el efecto de la degradación de AHLs por parte de la enzima fuera mayor. Los cultivos se incubaron a 37°C y la bioluminiscencia se determinó en función de la densidad celular utilizando un lector de placas TECAN m200. La luminiscencia se midió cada 30 min, así como la absorbancia a 600 nm. Posteriormente, se determinó y representó el área bajo la curva tras 24h utilizando el método de los mínimos cuadrados.

3.9.3. Ensayos en tubérculos de patatas

El efecto de la actividad QQ de las cepas seleccionadas sobre la virulencia del patógeno de agricultura *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T, se realizó mediante un ensayo en rodajas de patatas, siguiendo la metodología descrita anteriormente, pero con ligeras modificaciones (Garge y Nerurkar, 2016; Kang et al., 2016; Torres et al., 2017). Brevemente, se esterilizó la superficie de tubérculos de patata con etanol 70% (v/v), se cortaron en rodajas de aproximadamente 0,5 cm y se depositaron en placas petri con papel de filtro en la base para mantener la humedad. Las patatas se inocularon en tres puntos equidistantes con 5 μ l de cultivos de las cepas a ensayar en monocultivos y cocultivos (condiciones explicadas anteriormente). Tras su incubación durante 24-48h se midieron las zonas de maceración alrededor de los puntos de inoculación. Se utilizaron nueve rodajas de patata por cada una de las condiciones de ensayo, y el área de maceración se midió

utilizando el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Como controles, se utilizaron tanto rodajas de patata inoculadas con medio de cultivo estéril como rodajas de patata sin inocular.

3.9.4. Ensayos en artemias

La eficacia de las enzimas QQ para disminuir la virulencia de patógenos marinos se evaluó mediante un ensayo *in vivo* con *Artemia salina*, infectadas con la cepa *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. Los quistes de esta especie (JBL Artemio Pur®) se eclosionaron en SFSW a 20°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo de virulencia se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente (Ha et al., 2014), pero con pequeñas modificaciones. Tras recoger los nauplios eclosionados, se transfirieron 20 de ellos a una placa petri que contenían 20 ml de SFSW. Por su parte, los cultivos bacterianos de 24h de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 se centrifugaron y las células se lavaron dos veces con SFSW. El mismo proceso se llevó a cabo con los cultivos de las cepas QQ. Los monocultivos y cocultivos, en las mismas condiciones que se han explicado para los ensayos anteriores, se inocularon a una concentración final de 10^6 ufc/ml en las placas con los nauplios y se incubaron a 25°C durante 3 días. Tras la incubación, se realizaron recuentos en placas de TCBS (*Vibrio* spp.) y de AM (cepas marinas) para determinar la concentración bacteriana. Como control, se inoculó un volumen similar de SFSW en una placa petri con 20 nauplios, que se incubó en las mismas condiciones. Cada condición de ensayo se repitió por triplicado, es decir, se utilizaron 3 placas petri con 20 nauplios cada una para cada condición de ensayo. La supervivencia de los nauplios se detectó mediante la interrupción de la movilidad, que fue observada diariamente durante 3 días.

La actividad de compuestos inhibidores de QS se comprobó en artemias realizando una variante del ensayo anterior y utilizando placas de 48 pocillos. Cada pocillo se rellenó con 1 ml de SFSW, se adicionaron los compuestos inhibidores de QS, y se situaron 10 nauplios en cada pocillo. A continuación, se inocularon las placas con monocultivos de los patógenos. Como controles se utilizaron artemias a las que no se añadió el patógeno (en presencia y ausencia del compuesto QSI) y artemias inoculadas con los patógenos, pero sin la presencia de los compuestos inhibidores de QS.

3.10. Técnicas moleculares

3.10.1. Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico de las bacterias se extrajo utilizando una adaptación del método descrito por Martín-Platero y colaboradores en 2007 (Martín-Platero et al., 2007). En primer lugar, 5 ml de los cultivos de 24h de las cepas seleccionadas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min. Las células se resuspendieron en 100 μ l de la solución 1, a la que se añadió 100 mg/ml de lisozima. A continuación, se añadieron 0,5 μ l de ARNasa (40 μ g/ml) y 0,5 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Tras incubar la reacción a 37°C durante 30 min, se añadieron 600 μ l de solución 2, mezclando por inversión suave y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se incubó

posteriormente a 80°C durante 10 min para producir la inactivación enzimática. Una vez enfriada la solución a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de la solución 3 y tras una suave agitación, se incubó en hielo durante 10 min para favorecer la precipitación de las proteínas. Posteriormente, se centrifugó en frío y el sobrenadante se mezcló con 600 μ l de isopropanol para precipitar el ADN, que se lavó dos veces con 500 μ l de etanol 70% (v/v) para eliminar el exceso de sales. Tras secar el pellet celular, éste se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril.

Para la extracción de ADN genómico destinado a su secuenciación, se siguió la metodología descrita por Marmur (Marmur, 1961). Brevemente, las células procedentes de 200 ml de los cultivos bacterianos se resuspendieron en 25 ml de EDTA salino. A continuación, se añadió 10 mg de lizozima y 2,5 ml de SDS al 25% (p/v) y tras su incubación a 37°C durante 30 min, se añadió 5 ml de perclorato sódico 5M y 32,5 ml de una mezcla de cloroformo:isoamílico (24:1), y se dejó incubar la mezcla durante 30 minutos a 37°C. Tras dejar en reposo durante 24 h, se centrifugó la mezcla a 8000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa, que se volvió a lavar con la solución de cloroformo:isoamílico (24:1). El ADN se recuperó finalmente tras la precipitación con doble volumen de etanol absoluto frío (a -20°C), recogiendo las fibras de ADN con una varilla de vidrio en agua. Para aumentar la pureza del ADN, se añadió RNAsa y proteinasa K, y se incubó durante 1 h a 37°C. A continuación, se añadió un volumen de la mezcla cloroformo:isoamílico (24:1), se centrifugó y a la fase acuosa se añadió acetato sódico 3M y dos volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Tras mantenerlo a -20°C, se centrifugó y el pellet se lavó con etanol 70 % (v/v). Finalmente, el ADN se resuspendió en agua.

Para cuantificar el ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop®, siguiendo las recomendaciones de Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001). La pureza de ADN se determinó en función de la relación entre la absorbancia a 260 y a 280nm, de tal modo que se descartan las preparaciones con una relación por debajo de 1,8, ya que contenían contaminación por proteínas o exopolisacáridos.

3.10.2. Reacciones de PCR

En todas las reacciones de PCR realizadas en este trabajo, se empleó la enzima DNA Polimerasa Q5 High-Fidelity (New England Biolabs®). La reacción que se siguió fue la siguiente:

ADN	variable
5X Buffer de reacción de Q5	10 μ l
dNTPs 10mM	1 μ l
Primer directo 10 μ M	2 μ l
Primer reverso 10 μ M	2 μ l
DNA polimerasa	0,5 μ l
5X <i>Enhancer</i> de Q5	10 μ l
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 50 μ l

Los *primers* utilizados se recogen en la tabla 8.

Tabla 8. *Primers* utilizados en este trabajo.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Función</i>
16F_B27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Identificación taxonómica
16R_B1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC	Identificación taxonómica
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de productos de PCR clon
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación de productos de PCR clon
16S_F_Int_M3-10	AATAGCATTTGAAACTGG	Identificación taxonómica de M
16S_F_Int_M9-54-1	AGCGTGCGTAGGTGGTCG	Identificación taxonómica de M
<i>hqiA</i>BamHI	<u>GGATCC</u> CATGAGTCAAATCAGCTTGGCG	Expresión de <i>HqiA</i> en pMAL-C
<i>hqiA</i>HindIII	<u>AAGCTT</u> TTACGATCCTTCGGGTAAAGAAC	Expresión de <i>HqiA</i> en pMAL-C
<i>hqiA</i> F	ATGAGTGAAATCACGTTGGC	Amplificación de <i>hqiA</i>
<i>hqiA</i> R	CTTTACCCGAAGGATCGTAA	Amplificación de <i>hqiA</i>
<i>SAcyI</i>_F	ATGCGACGTACATGGCGTTGG	Amplificación de acilasa de M
<i>SAcyI</i>_R	CTACCGCGCCGGCACCAGTGTC	Amplificación de acilasa de M
<i>ahaP</i>_F	ATGAGCATTAAATGTGCTTAATC	Amplificación de <i>ahaP</i>
<i>ahaP</i>_R	CTATTCTCTCAATTTGATCACT	Amplificación de <i>ahaP</i>
<i>ahaP</i>_F_BamHI	<u>GGATCC</u> CATGAGCATTAAATGTGCTTAATC	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_R_SalI	<u>GTCGAC</u> CTATTCTCTCAATTTGATCACT	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_F_pCold_SacI	TATGAGCTCTGTTCCGATAACGACAATTTTA	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_R_pCold_EcoRI	TATGAATTCCTCTCTCAATTTGATCACTTCA	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_F_pET_BamHI	TATGGATCCGTGTTCCGATAACGACAATTTTA	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_R_pET_XhoI	TATCTCGAGTTCTCTCAATTTGATCACTTCA	Expresión y purificación de <i>AhaP</i> en pC
<i>ahaP</i>_F_p6000_EcoRI	TATGAATTCATGAGCATTAAATGTGCTTAATC	Expresión de <i>ahaP</i> en pME6000
<i>ahaP</i>_R_p6000_BamHI	TATGGATCCCTATTCTCTCAATTTGATCACT	Expresión de <i>ahaP</i> en pME6000
<i>ahaP</i>_R_pJN105_SacI	TATGAGCTCCTATTCTCTCAATTTGATCACT	Expresión de <i>ahaP</i> en pME6000
<i>ahaP</i>_FdSP_p6000_EcoRI	TATGAATTCATGTGTTCCGATAACGACAATTTTA	Expresión de <i>ahaP</i> sin péptido señal
<i>Bpi</i>_Psychro_F_BamHI	<u>GGATCC</u> CATGACAAAAATAATCGACTA	Expresión de análogo a <i>bpiB05</i> d
<i>Bpi</i>_Psychro_R_SalI	<u>GTCGAC</u> TTAACGATTAAGTAAATCTGTG	Expresión de análogo a <i>bpiB05</i> d

Respecto a las condiciones de reacción, la temperatura de hibridación dependió de la temperatura de fusión de los *primers*. En general, los parámetros de los ciclos fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C, hibridación de 50 a 60 °C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante 1 min por cada kilobase de longitud del fragmento a amplificar. Por último, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C.

Los fragmentos de PCR se purificaron para sus futuros usos (secuenciación o ligación) utilizando el kit *GFX PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare®).

3.10.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN se realizó en gel de agarosa al 0,8-1% (p/v) utilizando el tampón TBE 1X, al que se añadieron 2 μ l de RedSafe® por cada 50 ml de buffer para permitir el posterior revelado del ADN. El tampón de carga usado fue el 5X ADN *Loading Buffer Blue* (Bioline®) adicionando 1 μ l por cada 5 μ l de ADN. Tras la electroforesis, se observó mediante luz UV (245 nm) la aparición de las bandas correspondientes. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron HypperLadder® I o HypperLadder® IV. En caso de ser necesario, los fragmentos de ADN se cortaron de los geles de agarosa con ayuda de un bisturí, y fueron purificados usando el kit *GFX PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare®) mencionado anteriormente.

3.10.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Parasitología y Biotecnología “López-Neyra” (Granada) mediante la metodología del tipo Sanger.

Por otra parte, también se realizó la secuenciación masiva de ADN genómico de las cepas marinas seleccionadas en las instalaciones de StabVida (Caparica, Portugal). Para ello, se envió el ADN extraído siguiendo la metodología de Marmur, y se generaron las librerías de fragmentos de ADN usando el kit de preparación de librerías HyperPrep®. A continuación, los fragmentos se secuenciaron utilizando la tecnología Illumina Hi-Seq con una librería de 2x150 bases con extremos emparejados (*paired-ends*).

El tratamiento bioinformático tanto de las secuencias obtenidas por metodología Sanger como mediante secuenciación masiva se explica a continuación.

a) Secuencias obtenidas por métodos clásicos

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación del tipo Sanger se analizaron mediante el programa 4Peaks versión 1.8. Los cromatogramas se observaron y comprobaron manualmente, y se seleccionaron las zonas en las que la calidad y resolución de las bases era elevada.

Para realizar los mapas de restricción de las secuencias de ADN se utilizó el programa EnzymeX versión 3.3.3.

b) Secuencias procedentes de secuenciación masiva

Cuando se secuenciaron genomas completos, los datos brutos de secuenciación se limpiaron con el programa bbduk (DOE Joint Genome Institute) para eliminar contaminantes, adaptadores y bases de baja calidad. Las secuencias posteriormente se ensamblaron en *contigs* usando el programa SPAdes versión 3.11.1 (Bankevich et al., 2012). Se llevaron a cabo intentos de cerrar los genomas utilizando el programa SSPACE versión 3.11 (Boetzer et al., 2011). Los genomas se depositaron en la base de datos NCBI y se anotaron utilizando el programa RAST (Aziz et al., 2008) y PGAP (Tatusova et al., 2016).

3.10.5. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de las cepas objeto de estudio se realizó en base al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, mediante los programas BLASTn (Altschul et al., 1990) y la base de datos de ARNr de 16S del NCBI, así como el servidor EzBioCloud (Yoon et al., 2017).

Por otro lado, y utilizando la información obtenida a partir de los genomas completos, se realizaron análisis genómicos mediante los programas JSpeciesWS (Richter et al., 2015), la calculadora de matrices de ANIb del laboratorio de Kostas y colaboradores (Rodríguez-R y Konstantinidis, 2016), así como el programa disponible en la DSMZ para calcular la hibridación digital (Meier-Kolthoff et al., 2013) y el programa de análisis mediante la generación de anillos concéntricos BRIG (Alikhan et al., 2011).

3.10.6. Otros programas bioinformáticos utilizados para determinar relaciones filogenéticas

Los dominios conservados en las distintas proteínas se identificaron mediante el uso del programa de Dominios Conservados disponible en la base de datos NCBI (Marchler-Bauer et al., 2017, 2015; Marchler-Bauer y Bryant, 2004). Cuando fue necesario realizar árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA (Kumar et al., 2018, 2016).

3.10.7. Base de datos de tirosín-decarboxilasas

Para investigar la presencia de homólogos de tirosín-decarboxilasas en los genomas una vez ensamblados, se utilizaron 94 enzimas tirosín-decarboxilasas, cuyos números de acceso de la base de datos NCBI se recogen en la tabla 9.

Tabla 9. Número de acceso de las proteínas tirosín-decarboxilasas utilizadas para buscar homólogos.

1. CAI39170.2_1	2. CAI39169.2_1	3. AFP73381.1_1
4. AGW24520.1_1	5. AGW24519.1_1	6. BAE02560.1_1
7. ACS15340.1_1	8. ACS15339.1_1	9. ACS15338.1_1
10. CAY83536.1_1	11. CAY83534.1_1	12. CAY72357.1_1
13. CAY72352.1_1	14. CAY72349.1_1	15. CAY72347.1_1
16. CAY72344.1_1	17. CAY72343.1_1	18. CAY72341.1_1
19. CAY72338.1_1	20. CAY72336.1_1	21. CAY72335.1_1
22. CAY72333.1_1	23. CAY72330.1_1	24. BAE02559.1_1
25. AWT58522.1_1	26. AWT58521.1_1	27. AWT58520.1_1
28. AWT58519.1_1	29. AWT58518.1_1	30. AWT58517.1_1
31. AWT58516.1_1	32. BAI67125.1_1	33. WP_135180232.1_1
34. WP_135017352.1_1	35. E4V23_RS18420	36. WP_135043646.1_1
37. E4V46_RS09510	38. TFU21072.1_3	39. TFU11427.1_1
40. TFT82455.1_1	41. TFT56894.1_1	42. TFT37476.1_1
43. EVY62_RS19255	44. WP_129949649.1_1	45. WP_088207211.1_1
46. RZA37683.1_1	47. RZA37564.1_3	48. RYH14358.1_1
49. BHE89_RS17365	50. H049_RS0124195	51. H049_RS0123705
52. EBQ16_RS07935	53. WP_121909587.1_1	54. EA135_RS16540
55. RLZ56634.1_1	56. RLZ55416.1_1	57. C3O82_RS13145
58. RBH48265.1_1	59. RBH41953.1_1	60. WP_017628132.1_1
61. PSQ86773.1_1	62. PSQ85593.1_4	63. BRD33_05025
64. CUS67_RS12755	65. WP_104877381.1_2	66. CUM70_RS13060
67. CUM70_RS13050	68. PQF68676.1_2	69. CUS67_12755
70. PQD88208.1_1	71. PQD88205.1_1	72. C4A96_RS26915
73. C4A96_RS06470	74. C4A96_RS04445	75. C4A96_RS04265
76. PKN32413.1_1	77. CQR37_RS16425	78. PHL20111.1_1
79. OUK41848.1_2	80. OUK40079.1_2	81. OSP71327.1_1
82. OSP67774.1_2	83. WP_071425714.1_1	84. WP_080389721.1_2
85. WP_011109458.1_1	86. OIK52589.1_1	87. BHE89_18525
88. KXF72672.1_2	89. KRM71154.1_1	90. EAO52030.1_1
91. CBW46640.1_1	92. ABC68277.1_1	93. CAH04395.1_1
94. SCD69325.1_2		

3.10.7. Digestión de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega®, New England Biolabs®) en cada caso.

3.10.8. Reacción de ligación de ADN y transformación bacteriana

a) Reacción de ligación de ADN

La reacción de ligación de ADN se llevó a cabo utilizando los fragmentos de ADN previamente digeridos y los plásmidos (tabla 6), previamente linealizados, en relaciones molares inserto/vector variables dependiendo del tamaño del fragmento a clonar. La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima T4 ligasa (Promega®) usando las recomendaciones del manual del fabricante.

b) Transformación bacteriana

En esta tesis doctoral se utilizaron tanto células competentes tratadas con CaCl_2 como células electrocompetentes.

Para la preparación de las primeras se siguió el manual de Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001). Los cultivos de *E. coli* DH5 α se prepararon ajustados a una densidad óptica de $\text{DO}_{600} = 0,5$, se centrifugaron y lavaron sucesivamente con volúmenes decrecientes de una solución fría de CaCl_2 100mM. Finalmente, las células se resuspendieron en una solución de CaCl_2 100mM y glicerol 20% (v/v) y se conservaron a -80°C hasta su uso. En este caso, la transformación se llevó a cabo mediante choque térmico; primero se incubó en hielo el plásmido junto con 40 μl de células competentes durante 30 min, tras los cuales se calentó a 42°C durante 30 segundos y se enfrió rápidamente en hielo durante 2 min. Ésta mezcla se resuspendió en 700 μl de medio LB fresco y se incubó a 37°C durante 1h. Finalmente, la mezcla se sembró en placa de medios selectivos adicionadas del antibiótico correspondiente.

Para la preparación de células electrocompetentes (cepas distintas a DH5 α), se partió de cultivos celulares a una DO_{600} de aproximadamente 0,8. A continuación, se lavaron con volúmenes decrecientes de agua bidestilada estéril, excepto para el caso de las cepas del género *Vibrio*, que se utilizó una solución de sacarosa, para mantener la presión osmótica necesaria (Torres et al., 2018). Finalmente, las células se resuspendieron en 0,02 volúmenes de una solución de glicerol al 10% (v/v) para conservar las células a -80°C hasta su uso. En este caso, la transformación se realizó con un electroporador Micropulser (BioRad[®]), utilizando una mezcla de plásmido y 40 μl de células competentes. Tras el pulso, las células se resuspendieron con 700 μl de medio fresco y se incubaron durante 1h. Finalmente se sembraron en placas con el medio de selección adicionadas del antibiótico correspondiente.

3.10.9. Expresión y purificación de proteínas

Para purificar las proteínas con actividad QQ se clonaron los correspondientes genes en vectores de expresión con colas de proteína de unión a maltosa (MBP), histidina (6-His) o con colas de glutatión-S-transferasa (GST). Para la purificación, en el caso de las construcciones plasmídicas con colas de histidina, se utilizó el kit QIAexpress Ni-NTA Fast Start[®] y se siguieron las instrucciones del fabricante, pero se añadió una etapa inicial de sonicación de las células tras la adición del buffer de lisis, para asegurar la correcta rotura de las envolturas celulares.

En el caso de las construcciones plasmídicas realizadas con cola de MBP o con cola de GST, se siguió un protocolo semejante; tras centrifugar un cultivo inducido durante 5-6h (se indujo con 1 mM de IPTG cuando la DO_{600} había alcanzado un valor de 0,5), se resuspendió el pellet en el buffer correspondiente y se cargó en una columna de maltosa o de glutatión, según correspondiera en cada caso. Tras lavar la columna con el mismo buffer, la proteína se eluyó con 10 mM de maltosa o con 10 mM de glutatión en el mismo buffer. En todas las fracciones eluidas se comprobó la presencia de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). De este modo, se seleccionaron aquellas fracciones con mayor concentración de proteínas.

En los casos en los que la proteína iba a ser utilizada para medir las constantes cinéticas en un buffer poco tamponado, ésta se dializó en el buffer deseado para su utilización final, utilizando tripas de diálisis a 4°C y haciendo cambios de buffer cada 24h.

3.10.10. Electroforesis en geles de proteínas

El análisis de la expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de proteínas SDS-PAGE al 10% (p/v) (Laemmli, 1970). Los geles utilizados fueron bien geles comerciales ya preparados (Bio-Rad®) o bien geles preparados en el propio laboratorio siguiendo la metodología descrita («SDS-PAGE Gel», 2015). Las muestras se mezclaron con tampón de carga y se cargaron en los pocillos del gel. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul Coomassie durante 2-3h y posteriormente se lavó varias veces con la solución de desteñido descrita en el apartado 3.5 hasta la definición de las bandas de proteínas.

3.10.11. Cuantificación de la actividad *quorum quenching* usando biosensores de tipo *E. coli*

La actividad QQ de las enzimas purificadas se cuantificó utilizando tanto biosensores clásicos como cepas biosensoras de *E. coli*. En este último caso, se utilizaron las cepas *E. coli* (psB401), *E. coli* (psB536) y *E. coli* (psB1142) siguiendo una adaptación de la metodología descrita anteriormente (Flynn et al., 2016; Winson et al., 1998). Para ello, 10 - 50 μ l de enzima purificada (a una concentración de 0,5-2mg/ml) se mezcló con AHLs a una concentración final de 5 μ M, utilizando buffer PBS como medio de reacción. Tras 24h de incubación a 28 ó 37 °C, se transfirieron 20 μ l del producto de reacción a un subcultivo de DO₆₀₀ = 0,01 (crecido sin antibióticos) de los biosensores correspondientes a cada AHL utilizada. Como control negativo, se añadieron 20 μ l del producto de una reacción incubada de la misma manera, pero a la que no se le había añadido enzima QQ. Se utilizaron tres réplicas de cada condición de ensayo. Los cultivos se incubaron a 37°C y la producción de luminiscencia se midió cada 30 min durante 24h usando un espectrofotómetro TECAN M200®. La DO₆₀₀ también fue medida y se normalizó la producción de luz con el crecimiento bacteriano. La disminución en la producción de luz a lo largo del tiempo dependía de la reducción en la concentración de AHLs. La luminiscencia se representó como área bajo la curva tras las determinaciones de luminiscencia cada 30 min, utilizando el método de los mínimos cuadrados.

3.10.12. Determinación de las constantes catalíticas de enzimas *quorum quenching*

Los parámetros cinéticos de la actividad QQ de las enzimas de tipo lactonasa se determinaron siguiendo un ensayo colorimétrico como el descrito por Tang y colaboradores (2015), basado a su vez en los ensayos descritos por Chapman y Wong (2002). Concretamente, se llevó a cabo un ensayo en placas microtiter basado en el sistema ácido morfolin-propanosulfónico (MOPS)/azul de bromotimol. La reacción estaba compuesta por 100 μ M de azul de bromotimol; 0 - 5 mM de AHLs

(disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO)) como sustrato y 1 - 5 μ l de enzima QQ (a una concentración entre 2 y 7 mg/ml), todo ello disuelto en el buffer MOPS 2,5 mM. Dado que las AHLs se añadieron disueltas en DMSO, se ajustó siempre la concentración final de DMSO a 2 % (v/v). Este ensayo se basa en el hecho de que cuando la enzima tipo lactonasa actúa sobre la AHL, se libera un protón que acidifica ligeramente el medio. Esta acidificación provoca un cambio en el estado de protonación del indicador ácido-base, azul de bromotimol, que vira a amarillo y puede ser detectado mediante un espectrofotómetro a 630 nm. Para ello la cuantificación de la actividad se utilizó un dispositivo TECAN Sunrise®, en el que se monitorizó cada reacción durante 5 min haciendo mediciones cada 10 segundos con el software Magellan®. La velocidad de reacción inicial se calculó teniendo en cuenta que sólo durante los primeros segundos de reacción ésta seguía una velocidad lineal. Una vez obtenidos los valores de la pendiente, indicativos de la velocidad de reacción, se utilizó el software GraphPad Prism v 8.2.1 para ajustar los valores de velocidad a una curva de Michaelis-Menten y de esta forma determinar los valores de Kcat y de Km de cada enzima de tipo lactonasa.

3.11. Técnicas metagenómicas y bioinformáticas

3.11.1. Metagenomas empleados

En este estudio se han utilizado un total de 60 metagenomas disponibles en la página web del Joint Genome Institute (JGI) (<https://genome.jgi.doe.gov/>) cuyas características y números de acceso (código GOLD) se describen a continuación.

Tabla 10. Metagenomas analizados en este trabajo junto con su código de acceso en JGI.

Metagenomas:	Código GOLD
Comunidades microbianas de agua dulce del lago Crystal Bog, Wisconsin, Estados Unidos	Ga0007792
Comunidades microbianas de agua dulce del lago Crystal Bog, Wisconsin, Estados Unidos	Ga0007876
Comunidades microbianas marinas en zonas mínimas de expansión de oxígeno en el noreste del Océano Pacífico subártico	Ga0008651
Comunidades microbianas de Agave de California, Estados Unidos y México	Ga0058701
Comunidades microbianas de suelo del Bosque de Harvard, Estados Unidos	Ga0058710
Comunidades microbianas del sedimento de un estanque de agua dulce bajo perturbaciones del carbono ambiental en Edimburgo, Escocia	Ga0066599
Comunidades microbianas de pastizales de suelo de la Reserva Costera de Angelo, California, Estados Unidos.	Ga0066665
Comunidades microbianas de pastizales de suelo de la Reserva Costera de Angelo, California, Estados Unidos.	Ga0066710
Comunidades microbianas anoxigénicas y clorotróficas de un tapete microbiano del Parque Nacional de Yellowstone, Estados Unidos	Ga0068705

Tabla 10 (continuación). Metagenomas analizados en este trabajo junto con su código de acceso en JGI.

Metagenomas:	Código GOLD
Comunidades microbianas del sedimento marino de la costa atlántica durante la recuperación con carbono orgánico y nitrato	Ga0070727
Comunidades microbianas de un suelo superficial de Penssylvania, Estados Unidos, en proceso de recuperación de un fuego subterráneo en una mina de carbón.	Ga0070741
Comunidades microbianas de aguas subterráneas del Río Columbia, Washington, Estados Unidos	Ga0073913
Comunidades microbianas de tapetes microbianos hipersalinos del Lago Hot, Washington, Estados Unidos	Ga0074605
Comunidades microbianas de agua dulce y de sedimentos de Moshano State Forest, Pennsylvania, Estados Unidos	Ga0075017
Comunidades microbianas de un sedimento de agua dulce de Pennsylvania	Ga0075028
Comunidades microbianas Salinas del Lago Ace, Antártida	Ga0075123
Comunidades microbianas Salinas del Lago Ace, Antártida	Ga0075125
Comunidades microbianas de turba ártica en Barrow, Alaska, Estados Unidos	Ga0075524
Comunidades microbianas de suelos agrícolas, Utah, Estados Unidos	Ga0079224
Comunidades microbianas de un reservorio de carbono de pizarra subterráneo profundo, Ohio, Estados Unidos	Ga0079301
Comunidades microbianas de tapetes microbianos hipersalinos del Lago Hot, Washington, Estados Unidos	Ga0079973
Comunidades microbianas de agua subterránea del acuífero Crysta Geyser, Utah, Estados Unidos	Ga0100379
Comunidades microbianas del estuario del Río Columbia, Estados Unidos	Ga0102811
Comunidades microbianas del estuario del Río Columbia, Estados Unidos	Ga0102815
Comunidades microbianas de un estanque de agua salada en el sur de San Francisco bajo las condiciones de restauración de un humedal	Ga0102963
Comunidades microbianas de tapetes microbianos despegados del Lago Fryxell, Antártida	Ga0105045
Comunidades microbianas de aguas subterráneas del Río Columbia, Washington, Estados Unidos	Ga0105085
Comunidades microbianas rizosféricas de maíz, césped y pasto de la Estación Biológica de Kellog, Michigan, Estados Unidos.	Ga0105239
Comunidades microbianas subterráneas profundas de Anholt, Dinamarca	Ga0114930
Comunidades microbianas de una Fuente termal en Beatty, Nevada, Estados Unidos	Ga0114944
Comunidades microbianas de algas marinas en Maine, Estados Unidos	Ga0114956
Comunidades microbianas de un reservorio de carbono de pizarra subterráneo profundo, Ohio, Estados Unidos	Ga0114986
Comunidades microbianas marinas del oeste del Óceano Ártico	Ga0114998
Comunidades microbianas de lodos activos y de plantas de tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales, Chicago, Estados Unidos	Ga0116158
Comunidades microbianas de una Fuente termal en Zodletone, Oklahoma, Estados Unidos	Ga0116196
Comunidades microbianas de una Fuente termal en Sudáfrica	Ga0116211
Comunidades microbianas del sedimento marino de la costa atlántica durante la recuperación con carbono orgánico y nitrato.	Ga0118733
Comunidades microbianas intestinales de termitas <i>Cubitermes</i> y <i>Nasutitermes</i> , Alemania	Ga0123353
Comunidades microbianas de una Fuente termal en el Parque Nacional de Yellowstone, Estados Unidos	Ga0123519
Comunidades microbianas del suelo de serpentina de la Reserva UC McLaughlin, California, Estados Unidos	Ga0126306
Comunidades microbianas del suelo de serpentina de la Reserva UC McLaughlin, California, Estados Unidos	Ga0126311
Comunidades microbianas simbiotes de gusanos sin intestinos marinos	Ga0126325

Tabla 10 (continuación). Metagenomas analizados en este trabajo junto con su código de acceso en JGI.

Metagenomas:	Código GOLD
Comunidades microbianas de un suelo tropical en Panamá	Ga0126372
Comunidades microbianas de un suelo tropical en Panamá	Ga0126379
Comunidades microbianas rizosféricas de <i>Arabidopsis</i> spp., Carolina del Norte, Estados Unidos	Ga0132257
Comunidades microbianas de la zona de suelo vadoso de la Reserva de la Costa de Angelo, California, Estados Unidos	Ga0137390
Comunidades microbianas de humedales de agua dulce de Ohia, Estados Unidos	Ga0153915
Comunidades microbianas de hormigas atinas de jardines fúngicos, Nueva Jersey, Estados Unidos	Ga0153948
Comunidades microbianas de hormigas atinas de jardines fúngicos, Florida, Estados Unidos	Ga0153956
Comunidades microbianas de lodos activos y de aguas residuales en Klosterneuburg, Austria	Ga0154020
Comunidades microbianas de una hormiga cortadora de hojas asociada a un jardín fúngico, Botucatu, Brasil	Ga0157359
Comunidades microbianas de una hormiga cortadora de hojas asociada a un jardín fúngico, Botucatu, Brasil	Ga0157367
Comunidades microbianas de suelo sin modificar, Nueva York, Estados Unidos	Ga0164301
Comunidades microbianas de suelo modificado con materia orgánica fresca, Nueva York, Estados Unidos	Ga0164308
Comunidades microbianas de un sedimento de agua subterránea de un acuífero adyacente al Río Colorado, Estados Unidos	Ga0180104
Comunidades microbianas costeras del pantano salado Groves Creek, Georgia, Estados Unidos,	Ga0181568
Comunidades microbianas de la zona costera del pantano salino Groves Creek, Georgia, Estados Unidos	Ga0181592
Comunidades microbianas de un sedimento de agua subterránea de un acuífero adyacente al Río Colorado, Estados Unidos.	Ga0184637
Comunidades microbianas de turba, Colombia	Ga0187778
Comunidades microbianas de un tapete microbiano extremófilo del Parque Nacional de Yellowstone, Estados Unidos	Ga0187840

3.11.2. Bases de datos de proteínas *quorum quenching*

Para investigar la presencia de enzimas QQ en genomas de bacterias o en metagenomas, se eligieron 28 enzimas QQ previamente descritas y en las que estaba perfectamente validado el mecanismo de acción. Estas enzimas pertenecían a cada una de las distintas familias de enzimas QQ existentes y se presentan a continuación.

Tabla 11. Enzimas QQ utilizadas en nuestra base de datos para encontrar homólogos.

Enzima	Número de acceso	Especie	Tipo de enzima
AiiA	AAM61772.1	<i>Bacillus</i> spp.	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
AaC <i>Shewanella</i> sp.	BAF94155.1	<i>Shewanella</i> sp. MIB015	Acilasa (Ntn hidrolasa)
AaC <i>Ralstonia</i> sp.	AAO411113.1	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Acilasa (Ntn hidrolasa)
AhiD	AAP57766.1	<i>Arhtobacter</i> sp. IBN110	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
AhiK	AAO47340.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC2241	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
AhiM	AAT68473.1	<i>Streptomyces</i> sp. M664	Acilasa (Ntn hidrolasa)
AhiS	BAK54003.1	<i>Solibacillus silvestris</i> StLB046	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
AidC	BAP32158.1	<i>Chryseobacterium</i> sp. StRB126	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
AiiM	BAJ75775.1	<i>Microbacterium testaceum</i> StLB037	Lactonasa (superfamilia de alfa/beta h
AiiO	ADI80348.1	<i>Ochrobactrum</i> sp. A44	Acilasa (alfa/beta hidrolasa)
AttM	AAD43990.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58, M103	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
Bpib01	ABU51804.1	Metagenoma	Hipotético
Bpib04	ABU51107.1	Metagenoma	Lactonasa (glicosil hidroxilasa)
Bpib05	ABU51109.1	Metagenoma	Hipotético
Bpib07	ABU51111.1	Metagenoma	Lactonasa (Dienolactona hidrola
HacA	YP_235052.1	<i>Pseudomonas syringae</i> B728a	Acilasa (Ntn hidrolasa)
HacB	YP237923.1	<i>Pseudomonas syringae</i> B728a	Acilasa (Ntn hidrolasa)
MCP	AAS06218.1	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	Lactonasa de tipo fosfotriesterasa
PON	EAP_90803.1	<i>Oceanicaulis alexandrii</i> HTCC2633	Lactonasa (Paraoxonasa)
PpH	NP_214744.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lactonasa de tipo fosfotriesterasa
PvdQ	NP_251075.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Acilasa (Ntn hidrolasa)
QlcA	ABV58973.1	Sin identificar (<i>metagenoma</i>)	Lactonasa (superfamilia de metalo-beta-
QsdA	AAT06802.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	Lactonasa de tipo fosfotriesterasa
QsdB	AFX82613.1	Sin identificar (<i>metagenoma</i>)	Acilasa (Familia de la firma Amid
QsdH	AFV15299.1	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i>	Lactonasa (Familia de GDSL-hidro
QuiP	AAG04421.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Acilasa (Ntn hidrolasa)
Sislac	PdbI4G2DIA	<i>Sulfolobus islandicus</i>	Sin identificar
SsoPox	Q97VT7.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Sin identificar

3.11.3. Análisis metagenómicos

a) Búsqueda de genes *quorum quenching* en metagenomas

El primer paso para conocer la abundancia de las proteínas QQ en los metagenomas fue descargar todos los archivos (formato “.faa”) que contenían los aminoácidos correspondientes a cada uno de los metagenomas ensamblados. Estos metagenomas constituyeron en total una base de datos de 78,8 Gb, con 299.983.011 secuencias de proteínas y un total de 38.908.516.253 aminoácidos (116.725.548.759 nucleótidos). A continuación, se utilizó la herramienta *makeblastdb* para construir la base de datos de los metagenomas, utilizando la opción “-parse_seqids” que permite recuperar las secuencias *a posteriori*.

La búsqueda de las enzimas QQ en los metagenomas se realizó utilizando las condiciones por defecto establecidas por el programa BLASTp, elevando a 500 el número de alineamientos mostrados. Se estableció un valor límite para determinar cuáles son los *hits* (homólogos) que probablemente se corresponden con la proteína problema inicial y cuáles no se pueden considerar homólogos. Por tanto, se establecieron categorías basadas en la escasa bibliografía actual (Barriuso y Martínez, 2018; Romero et al., 2012), y que se recogen en la tabla 12. Por ejemplo, las condiciones C son similares a las equiparables por Muras y colaboradores (2018), siendo las condiciones A y B más estrictas que las utilizadas en otras investigaciones. Mediante un programa escrito en el lenguaje *Python*, se podían seleccionar rápidamente los homólogos que cumplían con las condiciones más o menos estrictas que se establecieron a partir de los archivos de salida del programa BLASTp.

Tabla 12. Condiciones establecidas para la selección de homólogos en base a su cercanía a las proteínas de la base de datos.

	Condiciones A	Condiciones B	Condiciones C
Longitud <i>hit</i> /Longitud <i>query</i>	> 0,9	> 0,75	> 0,7
Longitud del alineamiento/Longitud <i>query</i>	> 0,92	> 0,8	> 0,7
Identities/Longitud alineamiento	> 0,45	> 0,4	> 0,38
Positivos/Longitud alineamiento	> 0,65	> 0,6	> 0,5

Una vez seleccionados todos los homólogos que cumplían cada una de las condiciones, se normalizó el número de los mismos teniendo en cuenta el tamaño de cada metagenoma ensamblado. Para ello, tal y como se ha descrito con anterioridad en otros trabajos (Barriuso y Martínez, 2018; Romero et al., 2012), se dividió el

número de homólogos seleccionados en cada metagenoma entre el número de bases del mismo, expresando los resultados en número de homólogos/Mbp.

A continuación, se comparó la abundancia relativa de cada una de las enzimas QQ en los metagenomas con respecto a la de otras proteínas con una importante abundancia relativa en los distintos ambientes. Para ello, se crearon dos bases de datos: una de ellas con proteínas de resistencia a antibióticos, de las que se conoce su elevada capacidad para transferirse (Van Hoek et al., 2011), mientras que la segunda fue de operones con una tasa de transferencia muy elevada, que deberían ser muy abundantes en los metagenomas (Koonin et al., 2001). Tras realizar la misma búsqueda que la descrita anteriormente para las proteínas QQ y seleccionando los homólogos con los mismos parámetros que los de la tabla anterior, se compararon los resultados con los obtenidos para las proteínas QQ. De esta manera, se podría discernir si la abundancia relativa de las proteínas QQ en los distintos ambientes es elevada. Las proteínas utilizadas en ambas bases de datos se muestran en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Proteínas con elevada capacidad de transferencia horizontal de genes utilizadas.

Número de acceso	Proteína	Especie
ABS75710.1	UreC	<i>Bacillus velezensis</i>
ABS75711.1	UreB	<i>Bacillus velezensis</i>
ABS75712.1	UreA	<i>Bacillus velezensis</i>
BAV54425.1	NtpC	<i>Streptococcus pyogenes</i>
BAV54428.1	NtpB	<i>Streptococcus pyogenes</i>
BAV54427.1	NtpA	<i>Streptococcus pyogenes</i>
CDO15237.1	ntpA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
NP_251687.1	NqrC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NP_251688.1	NqrB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NP_251689.1	NqrA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEH98043.1	NarJ	<i>Escherichia coli</i>
AIZ87008.1	NarH	<i>Escherichia coli</i>
EGT67762.1	narG	<i>Escherichia coli</i>
BAA35097.1	MnhC	<i>Staphylococcus aureus</i>
BAA35096.1	MnhB	<i>Staphylococcus aureus</i>
BAA35095.1	MnhA	<i>Staphylococcus aureus</i>
AIL41713.1	HyfD	<i>Shigella flexneri</i>
KXN95464.	HyfC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
SHD63539.1	HyfB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Tabla 14. Proteínas de resistencia a antibióticos utilizadas.

Número de acceso	Proteína	Especie
AAB59094.1	TetB	<i>Escherichia coli</i>
CAA35921.1	Sat2a	<i>Escherichia coli</i>
BAE48305.1	RmtC	<i>Proteus mirabilis</i>
AAL60061.1	Qnr	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BAF63420.1	QepA	<i>Escherichia coli</i>
KMM29947.1	Pjd4	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
AAC44785.1	MefA	<i>Streptococcus pyogenes</i>
CBW38806.1	ErmB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
CAA27626.1	EreB	<i>Escherichia coli</i>
CAA25445.1	Dfra1	<i>Escherichia coli</i>
AAC14737.2	CatB2	<i>Escherichia coli</i>
CAA30695.1	CatA3	<i>Shigella</i> sp.
NP_845780.1	Bla2	<i>Bacillus anthracis</i>
ORT27121.1	Bla	<i>Escherichia coli</i>
AAP50754.1	ArmA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CAA28209.1	Ant2	Bacteria no cultivada

b) Recuperación de las secuencias, asignación taxonómica y construcción de árboles filogenéticos

Una vez seleccionados aquellos homólogos que cumplían las condiciones establecidas, se recuperaron las secuencias correspondientes a estos homólogos utilizando la herramienta *blastdbcmd* incluida en el paquete BLAST. A continuación, se procedió a asignar un taxón a cada uno de estos homólogos, a fin de establecer relaciones filogenéticas entre los mismos. Para ello, se crearon diferentes programas en *Python* que permitieron encontrar, a partir de los archivos originales de los metagenomas ensamblados, a qué *scaffold* de los mismos pertenecía cada uno de los homólogos seleccionados. Una vez encontrado dicho *scaffold*, se tradujo el mismo a aminoácidos y se identificaron los Marcos Abiertos de Lectura (ORFs). Hay que recordar que uno de los ORF de ese *scaffold* es el que se había considerado homólogo a la proteína QQ.

A continuación, a los ORFs de cada *scaffold*, excepto al propio ORF homólogo a la proteína QQ, que es el ORF al que se le quiere asignar el taxón, se les realizó un análisis de homología de proteínas contra la base de datos RefSeq utilizando el programa DIAMOND (Buchfink et al., 2015), que permite aumentar la velocidad del programa *BLASTp*. Se utilizaron las condiciones por defecto, usando como formato de salida el formato tabular y únicamente 10 homólogos por cada ORF. A cada uno de los ORFs del *scaffold* se le asignó el taxón que más se repitiera entre los 10 homólogos obtenidos en el *BLASTp* de dicho ORF. Una vez identificados taxonómicamente los ORFs, se le asignó un taxón a cada *scaffold*. Para ello, se calculó el número de ORFs de dicho *scaffold* y se determinó a qué taxón pertenecía cada uno ellos. Si más del 30% de los ORFs estaban asignados al mismo taxón, y

éste era el mayoritario, se le asignó dicho taxón al *scaffold* y, por tanto, al homólogo de las proteínas QQ que estaba incluido en él. En el caso que ningún taxón fuera asignado a más del 30% de los ORFs del *scaffold*, éste quedaría sin ser asignado a ningún taxón, y no se podía conocer el taxón al que pertenecía el homólogo seleccionado. La asignación taxonómica se realizó a nivel de clase, y en caso de que esta fuera muy poco abundante, a nivel de filo. Esta metodología es estricta, pero permite asignar taxones con una elevada robustez. La metodología que se siguió está explicada de manera simplificada en la figura 10.

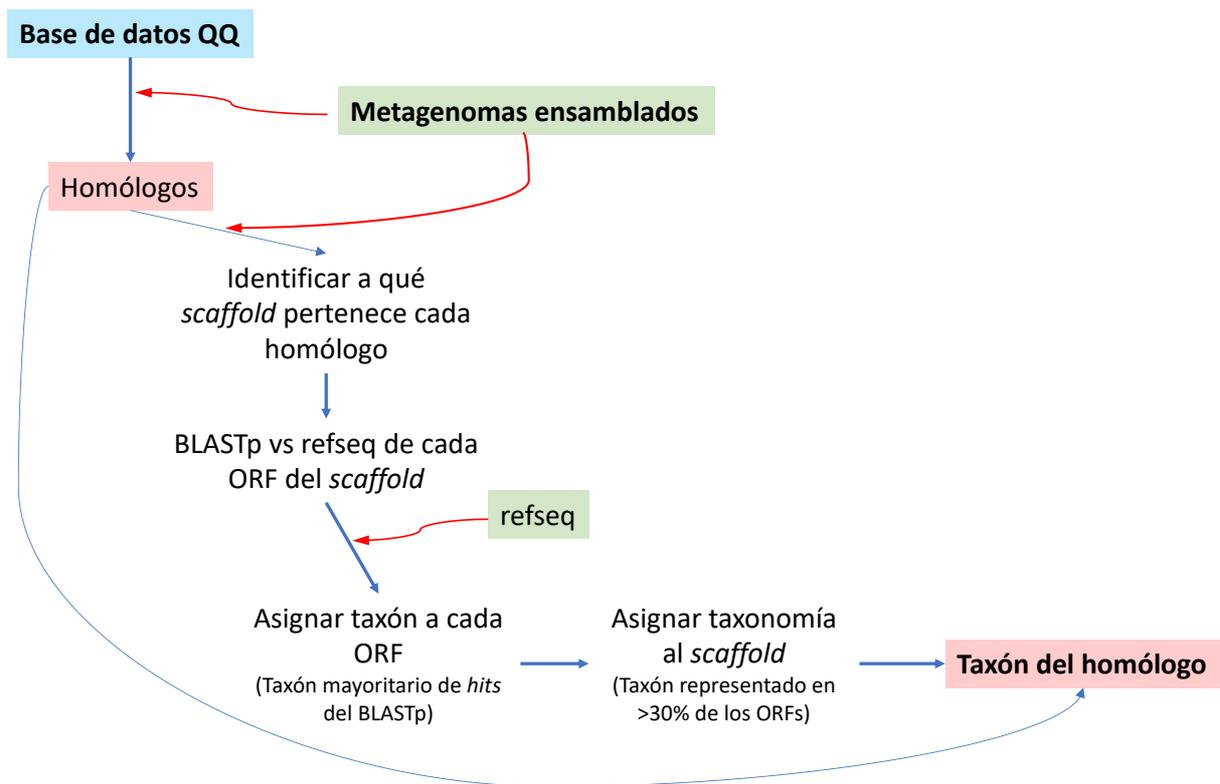


Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología seguida para la asignación taxonómica de cada uno de los homólogos.

Una vez asignados el taxón a cada homólogo, se representó la abundancia relativa de cada taxón en el total de los homólogos obtenidos.

Tras recuperar las secuencias de cada uno de los homólogos de los metagenomas y su asignación taxonómica (el taxón probable al que pertenece el *scaffold* que contiene dicho homólogo), se procedió a construir los árboles filogenéticos. Para ello, se realizaron los alineamientos, eliminación de huecos (zonas con baja calidad de alineamiento) y árboles filogenéticos, utilizando los programas *MAFFT* versión 7

(Katoh y Standley, 2013) , *BMGE* (Criscuolo y Gribaldo, 2010) y *FastTree* (Price et al., 2009) respectivamente, con las condiciones por defecto.

Para la visualización de los alineamientos una vez eliminadas las zonas con baja calidad de alinamiento se utilizó el programa BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)

4. Resultados

4.1. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de inhibir los sistemas *quorum sensing* mediante mecanismos no enzimáticos

4.1.1. Resumen/Summary

En este primer capítulo se han buscado compuestos inhibidores de sistemas *quorum sensing* mediante mecanismos no enzimáticos (QSI) a partir de 827 cepas de la microbiota de anémonas y holoturias, así como de sedimentos de tanques de cultivo, previamente aisladas en un proyecto anterior. Mediante ensayos de difusión en placa utilizando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 se seleccionó la cepa M3-10 por su alta actividad QSI. Esta se identificó como *Vibrio alginolyticus* en base a la secuencia del gen ARNr 16S, así como a los valores de ANIb y de hibridación digital (dDDH). El fraccionamiento bio guiado del extracto del cultivo de la cepa M3-10, seguido de los análisis mediante LC-MS y RMN, demostraron que la tiramina y *N*-acetiltiramina eran los compuestos activos responsables de la actividad QSI. Dicha actividad se confirmó utilizando estándares comerciales puros y se demostró que inhibían significativamente la producción de violaceína en *C. violaceum* ATCC 12472, así como algunos factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, tales como la pioverdina o la movilidad tipo *swarming* y *twitching*. Este trabajo constituye el primer estudio sobre la presencia de cepas productoras de QSI en la microbiota de anémonas y holoturias y aporta nueva información sobre el uso de QSI naturales como una posible estrategia para luchar frente a infecciones bacterianas.

In this first chapter, 827 strains from the microbiota of sea anemones and holothurians as well as from the aquaculture tanks sediment, previously isolated from a former project, were screened for their ability to produce quorum-sensing inhibitor (QSI) compounds. Using diffusion agar-plate assays with the biosensor *C. violaceum* ATCC 12472, the strain M3-10 was selected for its high QSI activity. This strain was identified as *Vibrio alginolyticus* by 16S rRNA gene sequencing, as well as ANIb and dDDH analyses. Bioassay-guided fractionation of the cell culture extract of strain M3-10, followed by LC-MS and NMR analyses, revealed tyramine and *N*-acetyltyramine as the active compounds. The QS inhibitory activity of these molecules, which was confirmed using pure commercially available standards, was found to significantly inhibit *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 violacein production and virulence factors, such as pyoverdine production, as well as swarming and twitching motilities, produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. This constitutes the first study to screen QSI-producing strains in the microbiota of anemones and holothurians and provides an insight into the use of naturally produced QSI as a possible strategy to combat bacterial infections.

4.1.2. Selección de cepas productoras de compuestos inhibidores de *quorum sensing*

a) Screening en placas microtiter

La selección de cepas productoras de compuestos QSI se realizó a partir de una colección de 827 aislados de la microbiota de invertebrados marinos pertenecientes a las especies *Anemonia sulcata*, *Actinia equina*, *Holothuria tubulosa* y *H. forskali* cultivados en las instalaciones de iMare SL, así como del sedimento del tanque de cultivo (tabla 5). En primer lugar, se realizó un screening de la capacidad de inhibición de QS en placa microtiter utilizando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, una cepa que tiene intacto el sistema QS y sintetiza el pigmento violaceína regulado por dicho sistema. Se obtuvieron 60 aislados (7,26%) positivos, es decir, cepas en cuyos pocillos no se producía la activación del biosensor y por tanto no se observaba color violeta. Este ensayo se repitió dos veces. Una imagen del ensayo se muestra en la figura 11, y las cepas activas se recogen en la tabla 15.

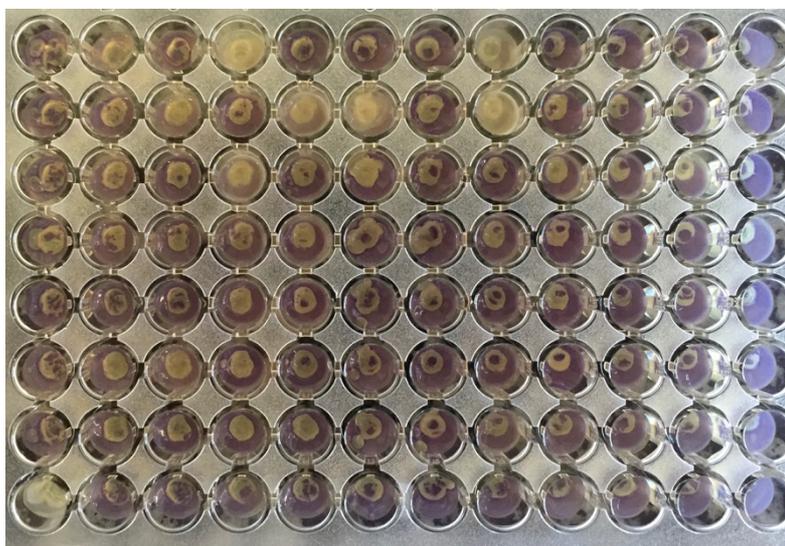


Figura 11. Screening de inhibición de sistemas QS en placa microtiter.

Tabla 15. Cepas seleccionadas en el primer screening de inhibición de QS y origen de las mismas.

Origen de la muestra	Número de cepas positivas	Cepas
M1-<i>Anemonia sulcata</i> (tentáculos)	6	M1-13, M1-14, M1-23, M1-9, M1-45, M1-68
M2- <i>Anemonia sulcata</i> (intestino)	5	M2-89, M2-71, M2-82, M2-8, M2-99
M3- <i>Holothuria tubulosa</i> (intestino)	7	M3-1, M3-13, M3-21, M3-78, M3-10, M3-11, M3-99
M4- <i>Holothuria tubulosa</i> (Líquido celómico)	10	M4-31, M4-116, M4-117, M4-34, M4-46, M4-119, M4-35, M4-85, M4-40, M4-126
M5-<i>Holothuria forskali</i> (intestino)	5	M5-31, M5-50, M5-23, M5-35, M5-47

Tabla 15 (continuación). Cepas seleccionadas en el primer screening de inhibición de QS y origen de las mismas.

Origen de la muestra	Número de cepas positivas	Cepas
M6- <i>Holothuria forskali</i> (líquido celómico)	15	M6-44, M6-35, M6-47, M6-36, M6-26, M6-50, M6-39, M6-51, M6-40, M6-52, M6-17, M6-41, M6-53, M6-54, M6-66
M7- <i>Actinia equina</i> (tentáculos)	0	-
M8- <i>Actinia equina</i> (intestino)	0	-
M9- <i>Holothuria</i> spp. (heces)	8	M9-8, M9-20, M9-29, M9-54, M9-57, M9-46, M9-59, M9-48
M10-Sedimento del tanque	4	M10-21, M10-11, M10-6, M10-18

b) Confirmación de la actividad QSI mediante ensayo de difusión en placa

La actividad QSI de las 60 cepas seleccionadas en el primer screening fue posteriormente confirmada mediante un ensayo de difusión en placa utilizando el biosensor *C. violaceum* ATCC 12472. El ensayo se repitió dos veces y se confirmó que 23 de las 60 cepas inhibían la producción de violaceína. El halo de inhibición se midió en todos los casos para seleccionar aquellas cepas en las que fuese mayor. Una muestra de los halos de inhibición obtenidos se muestran en la figura 12.



Figura 12. Ensayo de inhibición del sistema QS de *C. violaceum* ATCC 12472 mediante difusión en placa.

Las 23 cepas se identificaron taxonómicamente en base a la secuencia parcial del gen ARNr 16S (aproximadamente unas 800 pb). Todas las secuencias mostraron gran homología con especies del género *Vibrio*, predominando la similitud con *V. natriegens* DSM 759^T y *V. alginolyticus* NBRC 15630^T. Los diámetros de inhibición así como la homología del gen ARNr 16S con el taxón más cercano utilizando el programa EzBioCloud se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Identificación taxonómica y halo de inhibición de la producción de violaceína de las 23 cepas con actividad QSI.

Cepa	Identificación	% de identidad	Halo de inhibición de violaceína (mm)
M1-9	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	99,88	16
M2-99	<i>Vibrio antiquarius</i> EX25 ^T	100	13
M3-10	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	99,66	18
M3-21	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	15
M3-78	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	15
M3-99	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	15
M4-31	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	17
M4-35	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	12
M4-116	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	13
M4-117	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	12
M4-119	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	16
M4-126	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	99,9	11
M5-23	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	99,9	13
M5-35	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	16
M5-47	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	18
M5-50	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	99,9	13
M6-17	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	13
M6-26	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	13
M6-31	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	11
M6-39	<i>Vibrio zhuhaiensis</i> DSM16217 ^T	100	14
M6-50	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	17
M6-66	<i>Vibrio alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	100	15
M10-18	<i>Vibrio natriegens</i> DSM 759 ^T	100	14

c) Ensayo de *quorum quenching*

Tras la selección de las 23 cepas más activas, se determinó si la inhibición de QS observada se debía a un mecanismo enzimático o no. Para ello, se realizó un ensayo QQ con las AHLs C6-HSL y C10-HSL. En los 23 casos, la actividad enzimática sobre las AHLs fue descartada, por lo que se confirmó que la actividad QSI no era de tipo enzimática.

d) Obtención de extractos metanólicos

Las 5 cepas más activas (M3-10, M4-31, M4-119, M5-47 y M6-50) fueron seleccionadas para su estudio. En primer lugar, se determinó si la actividad QSI se encontraba en el interior celular o en el sobrenadante de cada bacteria. Para ello, se obtuvieron extractos del pellet celular (con metanol) y del sobrenadante (con acetato de etilo) de cada una de las cepas, tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos. Estos extractos se ensayaron a una concentración final de 0,8 mg/ml, ya que era una concentración similar a la que ha sido utilizada por otros autores (Kalia et al., 2019; Saurav et al., 2016), en un ensayo cuantitativo de inhibición de la producción de violaceína en el biosensor *C. violaceum* ATCC 12472. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Capacidad de inhibición de la producción de violaceína de los extractos del pellet celular y del sobrenadante de las cinco cepas con actividad QSI más activas.

Cepa	Extracto	Producción de violaceína (absorbancia a 585 nm)
M3-10	Pellet celular	0.034
	Sobrenadante	0.206
M4-31	Pellet celular	0.044
	Sobrenadante	0.282
M4-119	Pellet celular	0.06
	Sobrenadante	0.276
M5-47	Pellet celular	0.044
	Sobrenadante	0.216
M6-50	Pellet celular	0.042
	Sobrenadante	0.280
	MeOH (Control negativo)	0.489

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la cepa M3-10 fue seleccionada para los siguientes estudios, ya que demostró que tanto el pellet celular como el sobrenadante eran los más activos.

4.1.3. Caracterización de la cepa de *Vibrio alginolyticus* M3-10, inhibidora de *quorum sensing*

a) Obtención de extractos de la cepa *V. alginolyticus* M3-10 y comprobación de su potencial actividad QSI

Dado que, tanto el pellet celular como el sobrenadante de la cepa M3-10 habían resultado ser los más activos en el ensayo de inhibición de QS llevado a cabo con el biosensor *C. violaceum* ATCC 12472, se obtuvo un extracto de un cultivo de 3 L de 5 días de esta cepa. Por una parte, el pellet se trató con 600 ml de metanol. Se secó y el producto resultante se resuspendió en 45 ml de metanol. Seguidamente, este extracto se añadió al sobrenadante del cultivo (aproximadamente 3 L) y, posteriormente, se extrajo con la resina SP207ss (65g, 32 x 100 mm). Esto fue debido a que, si bien la mayor parte de la actividad se había observado en el pellet celular, también se observó que el extracto del sobrenadante del cultivo era activo (tabla 17), y que, por tanto, la molécula o moléculas responsables de la actividad también debían estar en el mismo. De esta forma, se pretendió conseguir extraer la mayor cantidad posible de moléculas activas, de ahí que tras extraer los compuestos del pellet, el producto se uniera al sobrenadante para su extracción con la resina.

Una vez obtenido el extracto de la cepa M3-10, se evaluó su actividad QSI. Se analizó dicho extracto a una concentración de 0,8 mg/ml mediante un ensayo en placa microtiter con el biosensor *C. violaceum* ATCC 12472, confirmándose de nuevo que era activo.

b) Determinación de la actividad QSI del extracto de la cepa *V. alginolyticus* M3-10 sobre la expresión de factores de virulencia de bacterias patógenas

El siguiente paso en el estudio fue determinar si el extracto metanólico de la cepa M3-10 con actividad QSI tenía algún efecto sobre la producción de factores de

virulencia de bacterias patógenas. Como paso previo, se analizó si tenía actividad antibacteriana y para ello, se ensayó frente a las bacterias *P. aeruginosa* PAO1 y *C. violaceum* ATCC 12472. Tras crecer las bacterias durante 24h en presencia de dicho extracto a una concentración final de 0,8 mg/ml, se realizó un recuento en placa de las mismas. El resultado indicó que el crecimiento de las bacterias no se vió afectado por la presencia del extracto a dicha concentración.

El efecto del extracto de la cepa M3-10 sobre distintas funciones y fenotipos celulares controlados por QS se analizó en dos patógenos, *P. aeruginosa* PAO1 y *C. violaceum* ATCC 12472 en los que se ha demostrado que existe dicha regulación. Así, se determinó la producción de pioverdina, formación de biofilms y diferentes tipos de movilidad en *P. aeruginosa* PAO1 y la producción de violaceína en *C. violaceum* ATCC 12472. Los resultados se muestran en la tabla 18 y demuestran que el extracto de la cepa M3-10 fue capaz de reducir la producción de violaceína en *C. violaceum* ATCC 12472 en un 66%, y que incluso redujo la formación de biofilm, la producción de pioverdina y la movilidad en *P. aeruginosa* PAO1. Se observaron visualmente diferencias en la movilidad tipo *swimming*, *swarming* y *twitching*, pero solo fueron estadísticamente significativas en el caso de la movilidad tipo *swimming*.

Tabla 18. Determinación de algunos fenotipos en *C. violaceum* ATCC 14274 y *P. aeruginosa* PAO1 tras el cultivo en ausencia y en presencia del extracto de *V. alginolyticus* M3-10.

	Media en ausencia del extracto de M3-10	Media en presencia del extracto de M3-10
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472		
Violaceína (% de producción)	100 [±10.9]	33.89 * [±17.1]
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
Pioverdina (% de producción)	100 [±16.1]	74.02* [±8]
Biofilm (% de producción)	100 [±12.7]	71.96* [±5.9]
<i>Swimming</i> (% movilidad)	55.6 [±8.1]	42.8* [±2.5]
<i>Swarming</i> (% movilidad)	39.46 [±15.3]	27.36 [±9.6]
<i>Twitching</i> (% movilidad)	39.15 [±13.6]	31.54 [±10.7]

* = $p < 0.05$.

c) Identificación de los compuestos responsables de la actividad QSI

Para identificar los posibles compuestos QSI entre los metabolitos presentes en el extracto crudo metanólico de *V. alginolyticus* M3-10, se llevó a cabo un fraccionamiento bioguiado del mismo. El extracto obtenido de los 3 L de cultivo se fraccionó en primer lugar mediante una cromatografía *flash* de baja resolución de fase reversa (figura 13). De esta forma se generaron 25 fracciones, que se probaron a una concentración de 0,8 mg/ml, siendo únicamente activas las fracciones 12 y 13.

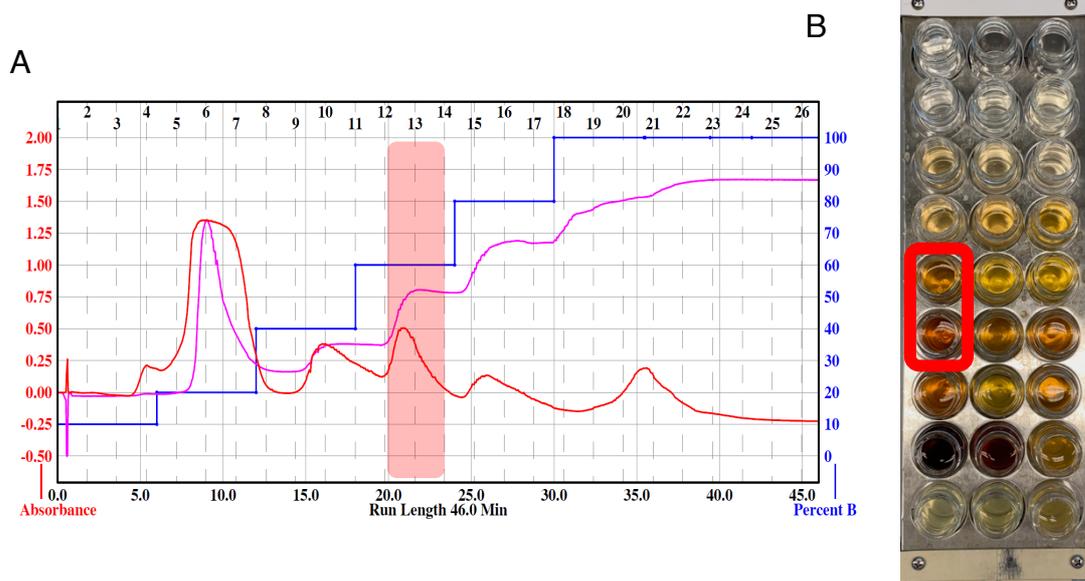


Figura 13. Cromatografía *flash* de baja resolución llevada a cabo al extracto de *V. alginolyticus* M3-10. A) Cromatograma. Disolvente A: agua, disolvente B: acetona. Flujo: 10ml/min. Línea roja: Absorbancia a 210 nm. Línea azul: Absorbancia a 280 nm. Las fracciones 12 y 13, con actividad QSI, están marcadas en color rojo. B) Fracciones obtenidas en la cromatografía *flash*. Las fracciones 12 y 13 están marcadas con un recuadro rojo.

Las fracciones 12 y 13 se mezclaron y nuevamente se refraccionaron mediante cromatografía semipreparativa de fase reversa HPLC para generar 80 fracciones (figura 14). Tras secar las 80 fracciones, éstas se resuspendieron en 300 μ l cada una y se repartieron en placas con 25, 50 y 200 μ l. Finalmente, se evaporaron y probaron en un volumen final de 200 μ l de un cultivo de *C. violaceum* ATCC 12472. Los resultados demostraron que la fracción 13 era la más activa, detectándose menor actividad en las dos fracciones contiguas 12 y 14 (figura 14, tabla 19). En todas ellas, el color violeta debido a la producción de violaceina se perdía, pero sí se observaba turbidez, descartándose nuevamente el mecanismo de antibiosis como responsable de la actividad.

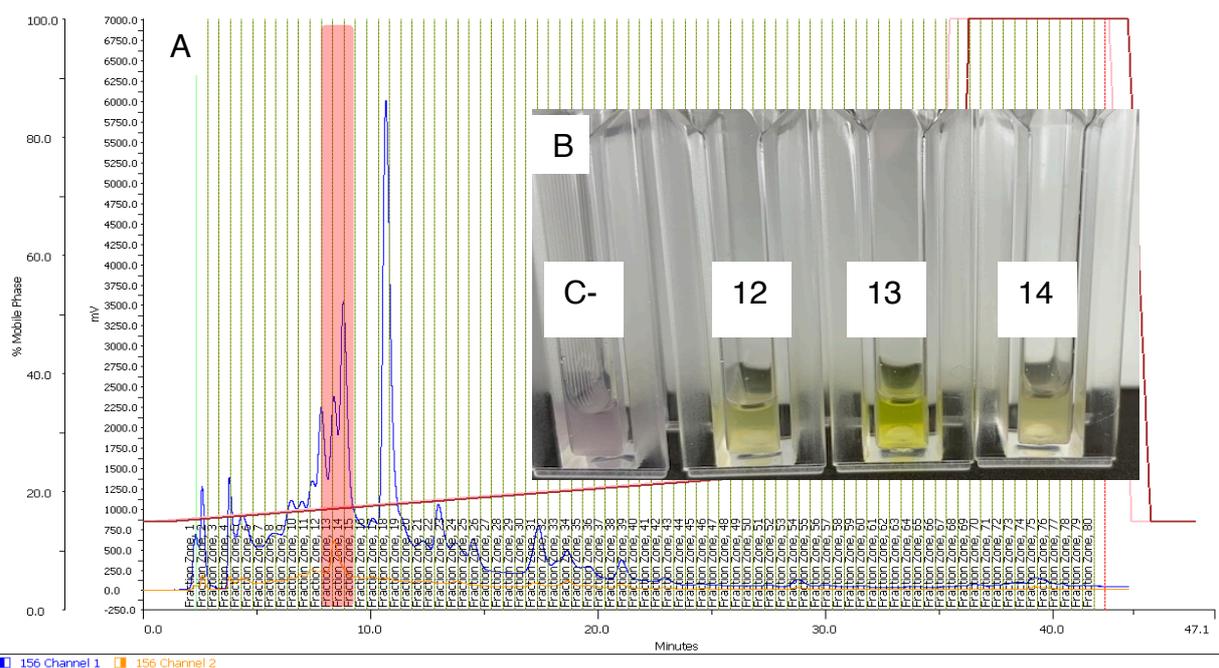


Figura 14. Fraccionamiento mediante cromatografía semipreparativa HPLC de la unión de las fracciones 12 y 13 previamente obtenidas mediante cromatografía CombiFlash (A). Ensayo QSI con las fracciones 12, 13 y 14 (B). Disolvente A: agua. Disolvente B: acetonitrilo. Flujo: 10ml/min. Las fracciones 12, 13 y 14 están señaladas en rojo.

Las tres fracciones activas se analizaron mediante LC-DAD-HRMS y RMN (espectros ^1H , COSY, TOCSY, HSQC, y HMBC) para identificar la existencia de compuestos conocidos. La desreplicación se llevó a cabo utilizando las bases de datos de compuestos químicos con actividad biológica (Martín et al., 2014; Pérez-Victoria et al., 2016) de la fundación MEDINA, lo que permitió identificar la presencia de los compuestos tiramina y *N*-acetiltiramina (figura 15) en cada una de las tres fracciones (figura suplementaria 1).

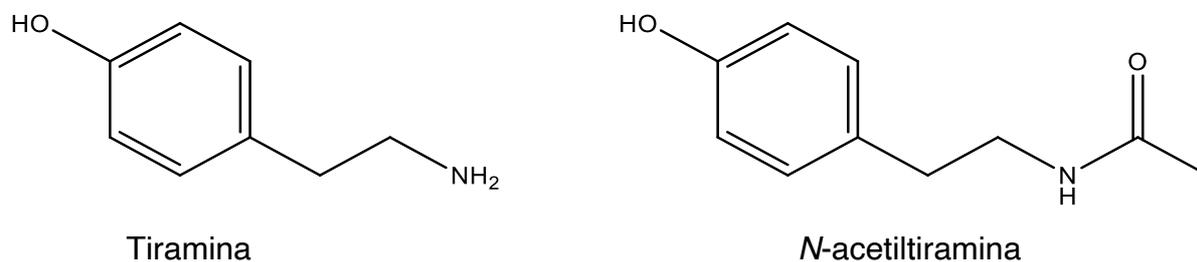


Figura 15. Estructura de las moléculas tiramina y *N*-acetiltiramina.

Por otro lado, se identificaron en las tres fracciones las señales RMN de los dos compuestos, que eran compatibles con las ya reportadas para la tiramina y la *N*-acetiltiramina; mientras que las señales correspondientes a otros compuestos (DKPs) solo se observaron en una o dos de las tres fracciones bioactivas (figuras S2-S4). La

interpretación de los espectros RMN bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) confirmó la desreplicación de tiramina y *N*-acetiltiramina en las tres fracciones y estableció la presencia de ciclo-(L-Leu-L-*trans*-4-hidroxirolina) en la fracción 12 y de ciclo-(D-Phe-L-*trans*-4-hidroxirolina) en las fracciones 12 y 14. Adicionalmente, la identificación de tiramina y *N*-acetiltiramina se completó con la comparación directa de los espectros de RMN (1H y HSQC) de las tres fracciones bioactivas con los espectros de los estándares comerciales de estos dos compuestos, obtenidos en el mismo espectrofotómetro (figuras S5-S11 y tablas S1 y S2). La abundancia relativa de tiramina, *N*-acetiltiramina y las DKPs en las tres fracciones se obtuvo a través de los espectros 1H RMN (tabla S1), indicando que tanto tiramina como *N*-acetiltiramina debían ser los compuestos QSI producidos por la cepa *V. alginolyticus* M3-10.

En el extracto crudo, junto con tiramina y *N*-acetiltiramina, se identificaron también dos DKPs, aunque la abundancia de cada una fue diferente en las tres fracciones bioactivas. Las DKPs identificadas fueron ciclo-(L-Leu-L-*trans*-4-hidroxirolina) (o su enantiómero) (DKP1) en la fracción 12 y ciclo-(D-Phe-L-*trans*-4-hidroxirolina) (o su enantiómero) (DKP2) en las fracciones 13 y 14 en cantidades similares (tabla 19). DKP1 solo estuvo presente en la fracción 12, mientras que DKP2 solo se encontró en las fracciones 13 y 14. Sin embargo, se descartó a las DKPs como las principales responsables de la actividad QSI ya que, por un lado, la fracción 13 era la más activa y tenía la misma concentración de DKP2 que la fracción 14 y por otro, la fracción 12, que contenía DKP1, era menos activa que la 13. Esta idea se refuerza debido a que la fracción más activa, la número 13, era la que más abundancia relativa en conjunto tenía de tiramina y *N*-acetiltiramina, seguida por la fracción 12 y 14.

Tabla 19. Abundancia relativa estimada por RMN de tiramina, *N*-acetiltiramina y de las DKP encontradas en las fracciones HPLC activas (12, 13 y 14).

Fracción de HPLC	Actividad QSI*	Tiramina	<i>N</i> -acetiltiramina	DKP1**	DKP2**
Fracción 12	++	1.0	1.6	5.0	0
Fracción 13	+++	1.1	3.5	0	4.1
Fracción 14	+	1.1	0.4	0	3.9

*La actividad QSI cualitativa en el ensayo con el biosensor también se indica: + baja actividad, ++ actividad media y +++ elevada actividad.

**DKP1= ciclo-(L-Leu-L-*trans*-4-hidroxirolina); DKP2= ciclo-(D-Phe-L-*trans*-4-hidroxirolina)

d) Evaluación de la actividad QSI de los productos comerciales puros de tiramina y *N*-acetiltiramina en *C. violaceum*

A la vista de los resultados anteriores, se propuso a la tiramina y *N*-acetiltiramina como las moléculas responsables de la actividad QSI de la cepa *V. alginolyticus* M3-10. Dado que estas moléculas estaban disponibles comercialmente, se evaluó y confirmó su actividad QSI utilizando dichos compuestos de naturaleza sintética en *C. violaceum* ATCC 12472.

Para realizar el ensayo, se creció la bacteria en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de cada compuesto (0 - 2 mg/ml), disuelto en metanol, y se esperó a que se evaporara el disolvente para añadir el cultivo. Como controles, se crecieron las bacterias en las mismas concentraciones de metanol, una vez evaporado.

El crecimiento bacteriano se comprobó también en presencia y ausencia de distintas concentraciones de tiramina y *N*-acetiltiramina mediante el correspondiente recuento en placa. El resultado indicó que no existían diferencias de crecimiento por debajo de una concentración final de 1 mg/ml, lo que descartaba que el mecanismo de inhibición de la producción de violaceína se debiera a la inhibición de crecimiento (figura 16).

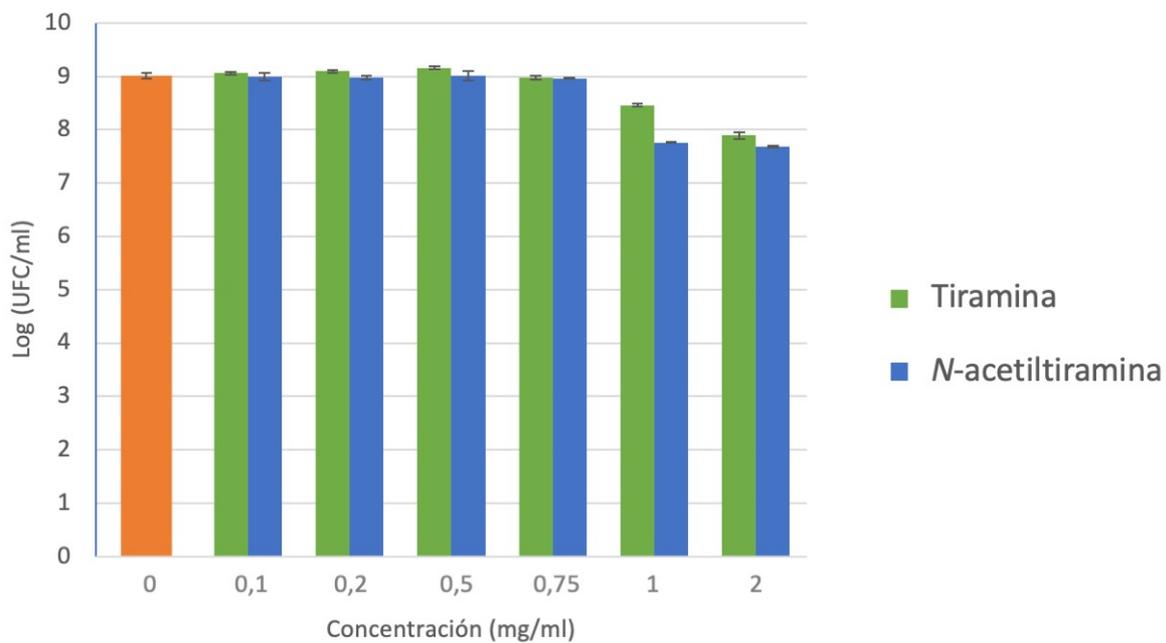


Figura 16. Crecimiento de *C. violaceum* ATCC 12472 en presencia de tiramina (verde) y *N*-acetiltiramina (azul). Los datos reflejan el logaritmo de la media de UFC/ml \pm SD, n= 3.

Con respecto a los efectos sobre la producción de violaceína, los resultados demostraron que ambas moléculas eran capaces de inhibir en más de un 85% ($99 \pm 0.6\%$ en el caso de la tiramina y $86,7 \pm 0.1\%$ *N*-acetiltiramina) la producción de violaceína de *C. violaceum* ATCC 12472 cuando se usaron a una concentración final de 1 mg/ml, mientras que a una concentración final de 0,5 mg/ml, la disminución en la producción de violaceína fue superior al 75% ($86,9 \pm 9\%$ en el caso de tiramina y $75 \pm 4.9\%$ para *N*-acetiltiramina). Tal y como se muestra en la figura 17, el compuesto tiramina fue generalmente más activa que la *N*-acetiltiramina. En todos los casos, la reducción de violaceína se refiere a la comparación con el control, en el que se creció la bacteria en la misma concentración de metanol.

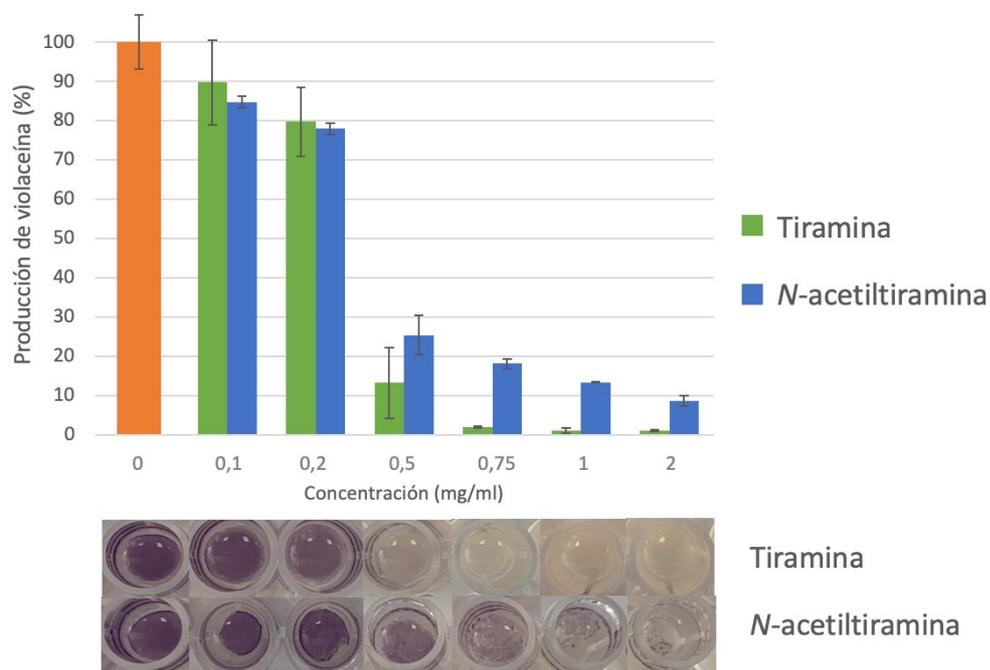


Figura 17. Actividad QSI de tiramina (verde) y *N*-acetiltiramina (azul) en la producción de violaceína en *C. violaceum* ATCC 12472.

e) Evaluación de la actividad QSI de los productos comerciales puros de tiramina y *N*-acetiltiramina en *P. aeruginosa*

La efectividad de los compuestos tiramina y *N*-acetiltiramina en la modificación de las características fenotípicas relacionadas con factores de virulencia se evaluó utilizando el patógeno *P. aeruginosa* PAO1, en el que como se ha indicado anteriormente, están regulados mediante QS. Para ello, la bacteria se creció en presencia de cada uno de los compuestos con concentraciones comprendidas entre 0 y 2 mg/ml y se determinó si tenía algún efecto en el crecimiento celular. En todos los casos como control se creció la bacteria en la misma cantidad de metanol, previamente evaporado. Los recuentos en placa indicaron que no existía efecto inhibitor del crecimiento del patógeno a esas concentraciones (figura 18).

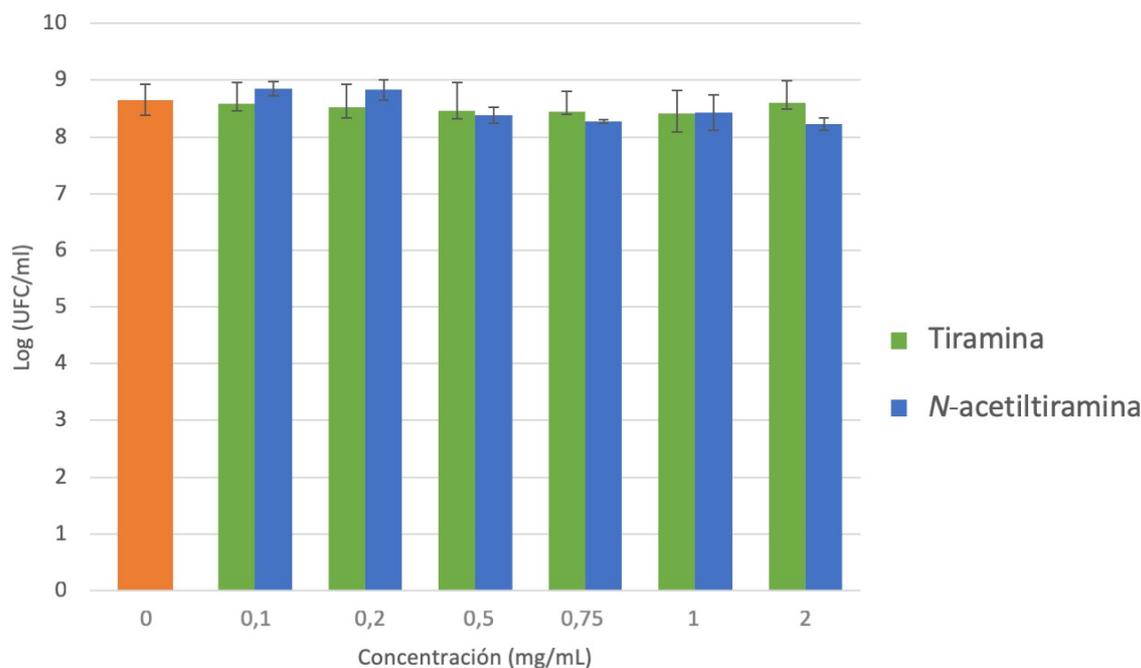


Figura 18. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 en presencia de tiramina (verde) y *N*-acetiltiramina (azul). Los datos reflejan el logaritmo de la media de UFC/ml \pm SD, n= 3.

En relación al efecto sobre las características fenotípicas, los resultados demuestran que a medida que se aumenta la concentración de los compuestos QSI, se produce una mayor reducción de la producción de pioverdina. Debido a que una concentración de 1 mg/ml de ambos compuestos no afectaba el crecimiento bacteriano y era suficiente para lograr una reducción importante en la producción de pioverdina, esta concentración se seleccionó para realizar los ensayos de movilidad. En estas condiciones, la tiramina fue capaz de reducir la producción de pioverdina en un 65% ($\pm 4,6\%$), así como las movilidades tipo *swarming* en un 50% ($\pm 2,8\%$), *twitching* en un 56% ($\pm 6,2\%$) y *swimming* en un 41% ($\pm 3,6\%$). Por su parte, *N*-acetiltiramina fue capaz de inhibir la producción de pioverdina en un 40% ($\pm 1,1\%$) y redujo la movilidad tipo *swarming* en un 44,5% ($\pm 1,5\%$) y *swimming* en un 23% ($\pm 4,1\%$) (figura 19). Al igual que en el caso del ensayo de violaceína, la tiramina resultó más eficaz que la *N*-acetiltiramina en la reducción de la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* PAO1.

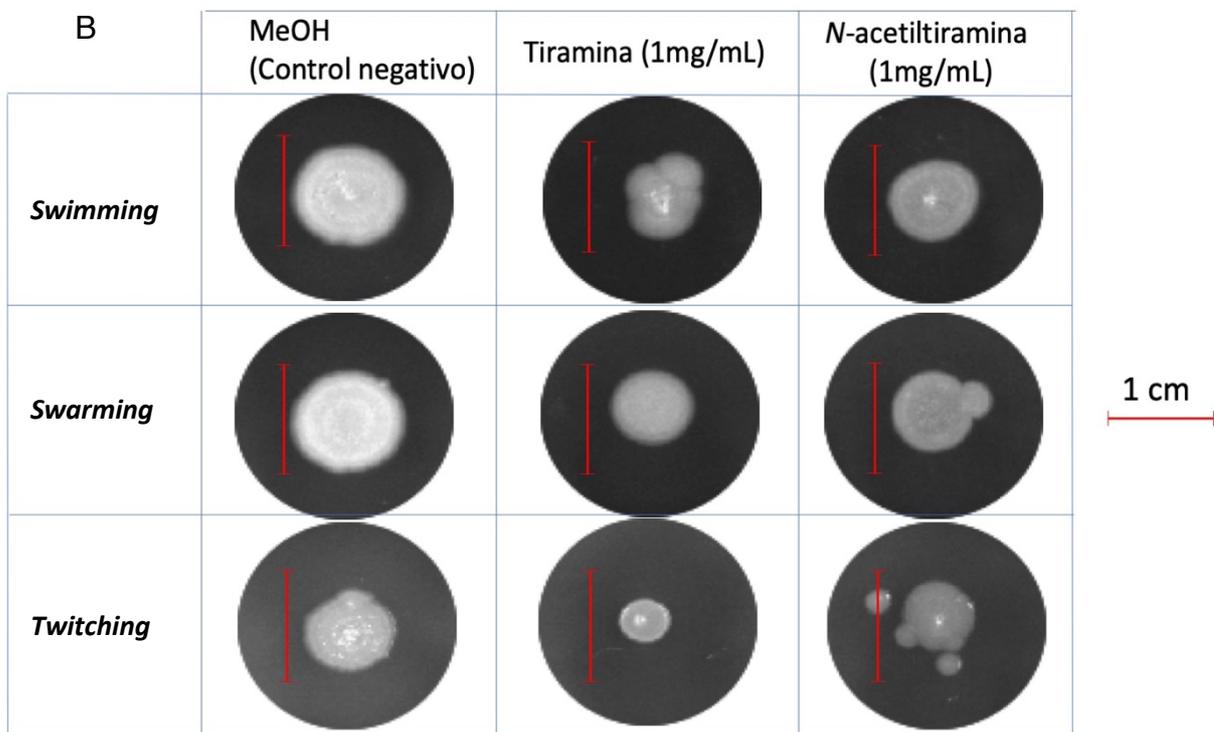
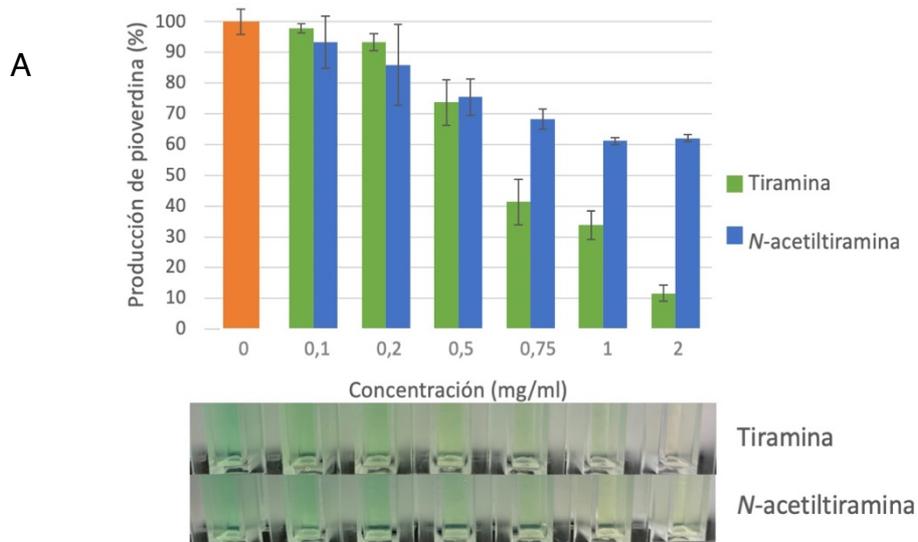


Figura 19. Actividad QSI de tiramina y N-acetiltiramina. A. Efecto de tiramina (barras verdes) y N-acetiltiramina (barras azules) en la producción de pioverdina de *P. aeruginosa* PAO1. B. Efecto en la movilidad tipo *swimming*, *swarming* y *twitching* de *P. aeruginosa* PAO1. Los valores se presentan como la media \pm SD, n=3. La barra de escala representa un centímetro. El porcentaje de reducción se calculó en base al área de expansión, obtenida mediante el análisis de la imagen con ImageJ.

f) Análisis genómico de la cepa *V. alginolyticus* M3-10

El análisis de la secuencia parcial (800 pb) del gen ARNr 16S de la cepa M3-10 identificó la misma como *V. alginolyticus*, con una homología del 99,66 %. No

obstante, para poder identificar correctamente la cepa M3-10 y analizar la presencia de posibles genes relacionados con la producción de los compuestos con actividad QSI, se realizó su análisis genómico. Para ello, se secuenció el ADN de la cepa M3-10 en las instalaciones de STABVida en Portugal, obteniendo un total de 7.513.914 lecturas. Las secuencias se limpiaron con el programa “bbDUK” que permite eliminar contaminantes, adaptadores y bases de baja calidad. Por último, las secuencias se ensamblaron con SPADES, obteniendo un genoma provisional de 70 *contigs* que correspondía a un tamaño de 5,1 Mb, con una cobertura aproximada de 160X. Este genoma se depositó en la base de datos NCBI con el número de acceso SEYX00000000.

Con el genoma secuenciado, se obtuvo la secuencia completa del ARNr 16S de la cepa M3-10 y se comparó con las depositadas en las bases de datos utilizando EzBioCloud. La homología con el gen ARNr 16S de *V. alginolyticus* NBRC 15630^T resultó ser del 100%, indicando que se trataba de una cepa de esta especie. Seguidamente, se comparó el genoma y se calculó el valor de ANIb de la cepa M3-10 con las demás cepas de *V. alginolyticus* cuyos genomas estaban disponibles en NCBI, que eran 38. Entre las cepas, tres de ellas mostraron valores de ANIb con el resto menores al 95%, que es el límite propuesto para la delimitación de especies (Richter y Rosselló-Móra, 2009). Por ello, estas tres cepas no se usaron para el análisis, ya que se consideraron cepas de otra especie. Los resultados de la comparación de los genomas en base a su ANIb se encuentran en la tabla 19. La cepa M3-10 mostró un máximo del 98,6% de similitud en su genoma con el resto de cepas de *V. alginolyticus*, lo que indicó potenciales diferencias genómicas.

Posteriormente, se realizó un árbol de agrupamiento basado en los valores de ANIb siguiendo el algoritmo neighbor-joining. Este árbol se presenta en la figura 20, en el que se observa cómo la cepa M3-10 se agrupa en una rama distinta del árbol junto con otras dos cepas.

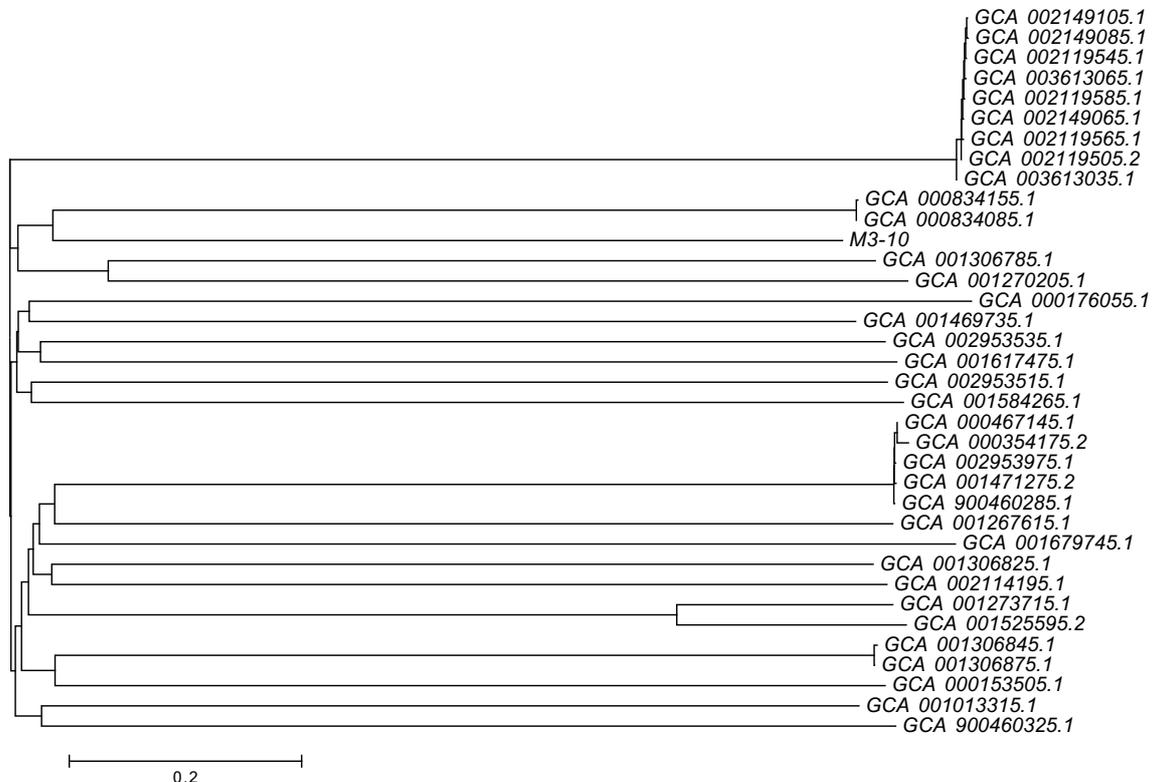


Figura 20. Árbol filogenético neighbor-joining basado en los valores de ANIb de las distintas cepas de *V. alginolyticus*.

El genoma de la cepa M3-10 se comparó con las 4 cepas más cercanas que aparecían en el árbol de la figura 20 usando el software BRIG. La figura 21 muestra tanto las diferencias entre las cepas como las zonas del genoma que están presentes en M3-10 y que no lo están en las otras cepas.

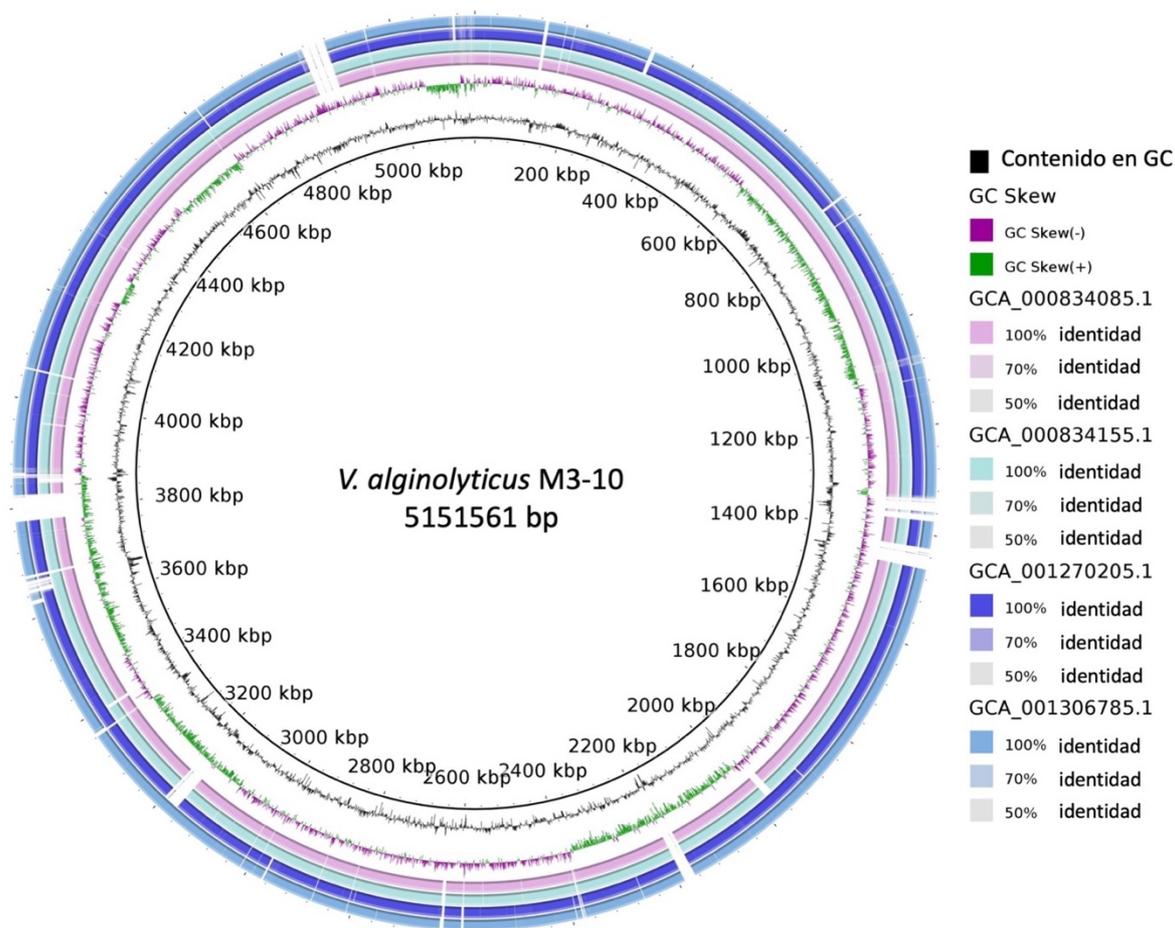


Figura 21. Diagrama obtenido con BRIG de las secuencias cromosómicas de las cepas de *V. alginolyticus* más cercanas a M3-10, que han sido usadas como referencia. Los huecos en el diagrama indican áreas del genoma presentes en M3-10 pero ausentes en las otras.

Dado que las moléculas responsables de la actividad QSI fueron tiramina y *N*-acetiltiramina, se buscó en el genoma de la cepa M3-10 genes relacionados con la síntesis de las mismas. La tiramina es un producto metabólico derivado de la tirosina y es sintetizado a través de la descarboxilación de la tirosina mediante las enzimas tirosín-descarboxilasas. Por ello, se realizó una búsqueda en el genoma de la cepa M3-10 de varias enzimas tirosín-descarboxilasas conocidas cuyas secuencias estaban depositadas en el NCBI (tabla 9) mediante el programa BLASTp. Como resultado del rastreo, se encontraron dos proteínas en el genoma de la cepa M3-10 que tenían homología con dichas enzimas. Los dos genes correspondientes a dichas proteínas (PRJNA521164:EWT61_07200 y PRJNA521164:EWT61_20070) estaban anotados de manera automática como aspartato 1-descarboxilasa dependiente de piridoxal putativa y como aminotransferasa de clase de plegadura III dependiente de piridoxal-fosfato, respectivamente. La proteína PRJNA521164:EWT61_07200 tenía un 26% de identidad con la tirosín-descarboxilasa de *Lactobacillus curvatus* (BAE02559.1), mientras que PRJNA521164:EWT61_20070 compartía el 26% de su secuencia de aminoácidos con la enzima tirosín-descarboxilasa de *Pseudomonas entomophila* (BAI67125.1). También, se llevó a cabo una búsqueda de dominios conservados y se encontró que el dominio DOPA_deC, comúnmente encontrado en

las tirosín-descarboxilasas, estaba también en las dos proteínas identificadas en el genoma M3-10 con potencial homología con tirosín-descarboxilasas (e-valor de $8,31e-70$ para la proteína PRJNA521164:EWT61_07200 y $2.38e-115$ para PRJNA521164:EWT61_20070). Otro dominio conservado típico en las tirosín-descarboxilasas es el correspondiente a “liasa eliminadora de beta”, y de nuevo se encontró ese dominio en las dos proteínas con homología a tirosín-descarboxilasas en el genoma de la cepa M3-10 (e-valor de $3,95e-40$ para la proteína PRJNA521164:EWT61_07200 y $5,72e-94$ para PRJNA521164:EWT61_20070).

Por otra parte, y aunque las DKPs no fueran las principales responsables de la actividad QSI, su síntesis se debe en la mayoría de las ocasiones a la presencia de clusters de NRPS (sintasas de péptidos no ribosomales). Gracias a la búsqueda a través del programa ANTISmash V 4.2.0 (Blin et al., 2017) se identificó la presencia de un cluster NRPS en el genoma de la cepa M3-10.

4.1.4. Discusión

En este capítulo se ha realizado un screening de la actividad inhibidora de sistemas QS mediante mecanismos no enzimáticos a partir de 827 cepas aisladas de la microbiota de anémonas y holoturias, y en las que se había demostrado previamente su potencial biotecnológico como fuente de antimicrobianos (León-Palmero et al., 2018). En primer lugar, se seleccionaron 23 cepas por su capacidad de interferir con la producción de violaceína de *C. violaceum* ATCC 12472. Es interesante resaltar que todas las cepas seleccionadas pertenecieron al género *Vibrio*. Este resultado no es de extrañar ya que en este género, en el que los sistemas QS están muy bien estudiados (Defoirdt, 2018), también se han encontrado cepas productoras de compuestos QSI (Ma et al., 2018; Tait et al., 2010).

La cepa M3-10 se seleccionó para este estudio por tener mayor actividad QSI frente a *C. violaceum* ATCC 12472. La identificación taxonómica en base a la secuencia parcial del gen ARNr 16S, y posteriormente en base a la secuenciación del genoma completo y los valores de ANIb, indicaron que se trataba de una cepa perteneciente a la especie *Vibrio alginolyticus*. Sin embargo, a pesar de tener una identidad del 100%, esta cepa difiere ligeramente desde un punto de vista genómico, de otras cepas de la misma especie, lo que es importante debido a que existen cepas de *V. alginolyticus* que son potencialmente patógenas (Baker-Austin et al., 2018).

Tras la selección e identificación de la cepa, se realizaron sucesivos fraccionamientos bioguiados con el objetivo de determinar cuáles eran los compuestos responsables de la actividad QSI. En primer lugar, se obtuvo un extracto del pellet celular y del sobrenadante, observándose que a una concentración de 0,8 mg/ml la actividad QSI estaba presente en ambos extractos pero era mayor en el pellet celular, reflejando una mayor concentración de los compuestos QSI en el interior de las células. Este resultado sugiere que se necesita una concentración intracelular mínima para conseguir un nivel umbral que permita la secreción de los compuestos QSI al medio extracelular, bien mediante un mecanismo de difusión pasiva (por ejemplo, una porina) o bien mediante una secreción activa (por ejemplo, un transportador).

Para comprobar la actividad QSI en el extracto de la cepa M3-10 se utilizaron las cepas *C. violaceum* ATCC 12472 y *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* es uno de los patógenos nosocomiales más reconocidos (Pachori et al., 2019) y, además, se conocen perfectamente sus sistemas QS y el control que ejercen sobre factores de virulencia tales como la pioverdina o la movilidad, que son fáciles de determinar en el laboratorio (Musthafa et al., 2011; Soukarieh et al., 2018b). Por su parte, *C. violaceum* ATCC 12472 ha demostrado ser un patógeno oportunista en ciertas ocasiones (Durán et al., 2016) y el control de su pigmento violaceína está bajo el control de QS (Morohoshi et al., 2008a). De hecho, esta bacteria ha sido utilizada en muchas ocasiones como herramienta para el screening de moléculas con actividad QSI (Chen et al., 2019; Ma et al., 2018). El extracto del pellet celular de *V. alginolyticus* M3-10 fue capaz no solo de reducir en más del 50 % la producción de violaceína de *C. violaceum* ATCC 12472, sino que también redujo la producción de varios factores de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 como la formación de biofilm, la producción de pioverdina y la movilidad, por lo que potencialmente podría reducir la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. Es necesario destacar que, aunque el extracto afectó a los tres tipos de movilidad (*swimming*, *swarming* y *twitching*), solo la reducción en la movilidad tipo *swimming* fue significativa.

Los resultados obtenidos respecto a *P. aeruginosa* PAO1 son muy relevantes para el potencial uso biotecnológico de la cepa M3-10, ya que *P. aeruginosa* es uno de los patógenos nosocomiales más importantes, siendo el responsable de un elevado porcentaje de infecciones hospitalarias (Pachori et al., 2019). De hecho, es la bacteria gram negativa más común que causa neumonías adquiridas en Estados Unidos (Nathwani et al., 2014). Uno de los principales problemas respecto al control de las infecciones causadas por esta bacteria es que suele ser multirresistente a los antimicrobianos, lo que limita el potencial tratamiento de estas infecciones (Nathwani et al., 2014; Pachori et al., 2019). Los sistemas QS de este patógeno son bien conocidos y se sabe la relevancia de su virulencia (Soukarieh et al., 2018b) por lo que la interferencia de los mismos se ha propuesto como una novedosa estrategia en la búsqueda de alternativas al uso de antimicrobianos contra este patógeno (Wagner et al., 2016).

Para identificar la molécula responsable de la actividad QSI de la cepa M3-10, se preparó un extracto a partir del cultivo completo ya que los experimentos anteriores habían mostrado que, si bien la actividad era mayor en el extracto del pellet, también estaba presente en el sobrenadante. El fraccionamiento bio guiado del extracto crudo del cultivo de M3-10 y los posteriores análisis mediante RMN y LC-DAD-HRMS demostraron la presencia de tiramina y *N*-acetiltiramina en las fracciones más activas. Su papel como moléculas responsables de inhibir los sistemas QS se confirmó al añadir las mismas, adquiridas comercialmente, a cultivos de *C. violaceum* ATCC 12472 y observar la reducción de la producción de violaceína. Del mismo modo, al añadir dichas moléculas a cultivos de *P. aeruginosa* PAO1, se observó una reducción en la producción de pioverdina y en la movilidad de la misma, siendo mayor el efecto de tiramina que de *N*-acetiltiramina.

La actividad QSI también ha sido identificada por otros autores en la molécula hordenina, que es otro derivado de la tiramina. Este compuesto ha demostrado ser capaz de inhibir los sistemas QS de *P. aeruginosa* (Zhou et al., 2018) y de *Serratia marcescens* (Zhou et al., 2019) cuando se añadía a concentraciones finales de 0,5 mg/ml a 1 mg/ml. Esto está en consonancia con nuestros resultados, en los que tiramina y *N*-acetiltiramina fueron activos a concentraciones de 0,5 mg/ml para inhibir la producción de violaceína en *C. violaceum* ATCC 12472 y entre 1 y 2 mg/ml para inhibir los fenotipos controlados por QS de *P. aeruginosa* PAO1. Estas concentraciones no influyen en el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, la concentración de 2 mg/ml de tiramina y *N*-acetiltiramina sí fue tóxica para *C. violaceum* CV026, no así para *P. aeruginosa* PAO1. Nuestros resultados también se corresponden con el hecho de que otras moléculas asociadas con la tiramina, como *N*-(2'-feniletíl)-isobutiramida, 3-metil-*N*-(2'-feniletíl)-butiramida (Teasdale et al., 2009) o 4-(2-hidroxietil)-fenol y acetato de tirosol (Martínez-Matamoros et al., 2016) han demostrado ser capaces de inhibir fenotipos asociados a QS.

La molécula tiramina es un producto del catabolismo de los aminoácidos, que se encuentra por ejemplo en el pescado (Prester, 2011) o en el queso (del Rio et al., 2019) y que es producida por las bacterias, existiendo cepas de la misma especie con capacidad de producirla y otras que no (Kuley y Özogul, 2011). Su síntesis depende de enzimas descarboxilasas dependientes de piridoxal fosfato (Marcobal et al., 2012), presentes tanto en bacterias gram positivas productoras de tiramina (Marcobal et al., 2012), como en bacterias gram negativas como las pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* (Maifreni et al., 2013; Marino et al., 2000) y *Aeromonadaceae* (Kuley y Özogul, 2011). En el caso de la cepa M3-10, el análisis del genoma mostró la existencia de diversas descarboxilasas de aminoácidos, así como descarboxilasas dependientes de piridoxal fosfato con una elevada homología a descarboxilasas de tirosina conocidas. Además, los motivos homólogos fueron similares a los motivos necesarios para la actividad de otras tirosin-descarboxilasas (Marcobal et al., 2012), reforzando la propuesta de la producción de tiramina por parte de la cepa M3-10. Por su parte, la producción de la molécula *N*-acetiltiramina se ha descrito en una cepa endofítica de *Streptomyces* (Zhao et al., 2006) y, más recientemente, en el actinomiceto *Actinokineospora* sp. (Heidari y Mohammadipanah, 2018). Esta molécula presenta otras actividades biológicas distintas a la inhibición de QS, como por ejemplo la limpieza de radicales (Heidari y Mohammadipanah, 2018), antiagregación plaquetaria (Lee et al., 2017) y también actividad antifúngica (Garcez et al., 2000).

Si bien algunas cepas de *V. alginolyticus* pueden ser consideradas patógenas tanto de animales acuáticos como de humanos (Baker-Austin et al., 2018; Hernández-Robles et al., 2016), esta especie está reconocida como una bacteria simbiote típica de corales sanos (Song et al., 2018) y, además, está presente de manera frecuente en peces y moluscos sanos (Jakšić et al., 2002). Además, esta bacteria se ha utilizado en clínica por su potencial biotecnológico gracias a la producción de colagenasa (Bassetto et al., 2016). Con respecto al potencial inhibidor de QS de *V. alginolyticus*, existe muy poca información. En un estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores se demostró que la molécula DKP ciclo(Leu-Pro) producida por una cepa de *V. alginolyticus*, que además había sido aislada de anémonas, era capaz de inhibir el

biofouling en mejillones (Wang et al., 2017). Sin embargo, su capacidad de inhibir los sistemas QS no fue comprobada. De manera similar, el fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) producido por una cepa de *V. alginolyticus* demostró su capacidad de inhibir la producción de violaceína en *C. violaceum*, así como los factores de virulencia controlados por QS en *S. marcescens* (Padmavathi et al., 2014). Más recientemente, Song y colaboradores identificaron en una cepa de *V. alginolyticus*, aislada de corales, que la molécula isotiocianato de rodamina tenía actividad QSI (Song et al., 2018).

En este estudio se demuestra por primera vez la actividad QSI de las moléculas tiramina y *N*-acetiltiramina. Todos los ejemplos mencionados anteriormente refuerzan la posibilidad de usar la bacteria marina *V. alginolyticus*, o los compuestos producidos por la misma, como herramientas biotecnológicas. En particular, esta tesis demuestra su potencial uso como productora de compuestos QSI que puedan ser alternativas a los antibióticos.

4.2. Selección y caracterización de bacterias marinas capaces de inhibir los sistemas *quorum sensing* mediante enzimas *quorum quenching*

4.2.1. Resumen/Summary

En este capítulo se ha llevado a cabo la búsqueda de bacterias productoras de enzimas que degradan moléculas AHL a partir de la misma colección de 827 cepas utilizadas en el capítulo anterior. Mediante ensayos de difusión en placa se seleccionaron 21 cepas con actividad *quorum quenching* (QQ), que se identificaron en base a la secuencia del gen ARNr 16S como pertenecientes a las especies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter* sp., *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas sihueiensis*, *Ruegeria atlantica* y *Microbulbifer echini*. Estas cepas mostraron gran actividad QQ frente a un amplio rango de AHLs sintéticas y frente a las producidas por bacterias patógenas. El análisis por cromatografía HPLC y espectrometría de masas confirmó que el mecanismo enzimático no era de tipo lactonasa en ninguna de ellas. Entre estas cepas destacó *Psychrobacter* sp. M9-54-1 por tener actividad QQ a bajas temperaturas, y se purificó su enzima de tipo acilasa, denominada AhaP. La expresión de la misma en el patógeno *P. aeruginosa* PAO1 afectó la expresión de factores de virulencia como la lectina y movilidad tipo *swarming*. Por su parte, las cepas *S. maltophilia* M9-54-2, *M. echini* M3-111 y *R. aquimaris* M3-127 resultaron ser las más efectivas para reducir la maceración en patatas y la mortalidad en artemias causadas por los patógenos *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T y *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193. Las bacterias productoras de enzimas *quorum quenching* seleccionadas en este capítulo han mostrado un gran potencial para utilizarse como agentes de biocontrol en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas.

In this chapter, the presence of AHL-degrading bacteria among 827 strains previously isolated from the microbiota of anemones and holothurians as well as from the aquaculture tanks sediment is explored. The selected 21 quorum quenching-strains by using a well diffusion agar-plate assay, were identified based on their 16S rRNA as strains belonging to the species *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter* sp., *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas sihueiensis*, *Ruegeria atlantica* or *Microbulbifer echini*. These strains showed a high QQ activity against a wide range of AHLs, both synthetics and produced by natural pathogenic. High-performance liquid chromatography-mass-spectrometry confirmed that the QQ enzymes were not lactonases. The strain *Psychrobacter* sp. M9-54-1 was selected on the basis of its ability to degrade AHLs at low temperatures and its QQ enzyme AhaP was purified. Furthermore, its expression in the pathogen *P. aeruginosa* PAO1 affected the expression of virulence factors such as lectin production or swarming motility. The strains *S. maltophilia* M9-54-2, *M. echini* M3-111 and *R. aquimaris* M3-127 were reported to reduce potato tuber maceration and brine shrimp (*Artemia salina*) mortality caused by *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T and *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193, respectively. The AHL-degrading strains selected in this chapter could be used as biocontrol agents in the treatment or prevention of infectious diseases.

4.2.2. Selección de cepas con actividad *quorum quenching*

a) Screening de la actividad *quorum quenching*

En primer lugar, se realizó un screening de la actividad QQ a las 827 cepas previamente aisladas de la microbiota de invertebrados marinos y sedimentos de tanques de cultivo estudiadas en esta tesis doctoral (tabla 5). Para ello, se determinó la capacidad de degradar C10-HSL en placas microtiter utilizando el biosensor *C. violaceum* VIR07, el cual produce color violeta en respuesta a esta AHL. Este screening se hizo por duplicado y se obtuvieron un total de 157 cepas cuyos cultivos no activaron el biosensor, por lo que, en principio, podrían ser capaces de romper esta molécula AHL (tabla 20).

Tabla 20. Cepas seleccionadas en el primer screening de actividad QQ.

Origen de la muestra	Número de cepas positivas
M1- <i>Anemonia sulcata</i> (tentáculos)	33
M2- <i>Anemonia sulcata</i> (intestino)	30
M3- <i>Holothuria tubulosa</i> (intestino)	14
M4- <i>Holothuria tubulosa</i> (Líquido celómico)	18
M5- <i>Holothuria forskali</i> (intestino)	4
M6- <i>Holothuria forskali</i> (líquido celómico)	13
M7- <i>Actinia equina</i> (tentáculos)	4
M8- <i>Actinia equina</i> (intestino)	2
M9- <i>Holothuria</i> spp. (heces)	28
M10-Sedimento del tanque	11

A continuación, a las 157 bacterias seleccionadas en el primer screening se les determinó nuevamente la capacidad de degradar AHLs mediante un ensayo de difusión en placa con el fin de confirmar dicha actividad. En este segundo screening se utilizaron AHLs de media y larga cadena en su ácido graso, C6-HSL y C10-HSL, utilizando como biosensores para la detección de las AHLs remanentes *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, respectivamente. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se obtuvieron en todos los casos los mismos resultados. Concretamente, 49 cepas fueron capaces de degradar parcial o totalmente tanto a C6-HSL como a C10-HSL y de ellas, se seleccionaron 21 cepas por mostrar mayor actividad QQ. Las 21 cepas fueron identificadas taxonómicamente en base a la secuencia parcial del gen ARNr 16S (alrededor de 650 pares de bases) y posterior comparación con la base de datos de EzBioCloud. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Identificación taxonómica de las 21 cepas seleccionadas por su elevada actividad QQ.

Cepa	Identificación	Identidad (%)
M1-14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,91
M1-20	<i>Acinetobacter junii</i>	99,26
M1-32	<i>Acinetobacter junii</i>	99,16
M1-47	<i>Acinetobacter junii</i>	99,11
M1-56	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99,57
M1-66	<i>Acinetobacter junii</i>	99,27
M1-71	<i>Vibrio atlanticus</i>	99,47
M2-6	<i>Acinetobacter junii</i>	99,27
M2-33	<i>Acinetobacter junii</i>	99,28
M2-35	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99,61
M2-40	<i>Acinetobacter junii</i>	99,29
M2-50	<i>Acinetobacter junii</i>	99,22
M2-62	<i>Acinetobacter junii</i>	98,95
M3-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
M3-13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
M3-98	<i>Ruegeria atlantica</i>	99,46
M3-111	<i>Microbulbifer echini</i>	99,58
M3-127	<i>Rheinheimera aquimaris</i>	100
M4-84	<i>Pseudomonas sihueiensis</i>	98,66
M9-54-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100
M9-54-1	<i>Psychrobacter faecalis</i> / <i>P. pulmonis</i>	99,21 / 99,06

b) Análisis de la actividad QQ frente a distintas AHLs

La actividad QQ de 19 de las 21 cepas seleccionadas se analizó mediante un ensayo de difusión en placa utilizando un amplio rango de AHLs sintéticas de longitudes variables en la cadena lateral de ácido graso y sustituciones en el tercer carbono de las mismas. Las 2 cepas pertenecientes al género *Vibrio* (M1-56 y M1-71) se descartaron para su estudio debido a que pertenecen a un género potencialmente patógeno en acuicultura. En este ensayo se utilizaron los biosensores *C. violaceum* CV026 para detectar C4-HSL y C6-HSL; *C. violaceum* VIR07 para detectar C10-HSL y sus derivados; y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) para detectar la presencia de AHLs de cadena lateral de 8 y 12 átomos de carbono. En presencia de AHLs exógenas, los biosensores derivados de *C. violaceum* desarrollan color violeta, mientras que *A. tumefaciens* NTL4 origina color azul. Un ejemplo de los ensayos realizados con las distintas cepas biosensoras se muestra en la figura 22; mientras que todos los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22. En general, la actividad QQ de las cepas seleccionadas fue mayor frente a las AHLs de cadena larga, incluyendo tanto aquellas que no presentaban sustituciones como aquellas con sustituciones de tipo hidroxilo y oxo en su estructura (tabla 22). Si bien la actividad frente a AHLs de cadena

lateral de tamaño medio fue más baja, las cepas mostraron una elevada actividad QQ frente a C4-HSL, como se muestra en la tabla 22.

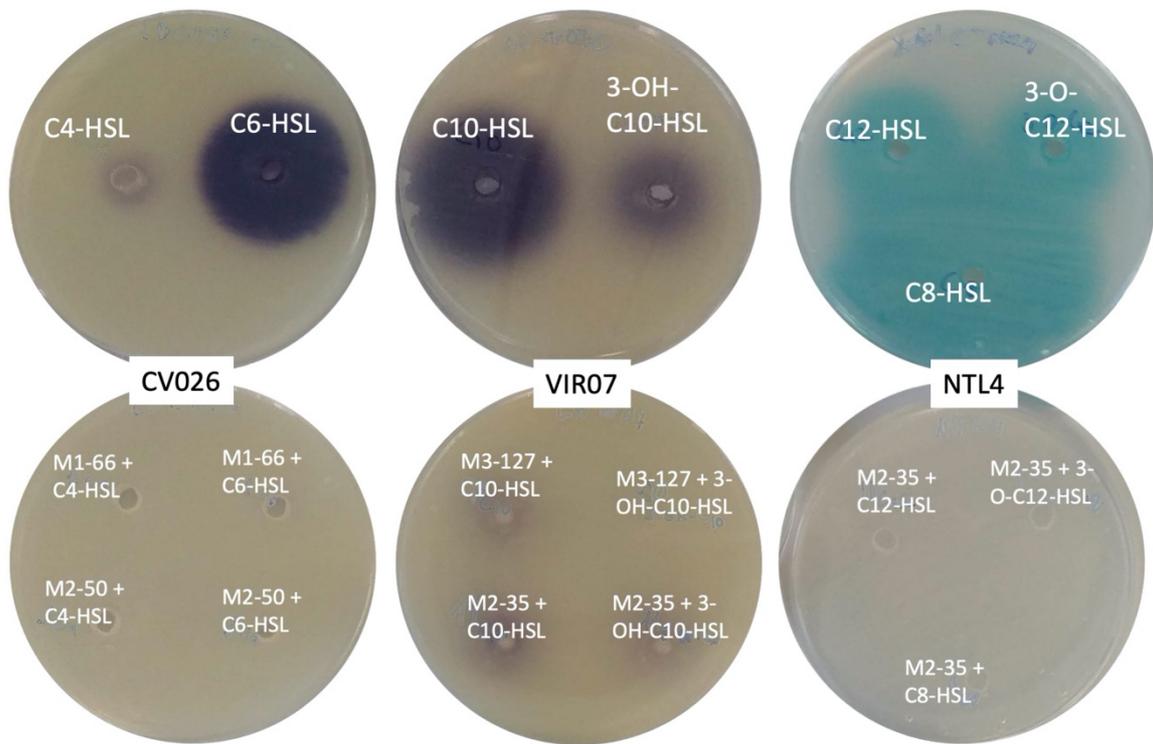
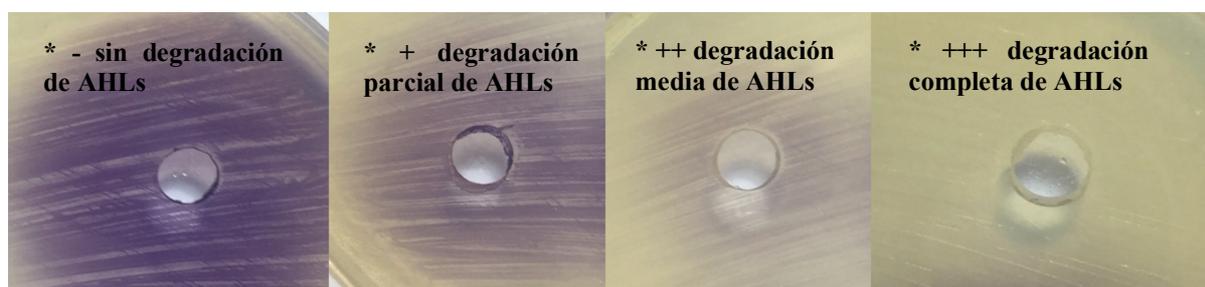


Figura 22. Ejemplo de los resultados obtenidos en el ensayo QQ de difusión en placa con las cepas seleccionadas. Se han utilizado los biosensores *C. violaceum* CV026 en el caso de C4 y C6-HSL, *C. violaceum* VIR07 para C10 e OH-C10-HSL y *A. tumefaciens* NTL4 para C8-HSL, C12-HSL y O-C12-HSL.

Tabla 22. Actividad QQ de las 19 cepas seleccionadas frente a distintas AHLs comerciales.

Cepa	C4-HSL	C6-HSL	C8-HSL	C10-HSL	3-OH-C10-HSL	C12-HSL	3-O-C12-HSL
<i>A. junii</i> M1-47	++	++	-	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M1-66	++	++	++	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M2-33	++	++	++	++	++	++	++
<i>A. junii</i> M2-40	++	++	++	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M2-50	++	++	-	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M2-6	++	++	+	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M2-62	++	++	+	-	++	++	++
<i>A. junii</i> M1-20	++	++	-	+	++	++	++
<i>A. junii</i> M1-32	++	++	-	+	++	++	++
<i>M. echini</i> M3-111	++	-	-	++	++	++	++
<i>P. pachastrellae</i> M2-35	++	+	++	++	++	++	++
<i>P. sihuensis</i> M4-84	++	++	++	+	++	++	++
<i>Psychrobacter</i> sp. M9-54-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>R. aquimaris</i> M3-127	++	++	++	++	++	++	++
<i>R. atlantica</i> M3-98	++	++	-	+	++	++	++
<i>S. maltophilia</i> M3-1	++	++	+	+++	++	++	++
<i>S. maltophilia</i> M3-13	+++	++	+	+	++	++	++
<i>S. maltophilia</i> M9-54-2	+++	++	++	+++	++	++	++
<i>S. maltophilia</i> M1-14	+++	++	+	+++	++	++	++



*Ejemplo de la detección de AHLs con el biosensor *C. violaceum* CV026 para la interpretación de los datos de la tabla.

A la vista de estos resultados, y para continuar con el trabajo se decidió seleccionar aquellas cepas que mostraron gran actividad QQ o bien que fueran representantes de las especies encontradas. Las cepas M1-14, M3-1, M3-13 y M9-54-2 pertenecientes a la especie *Stenotrophomonas maltophilia*, se agruparon para su caracterización. La cepa M9-54-1, perteneciente a la especie *Psychrobacter faecalis*, también se estudió por separado por su gran actividad QQ. Al haber un gran número de cepas pertenecientes a la especie *Acinetobacter junii*, se seleccionaron las cepas M1-66, M2-40 y M2-33 que mostraron la mayor capacidad de degradación de AHLs. Las cepas *Microbulbifer echini* M3-111, *Rheinheimera aquimaris* M3-127, *Pseudomonas pachastrellae* M2-35, *Ruegeria atlantica* M3-98 y *Pseudomonas sihuensis* M4-84 también fueron seleccionadas para continuar el estudio, ya que, aunque no todas habían conseguido degradar todas las AHLs sintéticas,

representaban a diferentes especies encontradas en la microbiota de los invertebrados marinos.

4.2.3. Caracterización de las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* con actividad quorum quenching

Tal y como se describe en el apartado anterior, el grupo de las 4 cepas M1-14, M3-1, M3-13 y M9-54-2, pertenecientes todas ellas a la especie *S. maltophilia*, se seleccionaron para su estudio por su gran actividad QQ. Todas ellas degradaron en su totalidad las AHLs de larga cadena hidrocarbonada, y tenían elevada actividad frente a C4-HSL. Su capacidad de degradación de C8-HSL era más limitada. Todas excepto la cepa M3-13 eran capaces de degradar por completo a C10-HSL en las condiciones ensayadas.

a) Identificación y localización de la enzima QQ de las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*

En primer lugar, se analizó el tipo de actividad enzimática en las 4 cepas pertenecientes a la especie *S. maltophilia*. Para ello, se realizó un ensayo de acidificación que nos permitiera discernir si la enzima era de tipo lactonasa o bien pertenecía a otro tipo de enzima QQ. Tras incubar los cultivos de las cepas con C10-HSL durante 24h, éstos se acidificaron hasta pH 2. Si la enzima fuera de tipo lactonasa, el anillo tipo lactona debería recuperarse a pH ácido, ya que la reacción es reversible en esas condiciones. Sin embargo, en ningún caso se recuperó la concentración de AHL en medio ácido cuando se comparó con el control (CM con C10-HSL incubado en las mismas condiciones de pH 2), lo que indicaba que la enzima de las cepas de *S. maltophilia* no era de tipo lactonasa.

Por otra parte, y dado que las 4 cepas mostraban un comportamiento similar, se determinó la localización de la enzima QQ de una de las cepas de *S. maltophilia*, la cepa M9-54-2. Para ello, se realizó un ensayo QQ de difusión en placa utilizando el sobrenadante y el extracto celular crudo (ECC) de un cultivo de M9-54-2 en presencia de la molécula C10-HSL. Los resultados mostraron que la actividad estaba en el ECC y no en el sobrenadante, lo que indicaba una localización intracelular de la actividad QQ, tal y como se muestra en la figura 23.

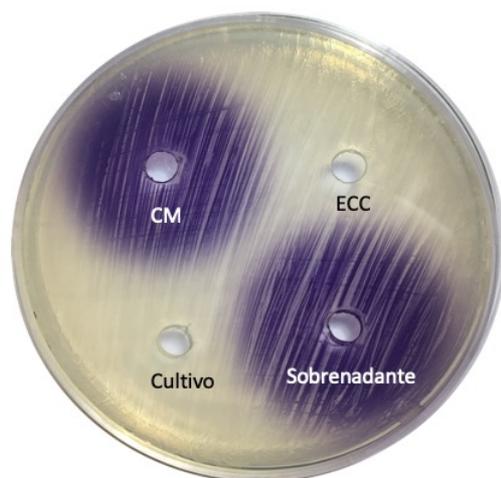


Figura 23. Determinación de la localización de la enzima QQ de M9-54-2 mediante ensayo de difusión en placa con C10-HSL. Se utilizó el bioindicador *C. violaceum* VIR07. CM = control con caldo marino, ECC = extracto celular crudo.

b) Identificación del gen QQ de las cepas de *S. maltophilia*

Una vez que se había demostrado que la actividad QQ de las cepas de *S. maltophilia* no era debida a una lactonasa, se realizó una búsqueda de genes QQ en el genoma ya secuenciado y depositado en bases de datos de una cepa de *S. maltophilia*.

Así, el genoma la cepa *S. maltophilia* JV3 que estaba secuenciado y disponible en la base de datos del NCBI fue utilizado para buscar los genes relacionados con la degradación de AHLs. Mediante el uso de la base de datos UNIPROT, se encontró la proteína G0K3Y4_STEMA, que estaba anotada como acilasa de *N*-acilhomoserín-lactonas en dicha base de datos, pero anotada como una proteína de la familia de las acilasas de penicilinas en la base de datos del NCBI con el número de acceso WP_014036524.1.

A partir de esta información, se diseñó un par de *primers* específicos basados en la secuencia de nucleótidos que codificaba la proteína mencionada anteriormente. Los fragmentos de ADN, con una longitud esperada de unos 2300 nucleótidos, se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de las cepas M3-1, M1-14, M3-13 y M9-54-2 (figura 24A). Posteriormente, los productos de PCR se purificaron, se clonaron en el vector pGEM-T y por último se transformaron en *E. coli* DH5 α . La capacidad degradadora de AHLs de las construcciones plasmídicas se confirmó mediante un ensayo de difusión en placa utilizando de nuevo todas las AHLs sintéticas anteriormente citadas (figura 24B). En los cuatro casos la degradación de las AHLs fue visible, mientras que no se produjo ningún tipo de degradación cuando se ensayó *E. coli* expresando el plásmido vacío. Los genes clonados se denominaron *m3-1*, *m1-14*, *m3-13* y *m9-54-2*, respectivamente.

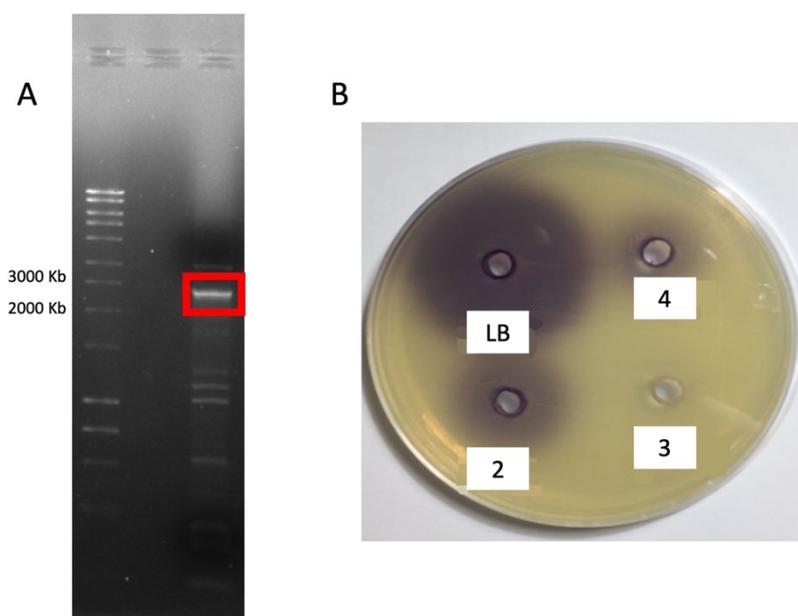


Figura 24. Amplificación mediante PCR del gen acilasa de la cepa M9-54-2 (A). Comprobación de la actividad QQ de los clones de *E. coli* que expresaban el gen acilasa de las cepas M3-1 (2), M3-13 (2) y M9-54-1 (3) (B).

Una vez confirmada la actividad degradadora de AHLs en las cuatro construcciones plasmídicas, éstas se secuenciaron y analizaron mediante el programa BLASTx, que permite comparar las secuencias de aminoácidos correspondientes con otras proteínas QQ depositadas en la base de datos del NCBI. La secuencia de aminoácidos correspondiente a los genes *m3-1*, *m1-14*, *m3-13* y *m9-54-2* mostró una homología de entre el 27 y 28% con la acilasa PvdQ de *P. aeruginosa* (NP_251075.1) y una homología de entre el 40 y 41% con la acilasa de AHLs QuiP (NP_249723.1) de *P. aeruginosa*. Para analizar la homología con otras acilasas conocidas, se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo neighbor-joining y en él se incluyeron acilasas y lactonasas ya descritas. Como se esperaba, las proteínas QQ de las 4 cepas de *S. maltophilia* se agruparon en un mismo cluster junto con QuiP y las otras acilasas (figura 25A). También, se confirmó la presencia de los dominios conservados de la acilasa QuiP en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de las cuatro cepas de *S. maltophilia*. Así, entre diversos otros dominios conservados, se encontraron los dominios típicos de enzimas QQ de tipo acilasa, como los dominios “penicil-amidasa”, “PvdQ” y “Superfamilia de Ntn-hidrolasas”, todos ellos también presentes en las acilasas con las que compartían homología QuiP y PvdQ.

Por último, y puesto que las secuencias de aminoácidos de las proteínas de las 4 cepas de *S. maltophilia* eran muy similares, se seleccionó la cepa M9-54-2 para inferir su estructura tridimensional utilizando el programa Phyre2. Esta estructura se comparó con la propuesta para PvdQ y QuiP de *P. aeruginosa*, resultando altamente similar tal y como se muestra en la figura 25B.

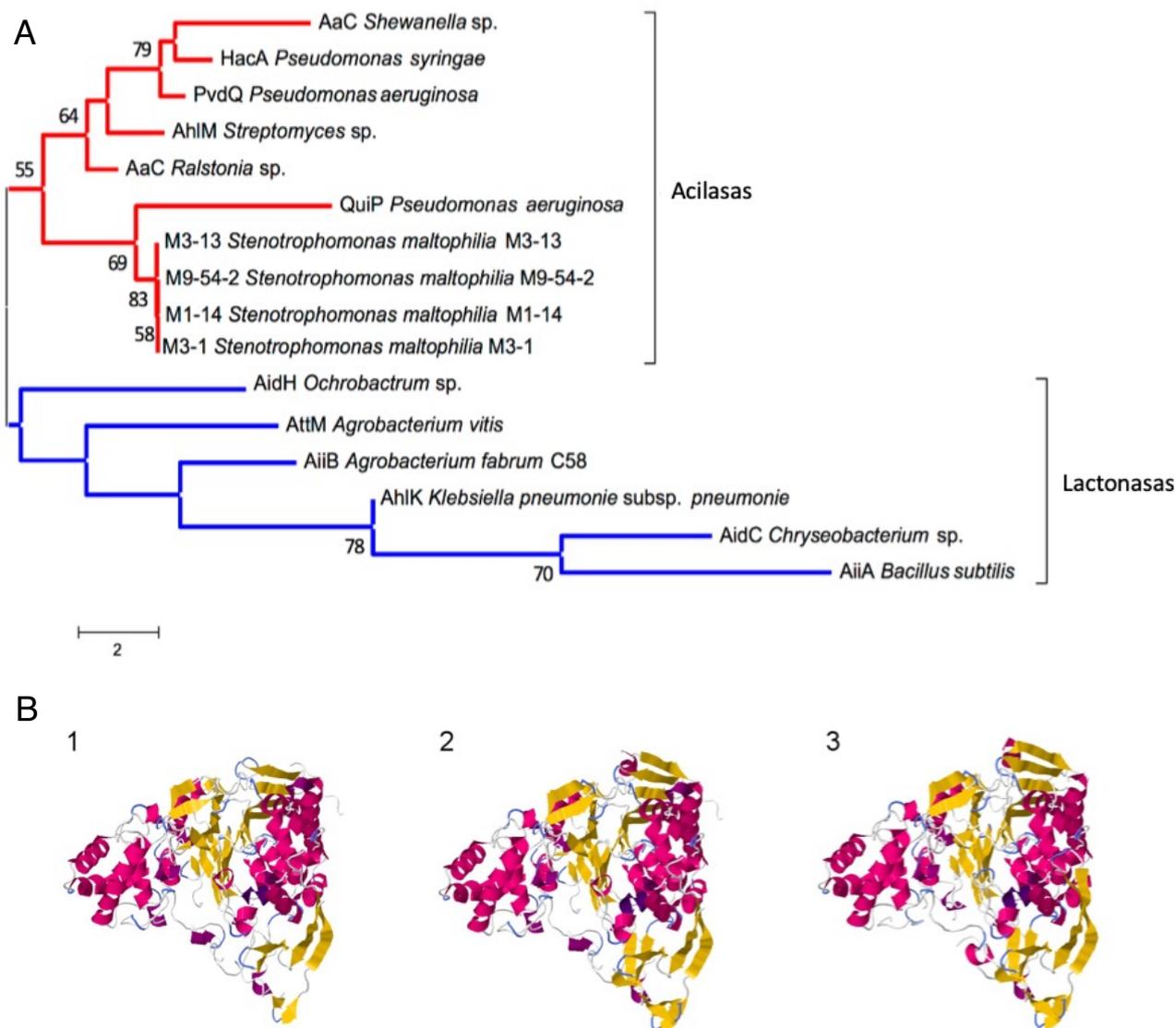


Figura 25. Análisis filogenético de las enzimas degradadoras de AHLs detectadas en las cepas de *S. maltophilia* basado en las secuencias de aminoácidos usando el algoritmo neighbour-joining (A). Estructura propuesta de la acilasa de M9-54-2 de *S. maltophilia*, QuiP de *P. aeruginosa* y PvdQ de *P. aeruginosa* utilizando el programa Phyre2 (B).

Todos los resultados anteriores hacían prever que la enzima QQ responsable de la actividad de las cepas seleccionadas de *S. maltophilia* era de tipo acilasa y no de tipo lactonasa. La última confirmación al respecto se llevó a cabo mediante el análisis de los productos de la reacción por HPLC. Para ello, se partió de un cultivo de 24h del clon de *E. coli* que expresaba el gen *m9-54-2* al que se le añadió la molécula C10-HSL. Se realizó un ensayo a pH 7 y otro a pH 2 tal y como se ha descrito anteriormente para monitorizar la posible recuperación de molécula AHL en condiciones ácidas. Tras la incubación, las AHLs remanentes se analizaron tanto mediante ensayo de difusión en placa como mediante HPLC, mostrando una degradación de AHLs de alrededor del 75% tanto a pH neutro como tras la incubación a pH 2. Este resultado confirmaba por tanto que el mecanismo de acción de la enzima QQ de *S. maltophilia*

M9-54-2 no era de tipo lactonasa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26.

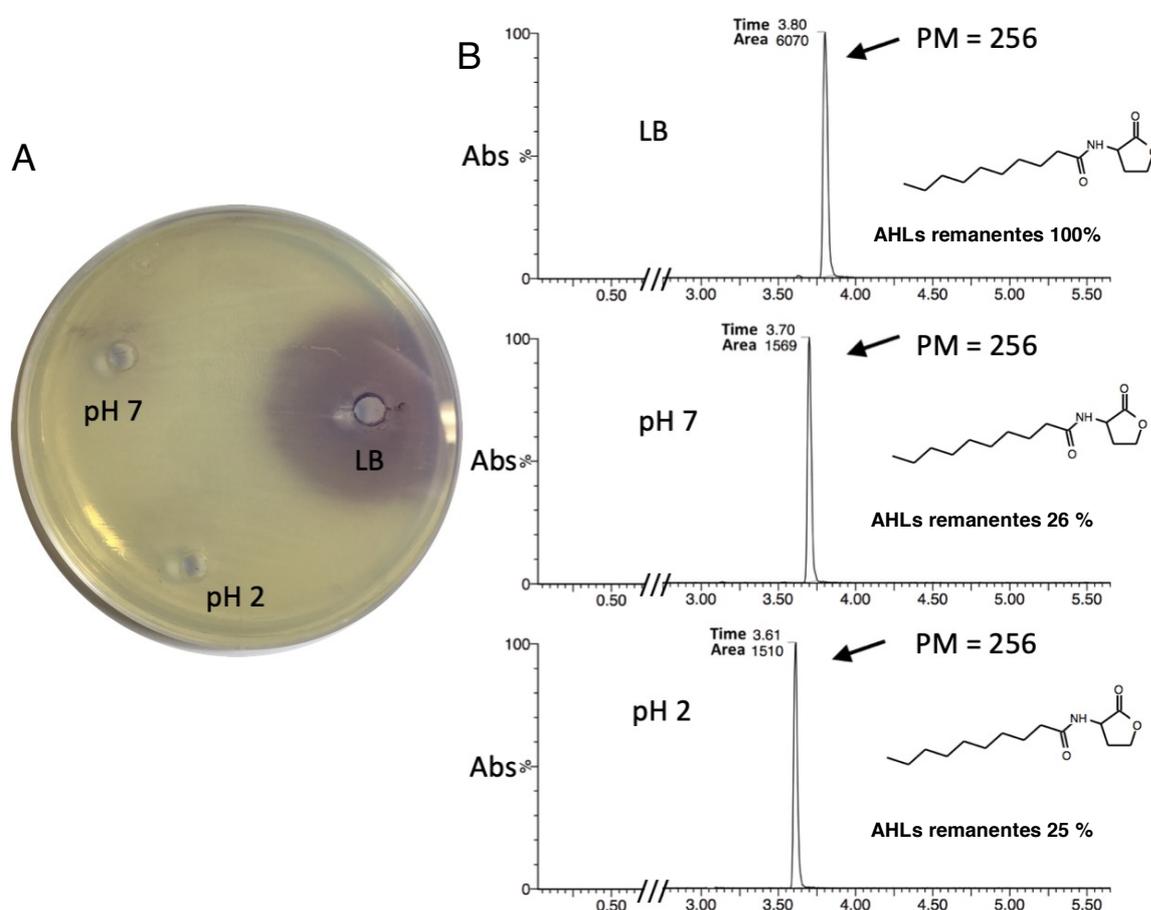


Figura 26. Análisis del tipo de enzima QQ de *E. coli* pGEMT::m9-54-2 a pH 7 y pH 2 frente a C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa (A) y mediante HPLC (B), en el que se expresa el área bajo la curva.

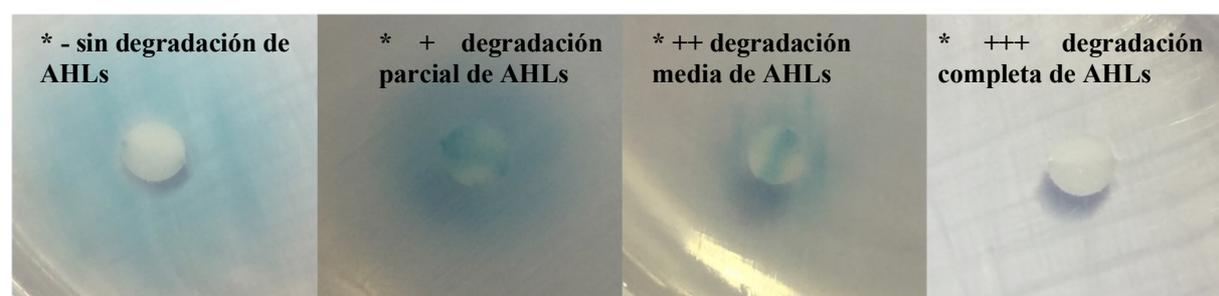
c) Actividad QQ de la cepa M9-54-2 en cocultivos con patógenos de agricultura y acuicultura

El siguiente paso en este estudio fue evaluar si las 4 cepas de *S. maltophilia* con actividad QQ tenían potencial para poder ser usadas *in vivo* y así interrumpir los sistemas QS de bacterias patógenas. Para ello, se comprobó en primer lugar su capacidad para degradar extractos crudos de las AHLs producidas por las cepas patógenas relacionadas con la acuicultura, aisladas e identificadas por un grupo de la Universidad de Alicante (*Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193), así como AHLs sintetizadas por el fitopatógeno causante de la podredumbre blanda en patatas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. Para ello se añadieron los extractos de AHLs de los distintos patógenos a los cultivos de las cepas de *S. maltophilia*, y se incubaron durante 24 h.

Seguidamente, las AHLs de los cultivos se extrajeron con diclorometano y se depositaron en discos de papel Whatman® situados en placas de medio AB-Xgal a las que se les había extendido previamente una sobrecapa del biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Como control, se añadió la misma cantidad de extracto de AHLs al medio CM. Los resultados se muestran en la tabla 23 y se puede observar que la cepa M9-54-2 fue la más activa de las cuatro y producía la degradación total o parcial de las AHLs producidas por los patógenos ensayados.

Tabla 23. Actividad QQ de las cepas de *S. maltophilia* frente a los extractos crudos de AHLs de bacterias patógenas.

Cepa	<i>V. owensii</i> VibC-Oc-106	<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	<i>V. mediterranei</i> VibC-Oc-097	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225 ^T
M3-1	++	+++	+	++
M1-14	++	++	+	++
M3-13	++	++	+	++
M9-54-2	+++	+++	+	++



*Detección de AHLs con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 para la interpretación de los datos de la tabla.

Para continuar el estudio, tal y como se ha explicado anteriormente, se seleccionó la cepa M9-54-2 al ser la más activa además frente a las AHLs producidas por microorganismos patógenos. Antes de realizar los ensayos en cocultivo, se realizó un ensayo de antagonismo para descartar que la cepa M9-54-2 interfiriera en el crecimiento de los patógenos *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. En todos los casos se comprobó que la cepa M9-54-2 no interfería con el crecimiento de los patógenos. Se utilizó como modelo *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 ya que la cepa M9-54-2 era capaz de degradar por completo sus AHLs.

La cepa M9-54-2 se creció en cocultivo junto a *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T en igual proporción (1:100) en cada caso. Tras 24h de incubación, las AHLs remanentes de los cocultivos y de los monocultivos de cada bacteria se determinaron posteriormente mediante un ensayo de difusión en placa utilizando el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). En el cocultivo de M9-54-2 con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 no se detectaron AHLs, mientras que en el cocultivo con *P. carotovorum* se observó una reducción considerable de las mismas, confirmando la actividad QQ de la cepa M9-54-2 en cocultivo (figura 27 y tabla 24). Estos ensayos se repitieron por triplicado y en todos ellos se obtuvieron los mismos resultados.

A continuación, se determinó el efecto de la degradación de las AHLs en la producción de los factores de virulencia y otras características fenotípicas producidos de los dos patógenos ensayados, utilizando para ello cocultivos y monocultivos. Los resultados se recogen en la tabla 24 y muestran que cuando la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 crecía en cocultivo junto con los patógenos indicados era capaz de afectar a diversas características fenotípicas de los mismos. Por ejemplo, en los cocultivos con *V. coralliilyticus* se observó una reducción en la movilidad tipo *swimming* y *swarming* y también una disminución de actividades enzimáticas como amilasa y quitinasa en el patógeno. Con respecto a *P. carotovorum*, se observó una disminución de la movilidad tipo *swimming* y una disminución de la actividad fosfatasa ácida (figura 27 y tabla 24).

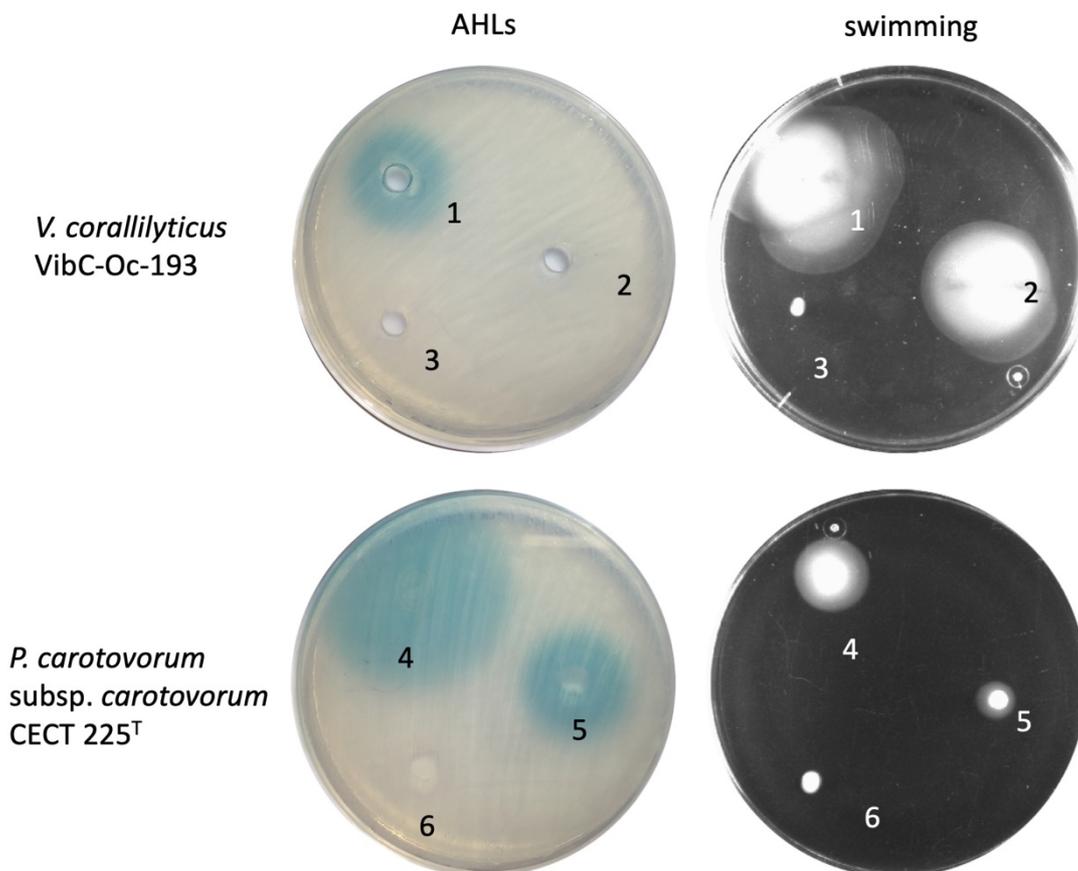


Figura 27. Efectos sobre la producción de AHLs y la movilidad tipo *swimming* de los patógenos *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 con actividad QQ. 1. *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. 2. Cocultivo *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193/*S. maltophilia* M9-54-2. 3. *S. maltophilia* M9-54-2. 4. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. 5. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T/*S. maltophilia* M9-54-2. 6. *S. maltophilia* M9-54-2. El biosensor utilizado para detectar las AHLs fue *A. tumefaciens* NTL4.

Tabla 24. Efecto de la actividad QQ de la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 sobre diferentes características fenotípicas de *P. carotovorum* CECT 225^T y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 en cocultivo.

Fenotipo	<i>S. maltophilia</i> M9-54-2	<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	<i>S. maltophilia</i> M9-54-2 + <i>V. coralliilyticus</i> VibC- Oc-193	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225 ^T
AHLs	-	++	-	++
<i>Swimming</i>	-	++	+	+
<i>Swarming</i>	-	++	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+
Fosfatasa ácida	-	-	-	+
Fosfatasa alcalina	+	++	++	+
Lipasa (Tween 20)	++	++	++	++
Lipasa (Tween 80)	+	+	+	-
Qutinasa	+	++	+	-
Esculina	++	+	++	-
Hemolisina	+	++	+	-
Amilasa	-	++	+	-
DNAsa	++	++	++	++
Caseinasa	++	++	++	++

*“++” alta actividad, “+” baja actividad, “-” no actividad

Las actividades en las que se observa una disminución están señaladas en color rojo

e) Ensayos *in vivo* de la cepa M9-54-2 con patatas y artemias

Una vez demostrada la actividad QQ de la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 y su capacidad no solo de degradar los extractos de AHLs producidos por microorganismos patógenos, sino también de hacerlo en cocultivo y además, interferir en sus fenotipos, se procedió a realizar ensayos *in vivo* utilizando los patógenos *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

Para comprobar la potencial aplicación de la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 como agente de biocontrol en agricultura se llevó a cabo un ensayo de maceración en tubérculos de patatas con la cepa *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. Las rodajas de patata se inocularon bien con los cocultivos de *S. maltophilia* M9-54-2 y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T o bien con monocultivos de las mismas bacterias. Tras 2 días de incubación, las rodajas de patata infectadas con el cocultivo *S. maltophilia* M9-54-2 y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T mostraron una reducción significativa de los síntomas de la infección de la podredumbre blanda (<10% de maceración en la superficie de la patata), mientras que las rodajas de patata infectadas con el monocultivo *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T sufrieron una considerable maceración (~57%). Asimismo, no se observó ninguna maceración cuando los tubérculos de patatas se infectaron con la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 en monocultivo.

Este ensayo se realizó en 9 rodajas de patata por cada condición y se demostraron que las diferencias eran significativas, confirmando así que la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 en cocultivo reduce la virulencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T en rodajas de patata, tal y como se observa en la figura 28.

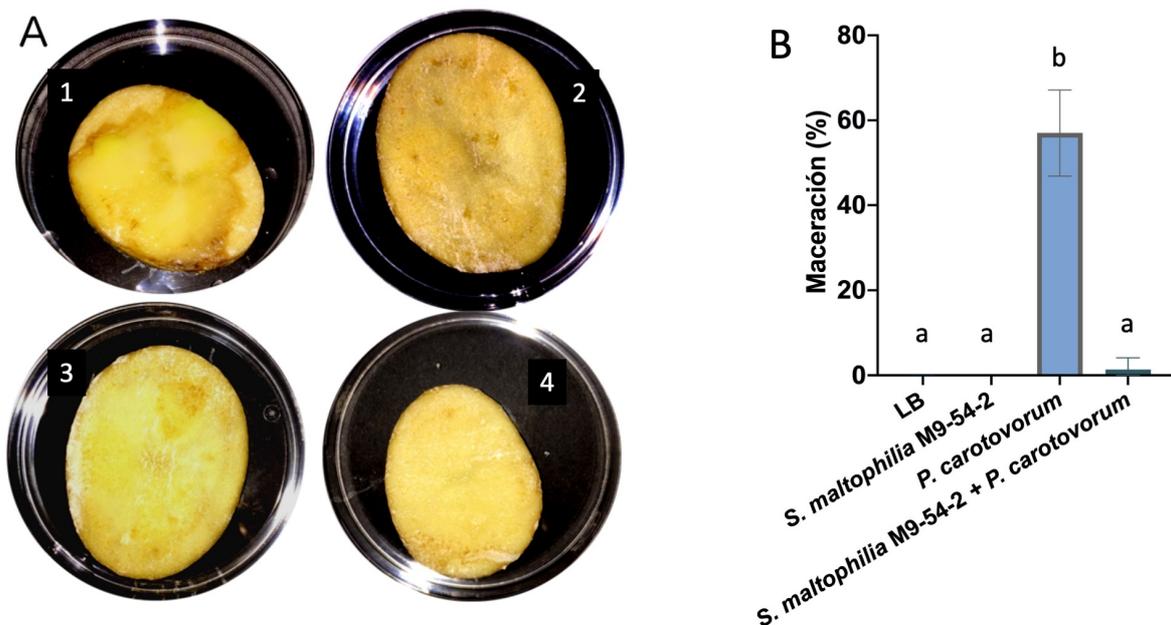


Figura 28. Ensayo en rodajas de patata infectadas con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T en ausencia y presencia de la cepa M9-54-2. A. *P. carotovorum* (1), *S. maltophilia* M9-54-2 (2), cocultivo de *P. carotovorum* y *S. maltophilia* M9-54-2 (3) y medio LB estéril (4) (A). Porcentaje de maceración en cada condición (B). Las barras de error muestran una desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Además, se llevaron a cabo ensayos en *Artemia salina*, un modelo de infección de crustáceo utilizado para comprobar la virulencia de patógenos acuáticos sobre nauplios de esta especie. Tras la eclosión de los quistes de *A. salina*, se depositaron los nauplios en placas petri con SFSW y se inocularon, al igual que se había realizado con las rodajas de patatas, con los cocultivos de *S. maltophilia* M9-54-2 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 o bien con monocultivos de las mismas bacterias.

Los resultados demostraron que la virulencia de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 sobre los nauplios de *A. salina* disminuyó de manera significativa cuando se infectaron las mismas con el cocultivo, tanto a las 48 h como 72 h después de la infección, demostrando de nuevo que la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 fue capaz de atenuar la virulencia de este patógeno, como se observa en la figura 29.

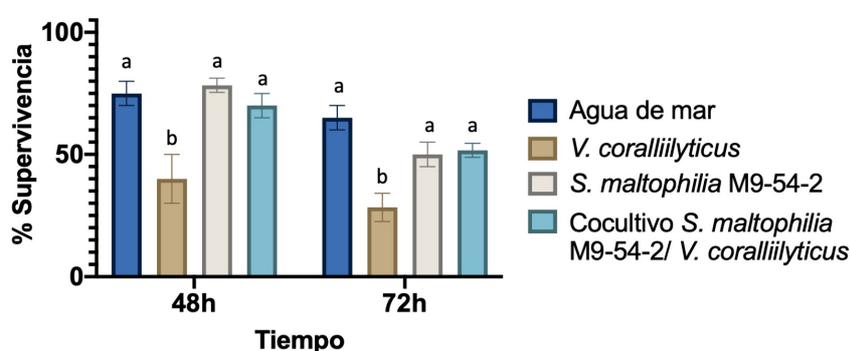


Figura 29. Porcentaje de supervivencia de nauplios de *A. salina* tras 48 y 72h de incubación en cada condición. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos en estos ensayos demostraron por tanto que la cepa *S. maltophilia* M9-54-2, seleccionada por su capacidad QQ, era capaz de disminuir la virulencia *in vivo* del patógeno de agricultura causante de la podredumbre blanda en patatas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T y del patógeno de acuicultura *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

4.2.4. Caracterización de la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 con actividad *quorum quenching*

a) Identificación taxonómica de la cepa M9-54-1, secuenciación y análisis filogenético

La cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 había sido previamente identificada en base a la secuenciación parcial del gen ARNr 16S (650 pares de bases), que mostraba una homología del 99,21% con *Psychrobacter faecalis* y un 99,06% con *P. pulmonis*. Posteriormente se secuenció su genoma y se eliminaron las bases de baja calidad y los adaptadores con el programa BBduk (DOE Joint Genome Institute). Las lecturas se ensamblaron con el programa Spades v3.11.1, y se obtuvo un genoma de 3,2 Mb con 69 contigs y una cobertura de aproximadamente 230X. A partir del genoma secuenciado se determinó el contenido en G+C que fue 43,4 mol% y se obtuvo la secuencia del gen ARNr 16S completo, que mostró un 99,78% de identidad con *Psychrobacter pulmonis* y un 99,66% con *P. faecalis*. A continuación, se obtuvieron los valores de ANIb, ANI, y de hibridación digital con la especie *P. faecalis* SHUES1 (NZ_LXQA00000000.1) que estaba depositada en la base de datos NCBI. Los resultados de hibridación digital mostraron un 60,4% de homología, mientras que el ANIb fue de 94,74% y el ANIm 95,21%. Dado que no hay ningún genoma disponible de la especie *P. pulmonis*, no se pudieron hacer los análisis con esta cepa. Con los resultados obtenidos, la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 podría suponer una nueva especie, dado que los valores de ANI y de hibridación digital están debajo del límite propuesto para delimitar una especie nueva (95-96% y 70%, respectivamente), pero hasta que no se disponga del genoma completo de *P. pulmonis* no se puede llegar a esta conclusión, de ahí que se denomine *Psychrobacter* sp.

b) Espectro de actividad QQ de *Psychrobacter* sp. M9-54-1

La cepa M9-54-1 había sido seleccionada originariamente por su gran capacidad de degradar C6-HSL y C10-HSL. Posteriormente, se comprobó su actividad frente a un amplio rango de AHLs (tabla 22), demostrando que era capaz de degradar todas las AHLs probadas. A continuación, y dado que *Psychrobacter* es un género adaptado al frío, se evaluó su potencial degradador frente al mismo rango de AHLs comerciales a las temperaturas de 4, 15 y 28°C. Los resultados se recogen en la figura 30, y demuestran que esta cepa es capaz de degradar un amplio rango de AHLs a bajas temperaturas. En general, la actividad QQ frente a AHLs de cadena hidrocarbonada media y larga fue muy alta a todas las temperaturas ensayadas.

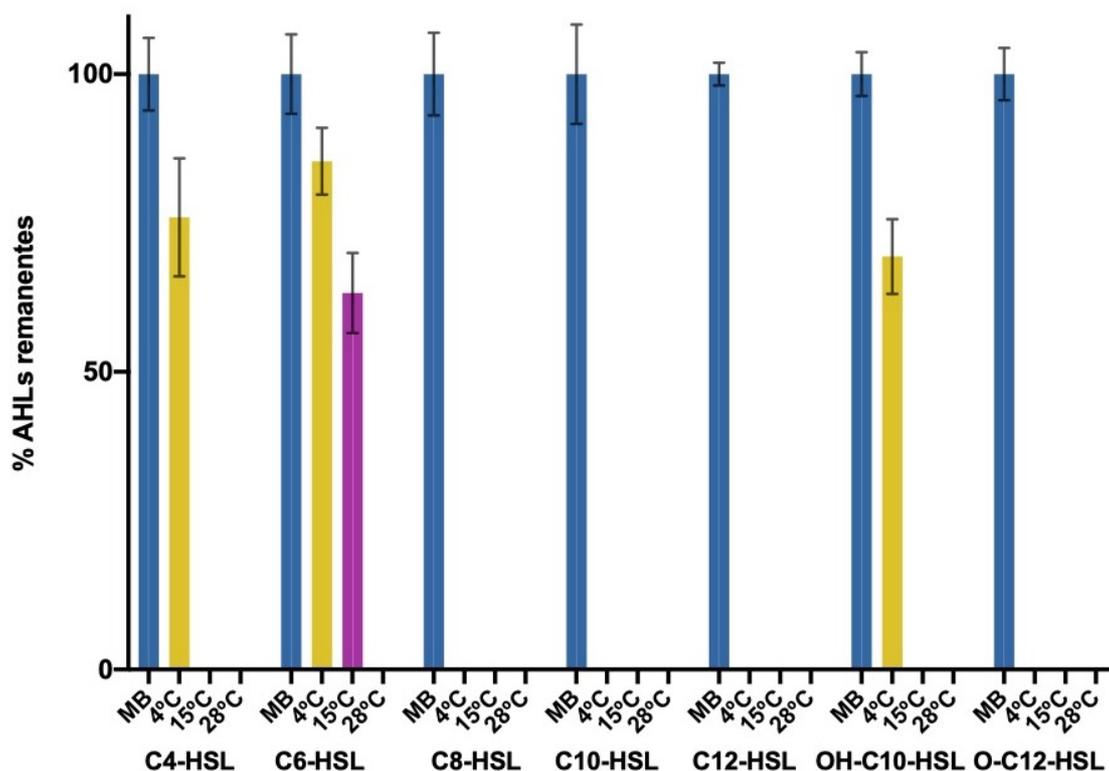


Figura 30. Degradación de AHLs comerciales a distintas temperaturas por parte de la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 (medida en centímetros del halo de activación del biosensor).

c) Identificación y localización de la enzima QQ de la cepa M9-54-1

Para comenzar el estudio de la enzima QQ de *Psychrobacter* sp. M9-54-1 se evaluó si la misma era secretada o no al medio extracelular. Para ello, se determinó la actividad QQ tanto del ECC como del sobrenadante. Tanto el sobrenadante como el ECC se incubaron junto a C10-HSL, y mediante un ensayo de difusión en placa se observó que toda la actividad se encontraba en el ECC, mientras estaba ausente en el sobrenadante (figura 31A). Seguidamente, se analizó el tipo de enzima mediante un ensayo de acidificación similar al explicado en el apartado anterior. Los resultados mostraron que las AHLs no se recuperaron en el medio acidificado, lo que indica que la actividad QQ de *Psychrobacter* M9-54-1 no se debía a una lactonasa.

La actividad QQ de la cepa M9-54-1 y el tipo de degradación de las AHLs se analizó también mediante HPLC-MS. Se cuantificó el porcentaje de degradación de C10-HSL (AHLs remanentes) en los cultivos a pH 7 y tras acidificar el sobrenadante. De nuevo, no se observó una recuperación de las AHLs en la reacción acidificada por lo que la degradación de la misma fue casi completa (figura 31B). Quedaron solo algunos remanentes, probablemente debido a los restos de la columna, que también salieron en los lavados posteriores (datos no mostrados). Estos resultados confirmaron que la actividad QQ de *Psychrobacter* M9-54-1 no era de tipo lactonasa.

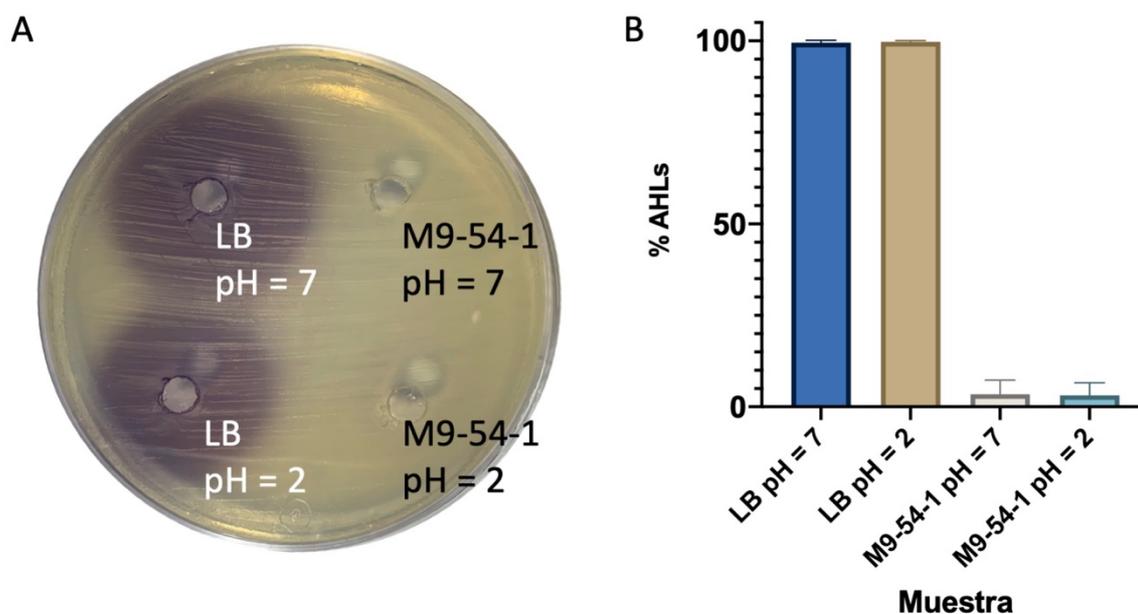


Figura 31. Análisis del tipo de enzima QQ de la cepa M9-54-1 a pH 7 y pH2 frente a C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa revelado con *C. violaceum* VIR07 (A) y mediante HPLC (B), en el que se expresa el área bajo la curva.

d) Caracterización, expresión heteróloga de la enzima AhaP

La búsqueda del gen responsable de la enzima QQ se llevó a cabo mediante la utilización del programa BLASTp, usando las proteínas predichas de *Psychrobacter* sp. M9-54-1, que habían sido previamente anotadas mediante RAST. Estas proteínas se compararon con un grupo de enzimas QQ que están incluidas en la base de datos descrita en el apartado material y métodos para determinar sus homologías. La proteína 2034 y la proteína 322 de la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 mostraron tener un *e-value* menor a $1e-100$ con dos enzimas QQ diferentes, un límite suficientemente alto para asegurarnos de que dicho homólogo podría constituir una enzima QQ. Estos homólogos se presentan en la tabla 25.

Tabla 25. Homólogos a proteínas QQ encontrados en el genoma de *Psychrobacter* sp. M9-54-1.

Homólogos	Identidad (%)	Positivos (%)	e-value
Proteína 2034			
AaC <i>Ralstonia</i> sp. XJ12B (AAO41113.1)	37	54	3e-171
AaC <i>Shewanella</i> sp. MIB015 (BAF94155.1)	32	47	1e-112
AhIM <i>Streptomyces</i> sp. M664 (AAT68473.1)	35	52	1e-131
HacA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a (YP_235052.1)	35	53	4e-152
PvdQ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 NP_251075.1	36	53	1e-162
Proteína 322			
BpiB05 Bacteria no cultivada Bio8 (ABU51109)	40	59	3e-159

A continuación, se comprobó la anotación automática mediante RAST de ambas proteínas. La proteína 2034 había sido anotada automáticamente como “acilhomoserina lactona acilasa PvdQ”, mientras que la proteína 322 había sido anotada como “proteína hipotética”.

Los genes de la cepa M9-54-1 que codificaban las proteínas 2034 y 322 se clonaron y expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el vector de expresión pGEX4T-2. Una vez expresados, se comprobó la actividad QQ de ambas construcciones plasmídicas y solo la correspondiente al gen 2034 demostró su capacidad de degradar las moléculas AHLs (figura 32), de ahí que el gen 322 fuera descartado. La proteína codificada por el gen 2034 fue por tanto seleccionada para su posterior purificación, y se le denominó AhaP (acil-homoserine lactone acylase de *Psychrobacter* sp.).

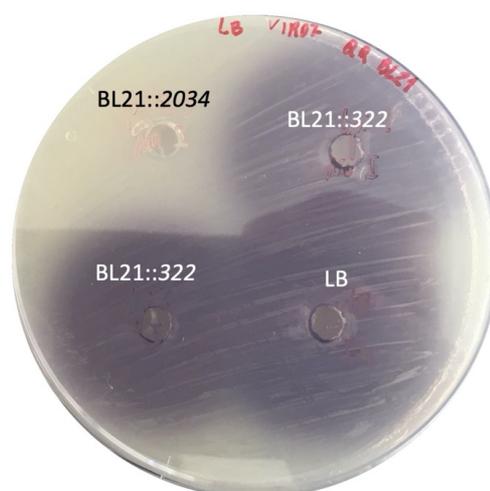


Figura 32. Detección de la actividad QQ de las proteínas 2034 y 322 expresadas en *E. coli* BL21 (DE3).

El gen que codifica la proteína AhaP tenía una longitud de 2460 bp. La secuencia de aminoácidos predicha fue alineada con la secuencia de aminoácidos de distintas enzimas QQ de tipo acilasa con función demostrada y a partir de éstas se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo neighbour-joining (figura 33A). En el árbol se observa que la enzima AhaP de *Psychrobacter* sp. M9-54-1 se agrupa en el mismo clado que otras acilasas mostrando su alta homología. De hecho, AhaP compartía con respecto a PvdQ de *P. aeruginosa* PAO1 (NP_251075.1) un 36% de aminoácidos, de los cuales un 53% eran considerados como positivos. Además, la estructura propuesta de la proteína AhaP utilizando el programa Phyre2 muestra gran homología con la acilasa PvdQ de *P. aeruginosa* PAO1, tal y como cabía esperar (figura 33B).

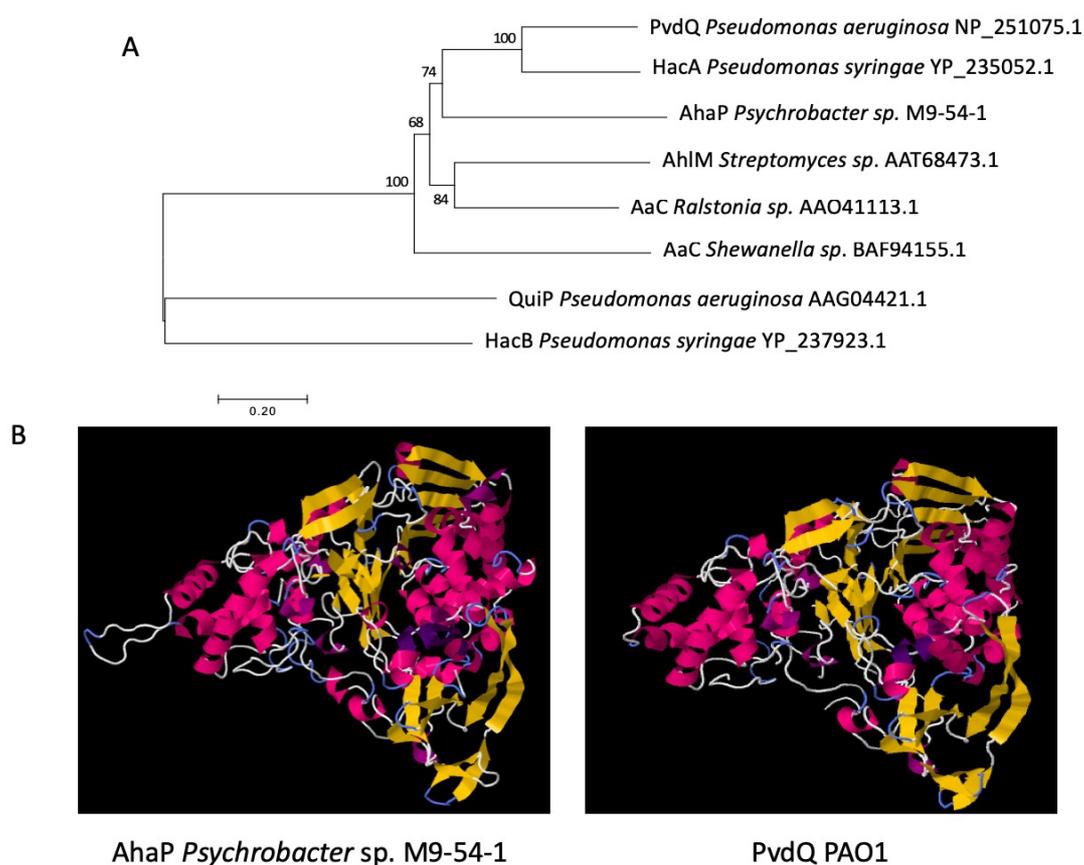


Figura 33. Árbol filogenético de la acilasa de *Psychrobacter* sp. M9-54-1 comparada con otras acilasas (A). Estructura propuesta de la acilasa AhaP de *Psychrobacter* sp. M9-54-1 comparada con la de PvdQ de *P. aeruginosa* PAO1 (B).

e) Purificación de la proteína AhaP

El gen que codifica la proteína AhaP había demostrado ser activo en el vector de expresión pGEX4T-2. Sin embargo, para aumentar la expresión de la proteína, se clonó el gen en el vector pET24-b(+), que aporta una cola de histidinas, y se expresó en células de *E. coli* NiCo, especialmente diseñada para la purificación de proteínas con colas de histidina. La integridad de la proteína purificada fue comprobada mediante un gel SDS-PAGE, y fue almacenada a -20°C hasta su uso. La proteína purificada se utilizó en un ensayo de QQ frente a AHLs desde 4 a 14 átomos de

carbono en su cadena lateral, con y sin sustituciones de tipo oxo e hidroxilo en el tercer carbono. Para la detección de las AHLs remanentes se utilizaron los biosensores *E. coli* JM109 (pSB536), *E. coli* JM109 (pSB401) y *E. coli* JM109 (pSB1142), capaces de producir luminiscencia en respuesta a diferentes AHLs. Concretamente, *E. coli* JM109 (pSB536) responde a C4-HSL y sus derivados, *E. coli* JM109 (pSB401) responde a C6-HSL, C8-HSL y C10-HSL y sus derivados, mientras que *E. coli* JM109 (pSB1142) se activa en presencia de C12-HSL, C14-HSL y sus derivados. La enzima purificada demostró su capacidad degradadora frente a todas las AHLs excepto O-C4-HSL, OH-C4-HSL and C14-HSL (figura 34).

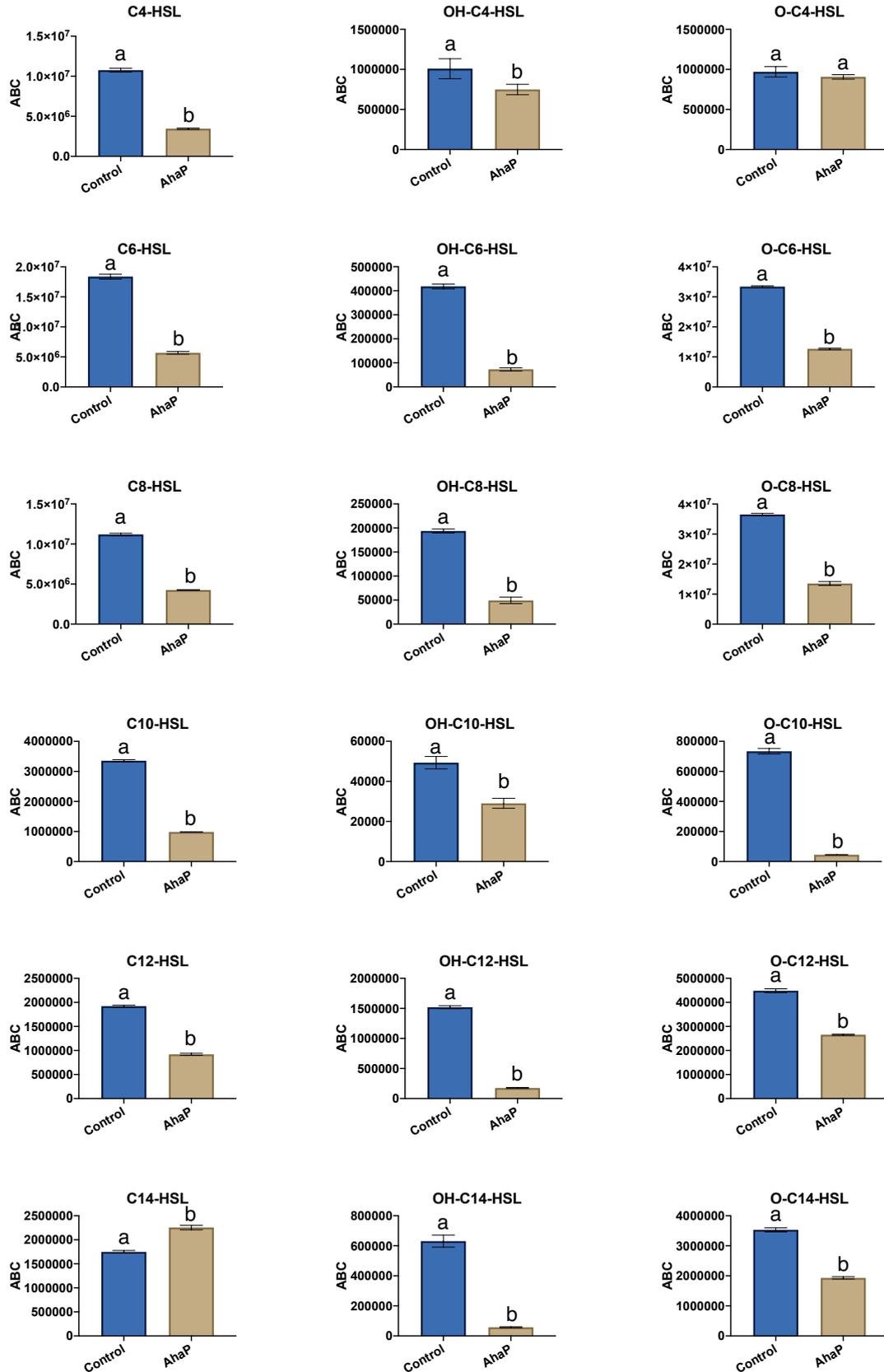
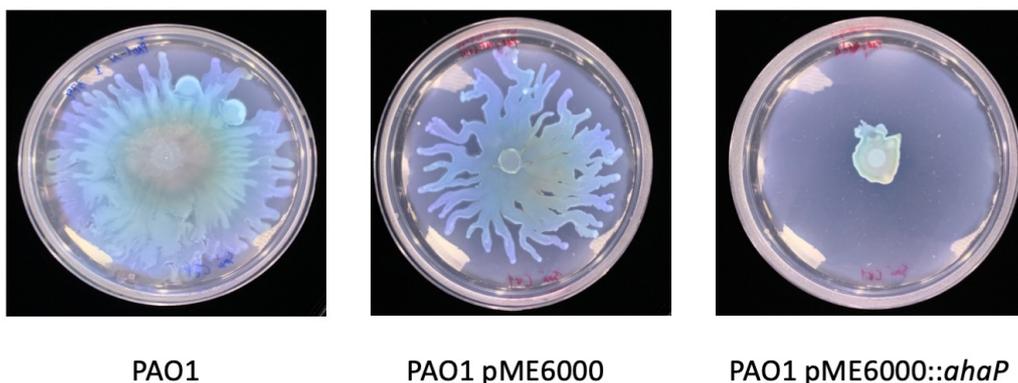


Figura 34. Actividad QQ de la acilasa AhaP expresada en pGEX4T-2 frente a distintas AHLs. El ensayo fue revelado con los biosensores *E. coli* JM109 (pSB536) para C4-HSL y los derivados, *E. coli* JM109 (pSB401) para C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL y sus derivados y *E. coli* JM109 (pSB1142) para C12-HSL y C14-HSL y sus derivados. Se representa el área bajo la curva (ABC).

f) Expresión de *ahaP* en *P. aeruginosa* PAO1

Una vez demostrada la actividad QQ de la enzima AhaP sobre un amplio rango de AHLs, el siguiente paso en este estudio fue determinar si tenía efecto en la expresión de los genes de virulencia de las bacterias patógenas. Para ello, el gen *ahaP* se clonó en el plásmido de amplio rango de hospedadores pME6000 y se expresó en el patógeno *P. aeruginosa* PAO1. Seguidamente, se llevó a cabo un ensayo de la movilidad tipo *swarming* para comparar la bacteria salvaje y las bacterias que contenían el plásmido vacío y con el gen *ahaP*. Tal y como se observa en la figura 35A, la expresión de *ahaP* reduce de manera muy significativa la movilidad de este patógeno. Del mismo modo, se transfirió la construcción pME6000:*ahaP* y el plásmido vacío al biosensor PAO1 *lecA::lux*. Este biosensor contiene una fusión del gen *lecA* (que controla la producción de lectinas) y el operón *luxCDABE*, de tal manera que, al expresarse *lecA*, aumenta la producción de luminiscencia. La expresión de *ahaP* en *P. aeruginosa* PAO1 redujo de manera muy significativa la luminiscencia del biosensor, especialmente cuando se incubó en presencia de C4 y C6-HSL exógenas, ya que previamente se había demostrado que la expresión de este gen aumenta en presencia de dichas AHLs (figura 35B).

A



B

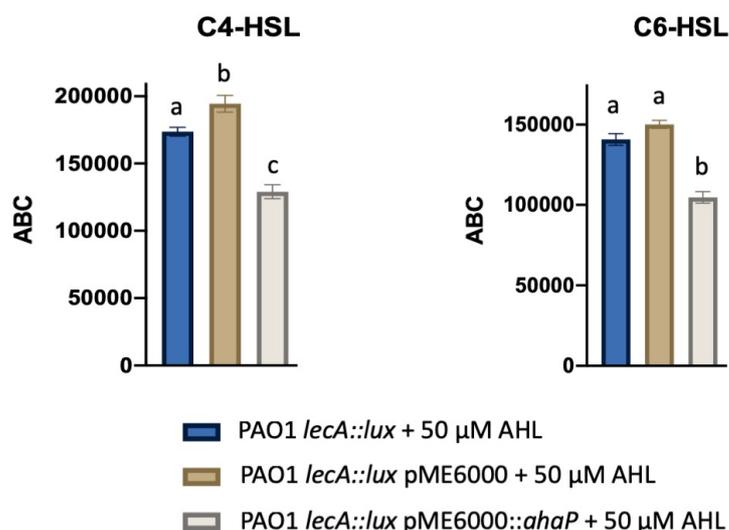


Figura 35. Efecto de la expresión de *ahaP* en *P. aeruginosa* PAO1. Efecto sobre la movilidad tipo *swarming* (A). Efecto sobre la producción de luminiscencia del biosensor *lecA::lux* en presencia de AHLs (B).

g) Ensayos *in vivo* de la cepa M9-54-1 con artemias

Dada la gran actividad QQ mostrada por la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1, se determinó si la misma era capaz de tener aplicación *in vivo* para reducir la virulencia de bacterias patógenas. Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos QQ frente a extractos crudos de AHLs obtenidos a partir de cultivos de los vibrios *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. En la figura 36 se muestra un ejemplo de la degradación de AHLs del patógeno *V. owensii* VibC-Oc-106. Los resultados fueron similares con las AHLs de los demás patógenos probados.

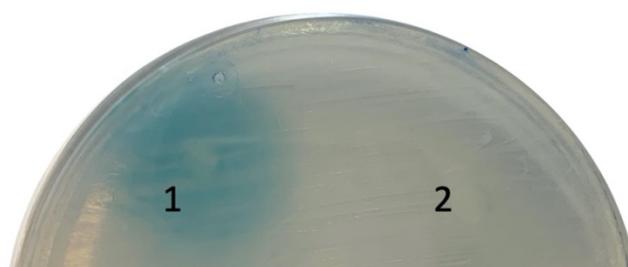


Figura 36. Degradación de extractos de AHLs naturales por parte de *Psychrobacter* sp. M9-54-1. 1. Extracto de *V. owensii*. 2. Degradación del extracto de *V. owensii*. El biosensor utilizado para detectar las AHLs fue *A. tumefaciens* NTL4.

A continuación, y como paso previo a la investigación del uso en cocultivo de la cepa *Psychrobacter* M9-54-1, se llevaron a cabo ensayos de antagonismo para determinar si esta cepa inhibía el crecimiento de los patógenos por un mecanismo de antibiosis. Los resultados demostraron que en ningún caso la cepa M9-54-1 afectaba el crecimiento de los patógenos del género *Vibrio*.

El siguiente paso fue comprobar si la cepa *Psychrobacter* M9-54-1 era capaz de degradar las AHLs de patógenos creciendo en cocultivo con los mismos. Los resultados demostraron que la cepa M9-54-1 fue capaz de degradar en cocultivo las AHLs producidas por los distintos vibrios patógenos utilizados (*V. mediterranei* VibC-Oc-97, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193) (figura 37A). Además, utilizando los mismos cocultivos y antes de hacer los ensayos *in vivo*, se determinó la capacidad de la cepa M9-54-1 de afectar a la producción de diversos factores de virulencia del patógeno *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. De este modo, se observó que la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1 inhibía la producción de gelatinasa en dicha cepa (figura 37B).

Por último, una vez demostrada la capacidad QQ de la cepa M9-54-1 en cocultivo, se investigó si la misma podría ser utilizada *in vivo* en acuicultura. Para ello, se usó de nuevo el modelo de infección de acuicultura *A. salina* y la cepa patógena *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. Los nauplios fueron inoculados bien con el cocultivo de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193/*Psychrobacter* sp. M9-54-1 o bien con las mismas bacterias en monocultivo como controles. La mortalidad de las artemias se registró a las 48h y 72h. La cepa M9-54-1 demostró su potencial capacidad de biocontrol al

reducir significativamente la virulencia de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 sobre los nauplios de *A. salina* tras 72h de la infección (figura 37C). Aunque la supervivencia de las artemias en el cocultivo con M9-54-1 también aumentó a las 48h de la inoculación, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

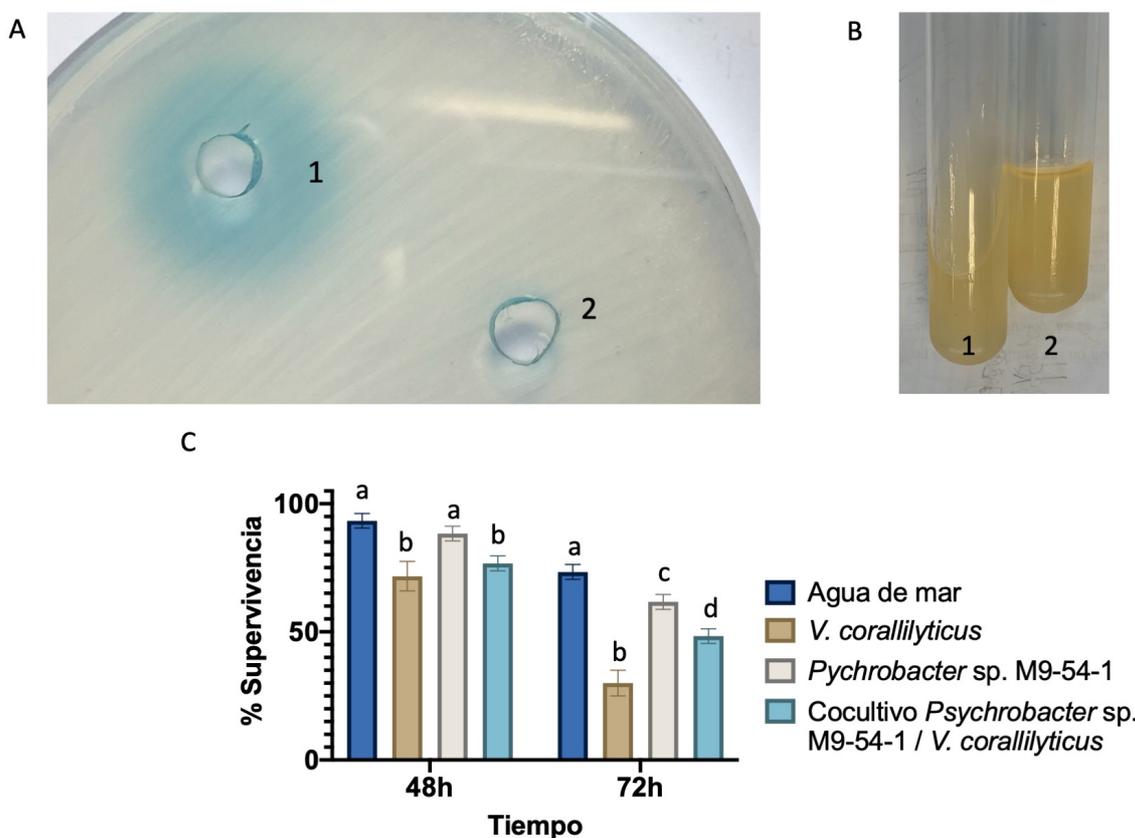


Figura 37. Producción de AHLs (A) y gelatinasa (B) en *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, así como supervivencia de nauplios de *A. salina* tras la infección con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de *Psychrobacter* sp. M9-54-1 (C). 1. Monocultivo de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. 2. Cocultivo de *V. coralliilyticus* y *Psychrobacter* sp. M9-54-1. El biosensor utilizado para detectar las AHLs fue *A. tumefaciens* NTL4.

4.2.5. Caracterización las bacterias con actividad *quorum quenching* pertenecientes a los géneros *Microbulbifer*, *Acinetobacter*, *Rheinheimera*, *Ruegeria* y *Pseudomonas*

En este apartado se estudian conjuntamente un grupo de 8 cepas pertenecientes a los géneros *Microbulbifer*, *Acinetobacter*, *Rheinheimera*, *Ruegeria* y *Pseudomonas*, que tal y como se ha explicado al comienzo del apartado 4.2.2 se seleccionaron bien por su gran actividad QQ o bien por ser representantes de géneros en los que nos se había estudiado previamente la actividad QQ.

Las cepas seleccionadas del género *Acinetobacter* fueron *A. juni* M1-66, *A. juni* M2-40 y *A. juni* M2-33. Las 3 fueron activas frente a todas las AHLs probadas; destacando la actividad de M2-33 frente a AHLs de cadena corta y larga. El resto de cepas seleccionadas fueron *M. echini* M3-111, que fue seleccionada por no existir información al respecto de la actividad QQ de este género; *R. aquimaris* M3-127, *P.*

pachastrellae M2-35, *R. atlantica* M3-98 y *P. sihuensis* M4-84, destacando la gran actividad de *P. pachastrellae* M2-35 y *P. sihuensis* M4-84, ambas del género *Pseudomonas*, frente a todas las AHLs probadas.

Al igual que en los apartados anteriores de este capítulo, se pretende seleccionar las bacterias con actividad QQ que atenúen la virulencia de cepas patógenas. Por ello, las 8 cepas estudiadas en este apartado se ensayaron en cocultivo con bacterias patógenas que afectan a la acuicultura. Concretamente, se utilizaron las tres cepas patógenas de *Vibrio* que previamente habían sido ensayadas en este trabajo: *V. mediterranei* VibC-Oc-97, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

a) Ensayos con cocultivos

Como primer paso en los ensayos en cocultivo, se determinó si las bacterias QQ eran capaces de degradar las AHLs producidas por los patógenos y si tenían algún efecto sobre la producción de algunos de sus factores de virulencia. Para ello, los cocultivos se prepararon en una proporción 100:1 de las cepas QQ a ensayar con respecto a los patógenos y se incubaron durante 24h, tras las cuales se detectaron las AHLs remanentes. Como controles, se utilizaron las mismas cepas, pero inoculadas como monocultivos.

En todos los casos tras la realización de los cocultivos, se evaluó si las cepas QQ interferían en el crecimiento de las 3 cepas de las especies patógenas de *Vibrio*. Para ello, se hicieron recuentos de colonias en el medio TCBS, que es selectivo para las especies de *Vibrio*, a partir de los distintos cocultivos y de los cultivos puros de cada cepa. En ningún caso se apreció una diferencia significativa entre el crecimiento de los patógenos en monocultivo y el crecimiento de los mismos en cocultivo.

Las AHLs remanentes en los cocultivos tras 24h de incubación se determinó mediante un ensayo de difusión en placa. Los resultados, de los que se muestra un ejemplo en la figura 38, demostraron que las 8 cepas con actividad QQ fueron capaces de degradar las AHLs de los patógenos *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 y *V. owensii* VibC-Oc-106, mientras que solo las cepas pertenecientes al género *A. junii* (M1-66, M2-33 y M2-40), *R. aquimaris* M3-127, *R. atlantica* M3-98 y *P. sihuensis* M4-84 fueron capaces de degradar las AHLs producidas por *V. mediterranei* VibC-Oc-97. Respecto a las cepas pertenecientes a la especie *Acinetobacter junii*, en la figura 38 solo se muestra la cepa M1-66 ya que las tres cepas de esta especie tenían la misma actividad.

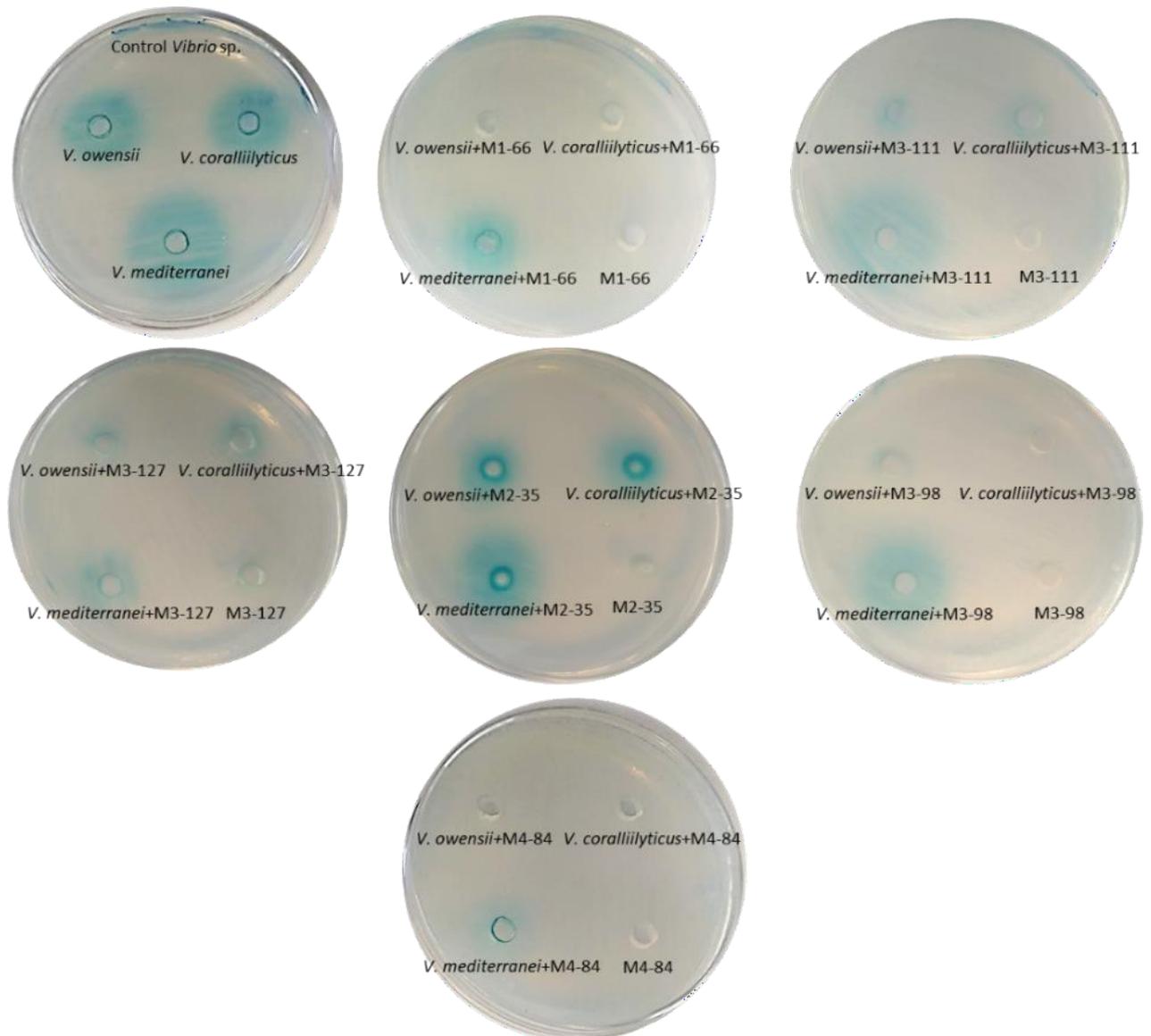


Figura 38. Detección de la producción de AHLs de tres cepas de vibrios patógenos en presencia y ausencia de bacterias QQ mediante ensayo de difusión en placa. El biosensor utilizado fue *A. tumefaciens* NTL4.

Una vez demostrada la capacidad QQ en cocultivo de las 8 cepas seleccionadas, se realizaron cocultivos en las mismas condiciones descritas anteriormente para comprobar si la disminución en la producción de AHLs en los patógenos afectaba a algunas actividades fenotípicas y enzimáticas. Para este estudio se utilizó el patógeno *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 porque tal y como se aprecia en la figura 38, se observó una mayor reducción de la producción de AHLs. Además, en estudios previos en nuestro laboratorio, este patógeno había sido el más virulento en ensayos en artemias y almejas (Torres et al., 2018). Así, tras 24h de incubación de los cocultivos, se realizaron las pruebas fenotípicas. Como controles, se utilizaron los monocultivos de las cepas QQ y el patógeno. Se ensayaron distintas actividades celulares relacionadas con factores de virulencia como la producción de las enzimas DNAsa, amilasa y hemolisina y la movilidad de tipo *swarming*. Los resultados se muestran en la tabla 26 y en las figuras 39 y 40.

tabla 26. Efecto de las cepas QQ sobre diferentes fenotipos de la cepa *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 en cocultivo respecto a los monocultivos.

	DNAsa	Amilasa	Hemolisina	Movilidad <i>swarming</i>
<i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	++	++	++
<i>A. junii</i> M1-66+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	-	-	++
<i>A. junii</i> M2-40+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	+	++	+
<i>A. junii</i> M2-33+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	-	+	++
<i>R. aquimaris</i> M3-127+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	+	+	+
<i>P. pachastrellae</i> M2-35+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	++	++	+
<i>R. atlántica</i> M3-98+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	++	+	+
<i>M. echini</i> M3-111+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	-	+	+
<i>P. sihuensis</i> M4-84+ <i>V. coralliilyticus</i> VibC-Oc-193	++	-	+	+

*++ alta actividad, + baja actividad, - no actividad

Las actividades en las que se observa una disminución están señaladas en color rojo

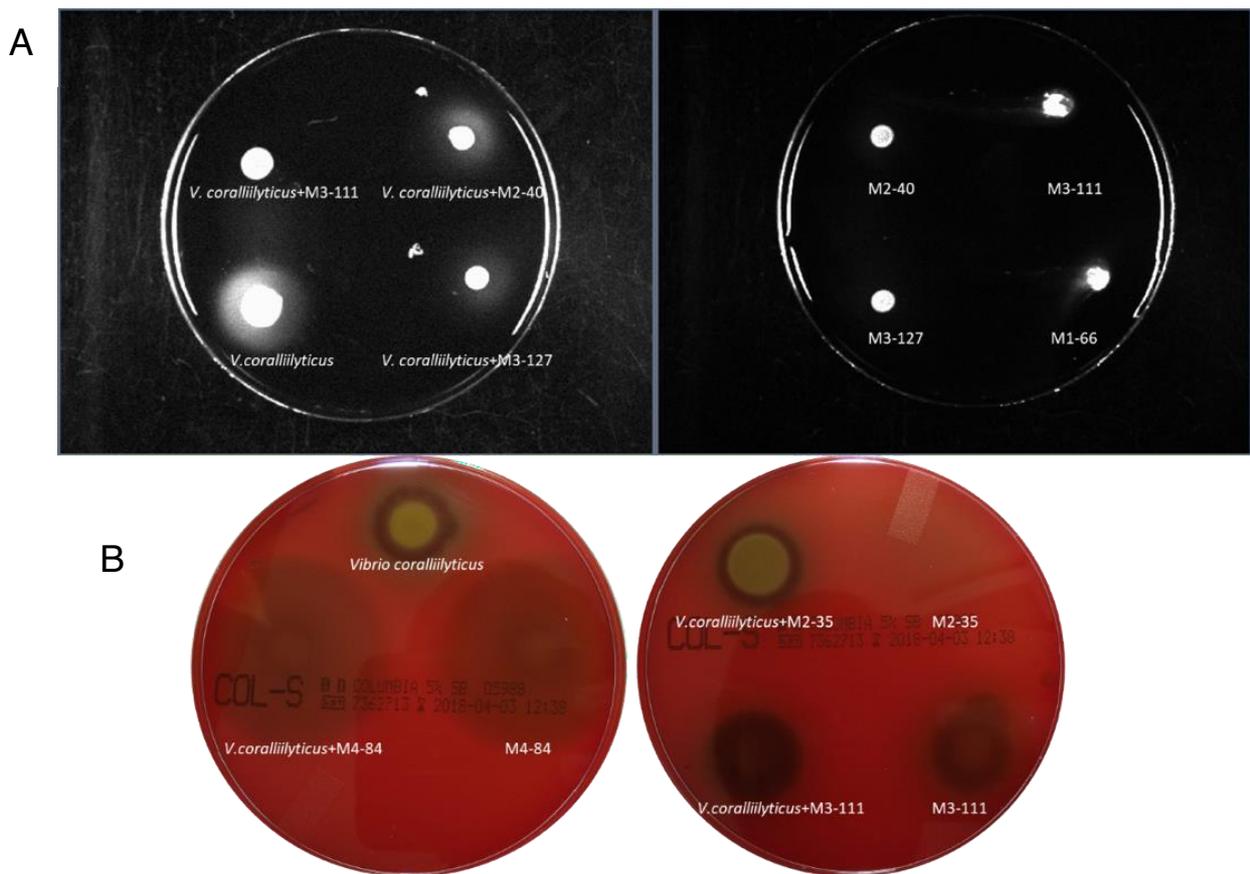


Figura 39. Efecto de las cepas QQ *A. junii* M2-40 y *R. aquimaris* M3-127 sobre la producción de amilasa (A) y de *P. pachastrellae* M2-35 y *M. echini* M3-111 sobre la producción de hemolisina (B) tras el cocultivo con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. Como controles se muestran los cultivos puros de cada cepa.

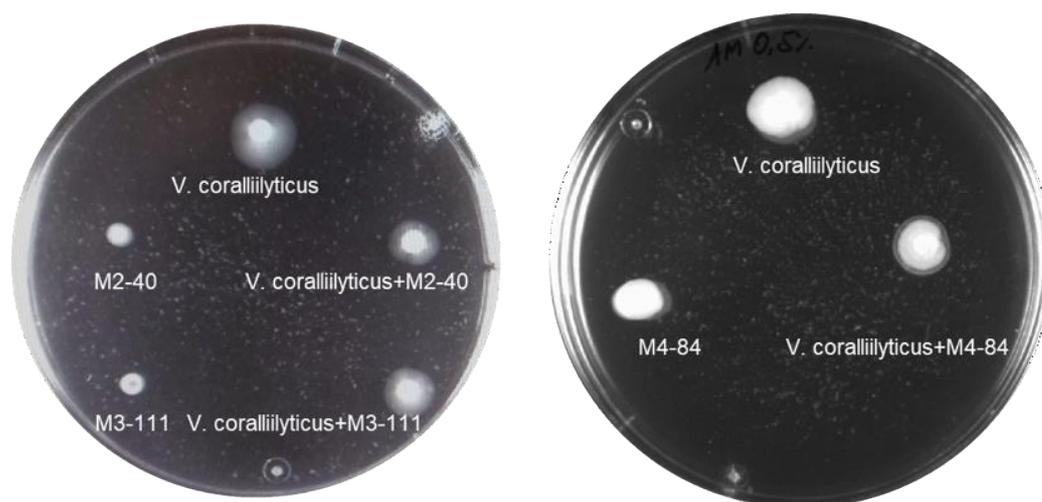


Figura 40. Efecto de las cepas QQ *A. junii* M2-40 y *M. echini* M3-111 sobre la movilidad tipo *swarming* (LB 0,5% p/v, agar) tras el cocultivo con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. Como controles se muestran los cultivos puros de cada cepa.

b) Identificación del tipo de enzima *quorum quenching*

El siguiente paso en la caracterización de las cepas con actividad QQ fue identificar el mecanismo enzimático. En primer lugar, se realizó un ensayo de acidificación en el que, tras la incubación durante 24h del cultivo de cada cepa QQ con C10-HSL, se disminuyó el pH de la reacción hasta pH = 2, y se incubó nuevamente durante 24h. Finalmente, las AHLs remanentes se detectaron mediante un ensayo de difusión en placa con el biosensor *C. violaceum* VIR07.

En la figura 41 se muestran los resultados obtenidos con la cepa *Microbulbifer echini* M3-111 como ejemplo representativo ya que en todas las cepas analizadas de este grupo se obtuvieron los mismos resultados. En ningún caso se observó presencia de moléculas AHLs en el ensayo acidificado, lo que es indicativo de que la actividad no debía ser de tipo lactonasa.

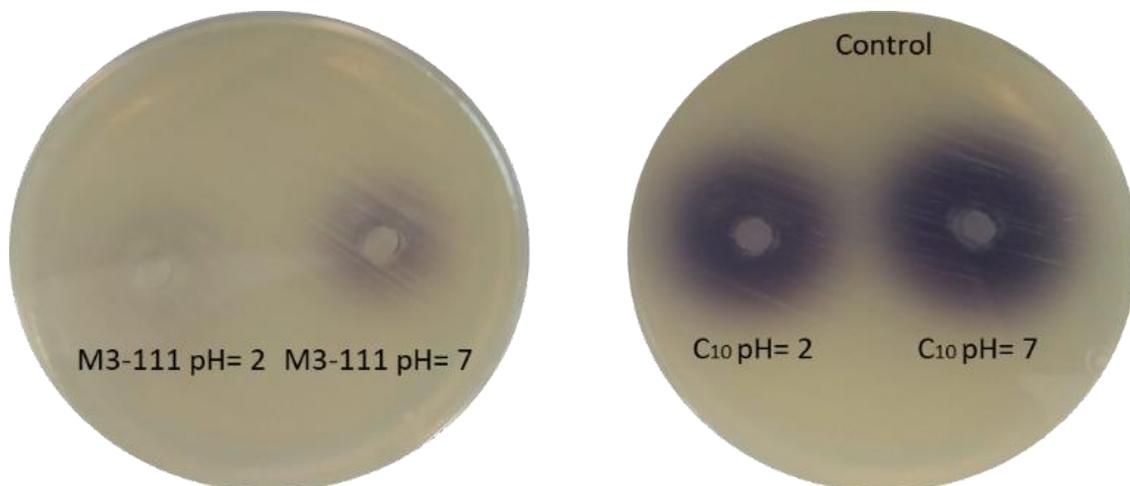


Figura 41. Ensayo de difusión en placa con C10-HSL para determinar la actividad QQ de la cepa *M. echini* M3-111 en cultivo a pH neutro y tras acidificar a pH = 2. El biosensor utilizado fue *C. violaceum* VIR07.

En segundo lugar, para confirmar los resultados del ensayo en placa, se cuantificaron las AHLs remanentes presentes en los cultivos a pH 7 y a pH 2 mediante HPLC-MS siguiendo la misma metodología explicada en apartados anteriores. Tal y como se ve en la figura 42, en la que se representa el área bajo la curva correspondiente a las AHLs remanentes en los ensayos a pH neutro y ácido, apenas hay recuperación de las mismas en la muestra acidificada en las distintas cepas. Esto indica que la enzima QQ no es de tipo lactonasa, confirmándose los resultados anteriores.

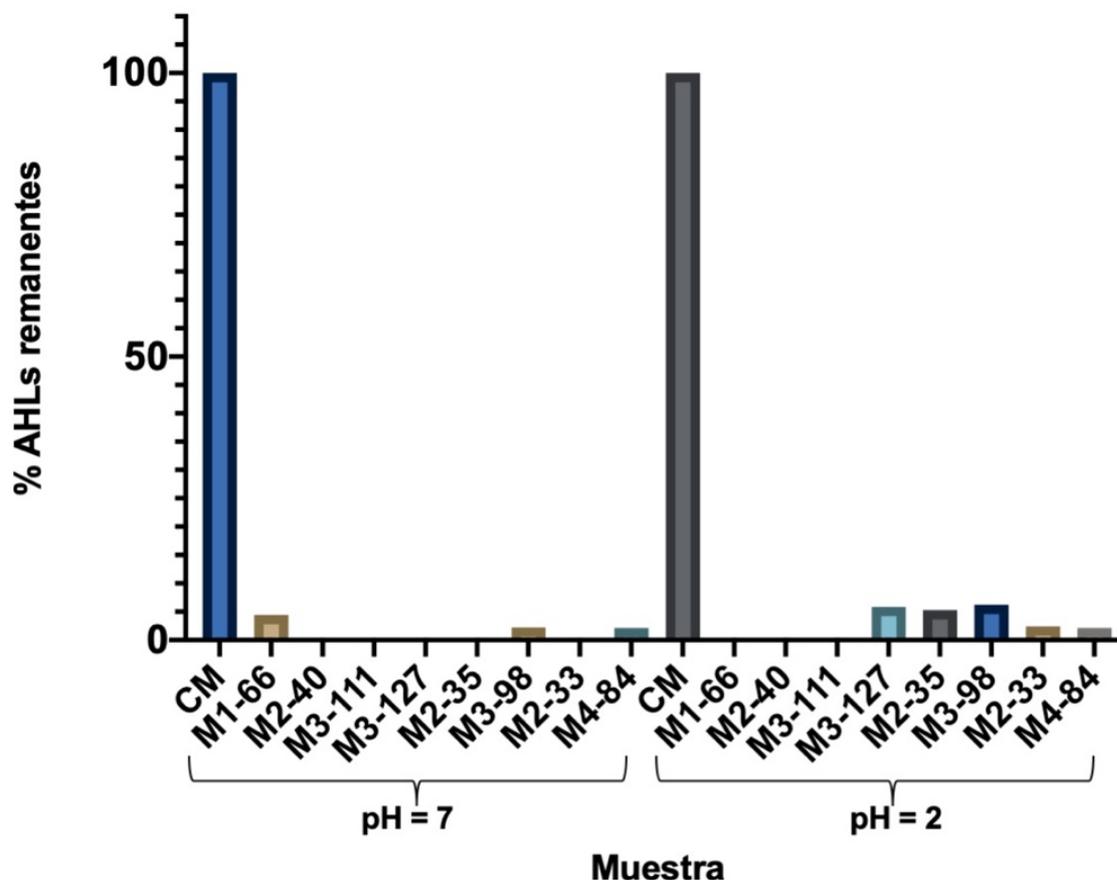


Figura 42. Cuantificación mediante HPLC-MS de la actividad degradadora de C10-HSL de las cepas pertenecientes a los géneros *Microbulbifer*, *Acinetobacter*, *Rheinheimera*, *Ruegeria* y *Pseudomonas* tanto a pH 7 como tras la acidificación a pH 2. Se representa el % de AHLs remanentes.

c) Localización de la actividad *quorum quenching*

El siguiente paso fue determinar la localización celular de las enzimas QQ de las 8 cepas estudiadas en este apartado. Para ello, se obtuvo el sobrenadante y el ECC de las mismas y se determinó la actividad enzimática en cada caso frente a C10-HSL mediante un ensayo de difusión en placa, utilizando el biosensor *C. violaceum* VIR07. Los resultados se recogen en la tabla 27. En la mayoría de los casos, la actividad se encontraba en el ECC, si bien en algunos casos también se encontró una pequeña actividad en el sobrenadante.

Tabla 27. Localización de la actividad QQ en las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros *Microbulbifer*, *Acinetobacter*, *Rheinheimera*, *Ruegeria* y *Pseudomonas*.

Cepas	Localización de la actividad	
	Extracelular	Intracelular
<i>Acinetobacter junii</i> M1-66	-	++
<i>Acinetobacter junii</i> M2-40	-	++
<i>Acinetobacter junii</i> M2-33	+	++
<i>Microbulbifer echini</i> M3-111	-	++
<i>Pseudomonas pachastrellae</i> M2-35	+	++
<i>Pseudomonas sihueiensis</i> M4-84	+	++
<i>Rheinheimera aquimaris</i> M3-127	+	++
<i>Ruegeria atlantica</i> M3-98	-	++

*++ alta actividad, + baja actividad, - no actividad

d) Ensayos *in vivo* con artemias

Una vez demostrada la actividad QQ de las 8 cepas estudiadas en este apartado, se seleccionaron algunas de ellas para determinar la capacidad de reducir la virulencia del patógeno *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193 *in vivo*. Concretamente, se eligieron las cepas *Acinetobacter junii* M1-66, *A. junii* M2-40, *A. junii* M2-33, *Microbulbifer echini* M3-111, *Pseudomonas sihueiensis* M4-84 y *Rheinheimera aquimaris* M3-127 ya que mostraron mayor actividad en la reducción de la movilidad y la producción de enzimas en la cepa *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

El ensayo se realizó en nauplios de artemias que se infectaron tanto con el cocultivo de la cepa patógena con las distintas cepas QQ, como con los monocultivos tanto de las cepas QQ como de *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, que se utilizaron como controles, así como un control que se inoculó con el mismo volumen de agua de mar. Los cocultivos se prepararon como se ha descrito con anterioridad, es decir, en una proporción 100:1 de la cepa QQ con respecto a la cepa patógena. Tras la infección, se determinó el porcentaje de supervivencia de los nauplios a las 24h, 48h y 72h.

Los resultados obtenidos en los ensayos para cada una de las cepas se muestran en la figura 43, en la que se representa el porcentaje de supervivencia de las artemias infectadas con respecto al tiempo de infección. Todos los ensayos se repitieron por triplicado.

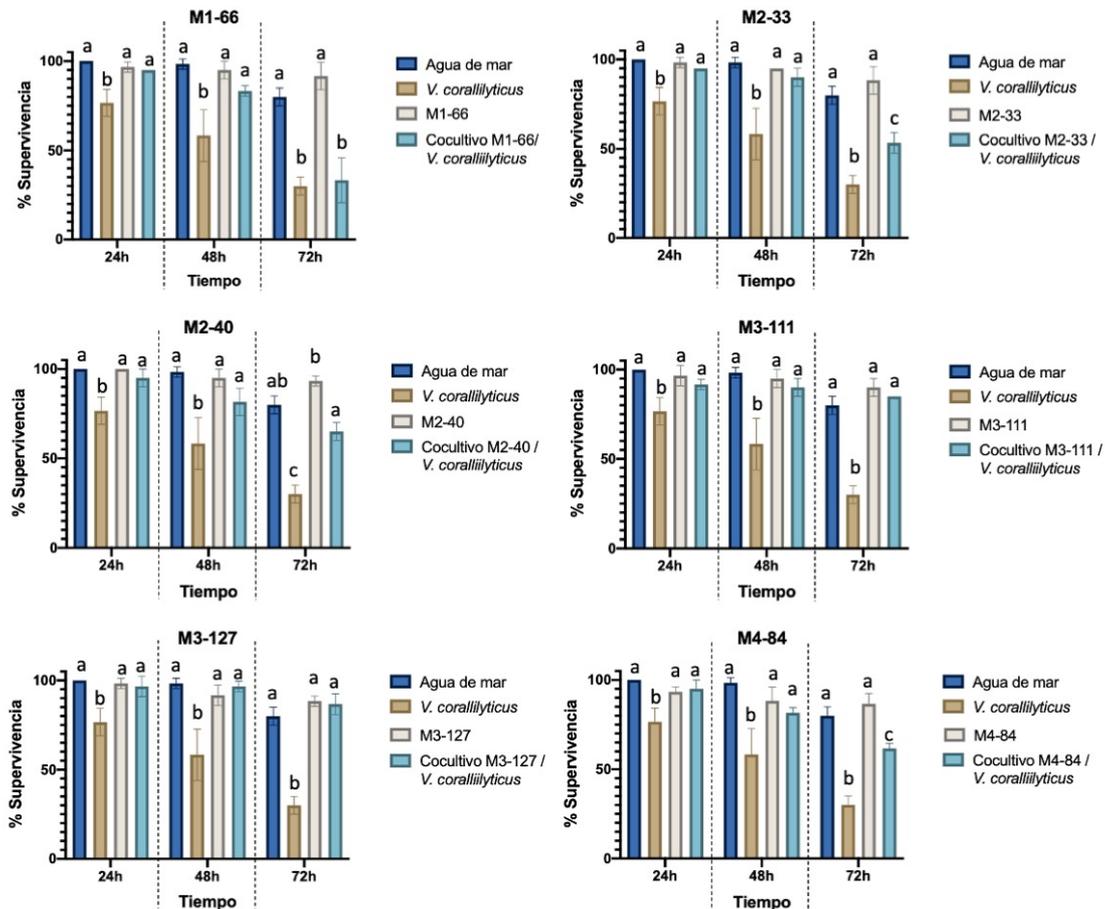


Figura 43. Representación del porcentaje de supervivencia de los nauplios de *Artemia salina* a las 24, 48 y 72h tras una infección con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 en presencia y ausencia de las cepas QQ. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas condiciones.

Los resultados obtenidos demuestran que ninguna de las cepas QQ resultó virulenta para las artemias. De hecho, todas las cepas QQ en cocultivo fueron capaces de mejorar de manera significativa la supervivencia de los nauplios de artemias a las 24h y 48h tras la infección. Además, las cepas *M. echini* M3-111 y *R. aquimaris* M3-127 fueron capaces de incrementar la supervivencia tras 72h y reducir la mortalidad hasta los mismos niveles que el control inoculado únicamente con agua de mar.

Otras cepas como *A. junii* M2-33 y M2-40 y *P. sihueiensis* M4-84 disminuyeron la mortalidad tras la infección con el patógeno, pero no fueron capaces de llevarla a los valores del control inoculado con agua de mar.

En general, con los resultados obtenidos en este grupo de cepas seleccionadas por su actividad QQ, se puede afirmar que son interesantes para su aplicación en la lucha frente a las infecciones en acuicultura, al ser capaces de reducir la mortalidad de las artemias infectadas por el patógeno *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193. Especialmente destacan las cepas *M. echini* M3-111 y *R. aquimaris* M3-127, que fueron capaces de reducir de forma significativa la virulencia de dicho patógeno.

4.2.6. Discusión

En este capítulo se muestra la selección de bacterias capaces de inhibir los sistemas QS por vía enzimática a partir de la colección de 827 cepas aisladas previamente de la microbiota de invertebrados marinos y sedimentos de tanques de cultivo. Tal y como se muestra en la tabla 21, se han identificado 21 cepas con importante actividad degradadora de AHLs.

El hecho de haber encontrado una proporción elevada de cepas con actividad QQ (5,9% de las cepas degradaron total o parcialmente C6-HSL y C10-HSL) no debe sorprendernos, pues estos datos, aunque son más bajos que algunos de los estudios anteriores en los que se analizan aislados microbianos marinos (Romero et al., 2012, 2011), están en consonancia con otros trabajos en los que se demuestra que el medio marino es más rico en bacterias productoras de enzimas QQ que otros ambientes (Torres et al., 2013). El ambiente del que han sido aisladas estas cepas podría haber facilitado evolutivamente la capacidad de las mismas para degradar AHLs, siendo éstas una fuente de carbono en el medio marino, donde se pueden presentar situaciones de oligotrofia, suponiendo una ventaja poder degradar estas AHLs (Safari et al., 2014). Además, haciendo alusión a la hostilidad del medio marino, las situaciones de competencia por los nutrientes y por la ocupación de nuevos nichos ecológicos es muy frecuente, de manera que las bacterias deben establecer estrategias para desarrollarse en este medio, siendo una de estas estrategias la inhibición de la comunicación entre otras bacterias mediante la degradación de las moléculas AHLs (Chen et al., 2019; Teasdale et al., 2009).

En todas las cepas seleccionadas se ha observado una mayor capacidad de degradación de las AHLs de cadena hidrocarbonada media y larga. Este hecho es muy común entre las bacterias donde se ha descrito esta actividad enzimática, siendo más difícil la rotura de las AHLs de cadena corta (Chen et al., 2013; Torres et al., 2013).

Las cepas de *S. maltophilia* que fueron seleccionadas (M3-1, M1-14, M3-13 y M9-54-2) demostraron una actividad QQ elevada frente a un amplio rango de AHLs. Si bien las cuatro cepas eran muy similares, no eran clones de la misma cepa, ya que las cuatro fueron aisladas de diferente origen (M3-1 y M3-13 de los intestinos de *H. tubulosa*; M1-14 de los tentáculos de *A. sulcata*; y M9-54-2 de las heces de holoturias) y, además, las cepas diferían en el rango de AHLs que eran capaces de degradar. Tal y como se ha indicado anteriormente, las AHLs de cadena lateral media y larga fueron mejor degradadas, que las de cadena corta, con la excepción de C8-HSL, para la que estas cepas tuvieron dificultad en su degradación. Estas cuatro cepas también demostraron actividad QQ frente a extractos de AHLs de patógenos relacionados con la acuicultura como *V. mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, así como frente al patógeno de agricultura *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. Dado que las AHLs han demostrado controlar la producción de ciertos factores de virulencia tanto en las cepas de *Vibrio* (Torres et al., 2018) como en *P. carotovorum* (Pirhonen et al. 1993), las cepas de *S. maltophilia* seleccionadas en este trabajo podrían ser candidatas a controlar infecciones tanto en

acuicultura como en agricultura a través de la degradación enzimática de las moléculas señal de esos patógenos.

El genoma de la cepa JV3 de *S. maltophilia*, disponible en la base de datos NCBI, tenía anotada una enzima “penicilin-acilasa” bajo el número de acceso WP_014036524.1. Con *primers* específicos diseñados en este trabajo se amplificaron genes homólogos de acilasas de penicilina en las cuatro cepas. El análisis de las secuencias de aminoácidos propuestas demostró que compartían dominios conservados no solo con las acilasas de penicilinas, sino también con la enzima QQ QuiP de *P. aeruginosa*, lo que apoyaba la hipótesis de que este gen era el responsable de codificar la enzima QQ activa en estas cepas. Además, el ensayo de acidificación que se llevó a cabo y que se comprobó tanto por ensayo de difusión en placa como por HPLC-MS, indicaba que la actividad no debía ser una lactonasa, sino que lo más probable es que fuera una acilasa.

Aunque estudios anteriores habían demostrado que ciertas acilasas de penicilinas eran capaces de degradar AHLs (Mukherji et al., 2014; Sunder et al., 2017), esta función no había sido descrita ni caracterizada en la especie *S. maltophilia* hasta este trabajo. En 2013, Ochiai y colaboradores describieron una bacteria del género *Stenotrophomonas*, aislada de un lodo activado, capaz de degradar C10-HSL. Sin embargo, el tipo de mecanismo mediante el que se llevaba a cabo la degradación no fue caracterizado (Ochiai et al., 2013). En 2018 se identificó un clon de *S. maltophilia* aislado de la microbiota de la trucha arcoíris, capaz de degradar AHLs gracias a una lactonasa homóloga a AiiA. En nuestro trabajo se han realizado PCRs con los *primers* específicos de las lactonasas AiiA (Dong et al., 2000) y AttM (Carlier et al., 2003) y no se ha obtenido ninguna amplificación de homólogos a estos genes (resultados no mostrados). En estudios anteriores se ha demostrado que esta bacteria también es capaz de degradar otras moléculas señal como DSF (Huedo et al., 2018), lo que, junto con la caracterización de la degradación de AHLs descrita en esta tesis doctoral, refuerza aún más el potencial biotecnológico de esta cepa como inhibidora de sistemas QS.

Las diferentes rutas de QQ presentes en *S. maltophilia* pueden demostrar que esta bacteria ha evolucionado en un contacto estrecho con bacterias productoras de AHLs (Torabi Delshad et al., 2018). Además, gracias a la amplia diversidad genómica del género *Stenotrophomonas*, no debería sorprender que en el futuro se identificaran nuevos aislados con diferentes mecanismos de QQ. De hecho, se han encontrado distintas características respecto a la producción y degradación de AHLs en distintas cepas de *S. maltophilia* aisladas del mismo lugar, lo que hace suponer que los procesos de señalización a nivel de comunidad son muy complejos (Tan et al., 2015).

Si bien existen cepas patógenas oportunistas de *S. maltophilia*, esta bacteria es ubicua en el medio ambiente, y se ha aislado de diversas fuentes (Brooke, 2012). Por ejemplo, se han aislado cepas de *S. maltophilia* en este trabajo de la microbiota de invertebrados marinos como anémonas y holoturias y de otros animales (Romanenko et al., 2008), peces (Furushita et al., 2005; Torabi Delshad et al., 2018) e incluso en la rizosfera de plantas (Hayward et al., 2010). Gracias a su enorme diversidad genética y a su demostrado impacto positivo en el crecimiento de plantas (Niu et al.,

2017; Ryan et al., 2009), *S. maltophilia* se ha propuesto como una herramienta de biorremediación (Mukherjee y Roy, 2016). Además, gracias a su capacidad de producción de quitinasa, el potencial biocontrol de esta bacteria también ha sido demostrado (Zhang y Yuen, 2000). Otros estudios han demostrado que algunas cepas de esta bacteria tienen un enorme potencial biotecnológico y que pueden ser útiles tanto para aplicaciones confinadas (en las que se limita su colonización a un lugar concreto) como no confinadas (como la agricultura) (Lira et al., 2017). Los resultados presentados en esta tesis doctoral con respecto a esta cepa refuerzan estas hipótesis.

En definitiva, y dada su capacidad de degradar AHLs así como de reducir la virulencia de patógenos de plantas y peces, la cepa M9-54-2, perteneciente a la bacteria ubicua *S. maltophilia*, muestra un gran potencial de aplicación para combatir enfermedades infecciosas en acuicultura y agricultura. No obstante, y dado que se trata de una bacteria patógena oportunista y algunas cepas son multirresistentes a los antibióticos, se debería purificar la enzima de *S. maltophilia* M9-54-2 para ser usada en lugar del cultivo completo.

Otra de las cepas seleccionadas en este capítulo por su capacidad QQ es la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1. Hasta el momento, el género *Psychrobacter* incluye a especies gram negativas psicrotolerantes (Juni y Heym, 1986) (<http://www.bacterio.net>). La mayoría de ellas están relacionadas con los ambientes marinos y algunas de ellas han sido aisladas o encontradas en la microbiota asociada a distintos animales marinos (Romanenko et al., 2002, 2009; Yoon et al., 2005). La cepa M9-54-1 estudiada en este trabajo pertenece al género *Psychrobacter*, y como muchas de otras especies de este género, también ha sido aislada del medio marino, concretamente de las heces de holoturias. La cepa fue capaz de degradar diferentes AHLs tanto naturales como sintéticas.

Para estudiar con más profundidad la cepa M9-54-1, se procedió a la secuenciación de su genoma. La secuencia del gen ARNr 16S parcial permitió identificarla en un principio como una cepa del género *Psychrobacter*, pero gracias a la secuenciación de su genoma se comprobó, en base a la secuencia completa del gen ARNr 16S, que la homología con *P. faecalis* y *P. pulmonis* era mayor a 99.5%, lo que podría indicar que esta cepa pertenece a una de esas dos especies. El genoma de *P. faecalis* estaba disponible libremente, por lo que se llevó a cabo una comparación a nivel genómico entre M9-54-1 y *P. faecalis*, y los valores obtenidos se encontraron justo debajo del límite propuesto para una nueva especie (Richter y Rosselló-Móra, 2009). Sin embargo, hasta que el genoma de *P. pulmonis* no esté disponible no podremos concluir nada en este aspecto. De hecho, ya se ha discutido con anterioridad la similitud entre las secuencias del gen ARNr 16S de estas dos especies, que difieren en sus características fenotípicas, como el uso de distintos carbohidratos (Deschaght et al., 2012).

Al igual que otras cepas aisladas en este trabajo por su capacidad QQ o QSI, *Psychrobacter* sp. M9-54-1 también pertenece a un género con un elevado potencial biotecnológico. Por ejemplo, en este género ya se han descrito enzimas adaptadas al frío como esterasas y lipasas (Wu et al., 2015; Zhang et al., 2018), y ya está

considerado como prometedor en su uso en biotecnología (Ciok y Dziewit, 2019). En nuestro trabajo, la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1, es capaz de degradar las AHLs a una temperatura de 4°C, lo que confiere un gran potencial para su uso por ejemplo en acuicultura. En este género se ha identificado otra especie, aislada de una esponja marina, productora de compuestos QSI. Sin embargo, los autores del trabajo no han demostrado su capacidad de degradar las AHLs ni el mecanismo de inhibición de QS (Li et al., 2008).

El análisis del genoma de la cepa M9-54-1 permitió identificar dos potenciales genes que codificaban enzimas QQ; uno con semejanza a PvdQ, enzima de *P. aeruginosa* (Huang et al., 2003) y otro con homología a BpiB05, una enzima derivada de un metagenoma (Bijtenhoorn et al., 2011b). Tras clonar y expresar ambos genes en *E. coli*, se demostró que solo el gen con homología a *pvdQ* era el responsable de la actividad QQ y a la enzima se le denominó AhaP. El análisis filogenético llevado a cabo demostró que el gen seleccionado pertenece a la familia de las acilasas. Esta enzima tenía una gran homología con la enzima PvdQ (Huang et al., 2003) y así lo demuestra la similitud entre las estructuras propuestas de ambas enzimas mediante el programa Phyre2.

La enzima QQ producida por *Psychrobacter* sp. M9-54-1 ha sido purificada y su actividad ha sido demostrada tanto mediante ensayos de difusión en placa como utilizando biosensores basados en *E. coli* que emiten luminiscencia. Estos últimos biosensores mejoran los problemas de los biosensores clásicos *C. violaceum* y *A. tumefaciens* relacionados con la falta de sensibilidad y la incapacidad de cuantificación de los ensayos de difusión en placa (Winson et al., 1998). La enzima AhaP es capaz de degradar todas las AHLs ensayadas desde 4 a 14 carbonos en la cadena hidrocarbonada, con o sin sustituciones en la molécula, lo que demuestra su gran eficacia. Al igual que en otras acilasas, la actividad fue encontrada en el pellet celular y no en el sobrenadante. No obstante, en la secuencia de AhaP se identificó un péptido señal, pero la eliminación del mismo no modificó la actividad de la enzima.

Con respecto al resto de cepas seleccionadas, 8 pertenecen a la especie *Acinetobacter junii*, destacando las cepas M1-66, M2-40 y M2-33 que tienen capacidad para degradar todas las AHLs que se han ensayado. Llama la atención la selección de distintas cepas de *A. junii*, ya que esta bacteria está reconocida como patógena, aunque las infecciones causadas por la misma son raras (Hung et al., 2009; Linde et al., 2002). El uso de esta cepa en biotecnología también ha sido demostrado, por ejemplo, a nivel biomédico; el lipopéptido de esta especie tiene propiedades antioxidantes y promueve la curación de heridas (Ohadi et al., 2017) y en plantas de tratamiento de aguas, esta especie es capaz de eliminar fosfatos (Hrenovic et al., 2011) e incluso se ha propuesto como herramienta de biorremediación gracias a su capacidad de captar plomo (P. K. Singh et al., 2019). Sin embargo, en esta tesis doctoral es la primera vez que se describe la capacidad QQ en varias cepas de la especie *A. junii*, demostrando además mediante HPLC que en todas ellas la actividad se debía a una acilasa. La existencia de enzimas QQ frente a AHLs de tipo lactonasa ha sido demostrada en otras especies del mismo género como *A. baumannii* (C. Liu et al., 2017; Mayer et al., 2018), así como enzimas QQ de tipo acilasas (Ochiai et al., 2014) y degradadoras de DSF (Ye et al., 2019).

Otras cepas seleccionadas por su capacidad QQ en este trabajo incluyen *Pseudomonas pachastrallae* M2-35 y *P. sihuensis* M4-84. La existencia de enzimas QQ en el género *Pseudomonas* es muy frecuente, como por ejemplo las acilasas PvdQ, QuiP, HacA y HacB, todas ellas encontradas en *P. aeruginosa* (Huang et al., 2006, 2003; Shepherd y Lindow, 2009). También se han identificado otras especies de *Pseudomonas* con capacidad QQ, como *P. segetis* P6, en la que incluso se ha demostrado su capacidad de actuar como herramienta de biocontrol en agricultura (Rodríguez et al., 2020). En este trabajo hemos puesto de manifiesto la capacidad de dos cepas de *Pseudomonas* para degradar moléculas AHLs, tanto sintéticas como producidas por cepas patógenas de *Vibrio*, así como de reducir en cocultivo algunas actividades fenotípicas de patógenos del género *Vibrio*.

Respecto a la cepa *Rheinheimera aquimaris* M3-127 hay que destacar su gran actividad QQ frente a las distintas AHLs estudiadas. Curiosamente, se ha descrito que una cepa de *R. aquimaris* es capaz de interferir con los sistemas QS gracias a la producción de una DKP (Sun et al., 2016). Además, se ha reportado la existencia de una cepa de *Rheinheimera chironomi* (Tan et al., 2015). Sin embargo, en esta tesis doctoral se describe por primera vez la existencia de una enzima QQ en *R. aquimaris*. Por su parte, en el caso de *R. atlantica* M3-98, de nuevo nos encontramos con que no es la primera vez que se describe una enzima QQ en este género, ya que en la especie *R. mobilis* se identificó una lactonasa (Cai et al., 2018). No obstante, nuestros ensayos han demostrado que en la cepa M3-98 la actividad QQ era de tipo acilasa siendo la primera vez que se encuentra una enzima QQ de tipo acilasa en este género. Por último, en el caso de *Microbulbifer echini* M3-111 nos encontramos con una especie perteneciente a un género relativamente poco conocido pero en el que en los últimos años se han descrito numerosas enzimas con potencial biotecnológico, debido a la producción de compuestos antibacterianos (Jayanetti et al., 2019) o de interés en la industria como las β -glucosidasas o las alginato-liasas (Z. Jiang et al., 2019; Pyeon et al., 2019; Yang et al., 2019). En esta tesis doctoral se describe por primera vez una acilasa de AHLs en este género, ampliando su interés biotecnológico.

En nuestro trabajo, uno de los objetivos principales es la utilización de las bacterias QQ o de sus enzimas en la lucha frente a enfermedades infecciosas, como alternativa o ayuda al tratamiento con antibióticos. En esta tesis doctoral se ha comprobado la actividad de bacterias QQ frente a diversos patógenos, como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT225^T, *P. aeruginosa* PAO1 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

De entre las cuatro cepas de *S. maltophilia* seleccionadas, la cepa *S. maltophilia* M9-54-2 fue elegida para realizar ensayos de biocontrol para combatir infecciones tanto en agricultura como en acuicultura, ya que fue la que demostró una mayor actividad de QQ frente a un amplio rango de AHLs. En primer lugar, se llevaron a cabo cocultivos entre esta cepa y la bacteria patógena de peces y moluscos *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 así como la cepa patógena de patatas, causante de la podredumbre blanda *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* CECT 225^T. Los resultados obtenidos demuestran una gran disminución en la producción de AHLs, que conlleva una disminución en la producción de los factores de virulencia cuando se crecen en cocultivo los patógenos mencionados junto con *S. maltophilia* M9-54-2. Así, se

observó una disminución en la movilidad tipo *swimming* y *swarming*, así como en distintas actividades enzimáticas como la gelatinasa. Estos resultados coinciden con los previamente demostrados por otros autores que utilizan cocultivos de cepas con actividad QQ y patógenos (Chan et al., 2009; Torres et al., 2016).

La podredumbre blanda es una enfermedad muy destructiva en frutas y verduras causada por especies de *Pectobacterium* (Crépin et al., 2012). La cepa M9-54-2 ha demostrado ser capaz de reducir los síntomas de la podredumbre producidos por dicho patógeno en tubérculos de patata en más de un 90%, lo que está en consonancia con otros estudios en los que se utilizaron enzimas QQ capaces de atenuar esta infección (Garge y Nerurkar, 2016; Torres et al., 2017). Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio ya había demostrado que la enzima QQ HqiA elimina por completo la maceración producida por *P. carotovorum* en tubérculos de patata (Torres et al., 2017).

Anteriormente ya se ha mencionado la enorme relevancia del patógeno nosocomial *P. aeruginosa*. En este trabajo hemos demostrado usando cepas biosensoras de *P. aeruginosa lecA::lux* y la cepa salvaje PAO1-N que la enzima AhaP, producida por *Psychrobacter* sp. M9-54-1 puede ayudar a luchar contra las infecciones causadas por este patógeno. La cepa biosensora PAO1 *lecA::lux* contiene una fusión entre *lecA* y el operón *luxCDABE*, que permite observar la expresión del gen *lecA*, que controla la producción de lectinas, que actúan como adhesinas y citotoxinas (Winzer et al., 2000). La expresión de la enzima AhaP en PAO1 disminuyó la actividad de *lecA*, principalmente cuando se añadieron AHLs al medio, dado que la actividad de *lecA* es estimulada mediante C4-HSL y C6-HSL (Winzer et al., 2000) y la enzima AhaP es capaz de degradar eficientemente estas AHLs. Del mismo modo, la expresión de *ahaP* en PAO1-N inhibe la movilidad tipo *swarming* en esta bacteria. Esta movilidad es un factor de virulencia reconocido en *P. aeruginosa* (Soukarieh et al., 2018b) y su inhibición es importante para reducir su patogenicidad.

Con respecto a la vibriosis, hay que destacar que es una de las patologías más comunes que se encuentran en las instalaciones de acuicultura (Austin y Zhang, 2006; Dubert et al., 2017) y los sistemas QS del género *Vibrio* están perfectamente identificados y se conoce que están implicados en el control de los mecanismos de virulencia (Girard, 2019; Liu et al., 2018). Para estudiar patógenos relacionados con la acuicultura, se han utilizado previamente los nauplios de *Artemia salina* como modelo para comprobar la virulencia de cepas de *Vibrio* así como la potencial reducción de su virulencia cuando se aplican inhibidores de QS (Defoirdt et al. 2005; Santhakumari et al. 2017; Torres et al. 2018).

En este trabajo se han llevado a cabo ensayos en cocultivo con *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193 y diversas cepas con capacidad QQ, demostrando que la degradación de las moléculas señal del tipo AHL por vía enzimática es una herramienta eficaz en la lucha de las vibriosis en acuicultura. Por ejemplo, la cepa *S. matohpilia* M9-54-2 es capaz de aumentar dos veces la supervivencia de los nauplios de *Artemia salina* infectados con el patógeno *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, lo que permite reforzar la idea del potencial biotecnológico como cepa de biocontrol en acuicultura. Del mismo modo,

las cepas M1-66, M2-33, M2-40, M3-111, M3-127, M9-54-1 y M4-84 utilizadas en cocultivo con dicho patógeno fueron capaces de proteger a las artemias, aumentando su supervivencia. Estos resultados demuestran que la interrupción por vía enzimática del QS es una estrategia eficaz en la lucha contra las infecciones por *Vibrio* spp. en acuicultura, y que el medio marino, y más concretamente, la microbiota de invertebrados marinos es una fuente de bacterias con actividad QQ que pueden ser empleadas como alternativas a los antibióticos.

4.3. Análisis metagenómico de la abundancia de enzimas *quorum quenching*

4.3.1. Resumen/Summary

El estallido de las técnicas bioinformáticas y metagenómicas en los últimos años ha permitido aumentar el conocimiento de la biodiversidad en el medio ambiente, así como descubrir genes con funciones determinadas. Sin embargo, la gran cantidad de datos metagenómicos disponibles no se ha procesado en su totalidad, y existe una escasez de información sobre la abundancia de las enzimas *quorum quenching* en la naturaleza. En este capítulo, se han utilizado las técnicas bioinformáticas para calcular la abundancia de enzimas *quorum quenching* en 60 metagenomas representativos de muy diversos ambientes. Además, se llevó a cabo una asignación taxonómica realizada a los homólogos de enzimas *quorum quenching* encontrados, así como la reconstrucción de árboles filogenéticos de los mismos. Se demostró que estas enzimas eran relativamente abundantes y que en algunos de los metagenomas incluso eran más abundantes que los operones descritos con una conocida tasa elevada de transferencia horizontal. En los árboles filogenéticos se observó cómo los homólogos de enzimas *quorum quenching* asignados a los mismos taxones se agrupan juntos. Este estudio aporta información sobre la importancia de las enzimas *quorum quenching* en el medio ambiente, demostrando su relativa abundancia y el hecho de que comparten una gran homología, estando presentes en distintos taxones.

The burst of metagenomic and bioinformatic techniques for the last years has allowed the increase in the knowledge on the environments biodiversity as well as the mining of genes with a certain function. Nevertheless, the great amount of metagenomic data has not been fully used and there is a lack of information in the abundancy of *quorum quenching* enzymes in natural environments. In this chapter, bioinformatics techniques were used to calculate the abundancy of *quorum quenching* enzymes in 60 metagenomes representing very diverse environments. Furthermore, the taxonomic assignment of the hits found as well as the reconstruction of the phylogenetic trees was carried out. It was found that these enzymes were relatively abundant and in some of the metagenomes analysed they were even more abundant than operons with known high HGT rate. In the phylogenetic trees, hits assigned to the same taxa clustered together. This study brings light into the knowledge of the importance of *quorum quenching* enzymes and demonstrates its relatively high abundancy and that they share high homology, being present in different taxa.

4.3.2. Análisis de la abundancia de las enzimas *quorum quenching* en 60 metagenomas pertenecientes a diversos ambientes naturales

La presencia y la importancia de los mecanismos QQ en los ambientes salinos se ha demostrado en los capítulos anteriores mediante técnicas clásicas *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas bioinformáticas, en este capítulo se pretende analizar la relevancia de estos sistemas *in silico*, utilizando 60 metagenomas públicamente disponibles en la base de datos de JGI, y que pertenecen a los más diversos ambientes naturales, que van desde suelos tropicales a lagos salinos o tapetes microbianos, pasando por la microbiota asociada a invertebrados. Para ello, se analizó la presencia de enzimas degradadoras de moléculas AHL en los 60 metagenomas, tomando como referencia para la búsqueda de las mismas una base de datos creada de 28 enzimas QQ con actividad demostrada. De esta forma, se ha demostrado la relativa abundancia relativa de las enzimas QQ en los diversos metagenomas estudiados.

a) Abundancia absoluta de las enzimas QQ

Para determinar la abundancia de las enzimas QQ en los 60 metagenomas, en primer lugar, se establecieron tres condiciones (A, B y C) según la homología que se pretendía encontrar. Las condiciones tipo A fueron las más estrictas, ya que para seleccionar algún homólogo que cumpliera con las mismas, era necesario que existiera una gran semejanza, mientras que las condiciones tipo C fueron las que menos homología requerían. Concretamente, en las condiciones A se exigía una identidad del 45% para seleccionar un homólogo; en las B un 40% y en las C un 38%. Por otra parte, se construyó una base de datos con 28 enzimas QQ con actividad demostrada que incluían 15 lactonasas, 9 acilasas y 4 enzimas cuyo mecanismo aún no había sido identificado (tabla 11).

En segundo lugar, se determinó la presencia de homólogos de las 28 enzimas QQ de la base de datos en cada uno de los 60 metagenomas ensamblados utilizando el programa BLASTp. Al aplicar las condiciones A, se encontraron homólogos para un total de 22 de las 28 enzimas QQ (tabla 29) lo que hace pensar que estas enzimas son relativamente abundantes en los distintos ambientes, tanto de suelo como en la microbiota de invertebrados y en metagenomas de aguas, debido a lo estricto de las citadas condiciones. Entre ellas, la enzima McP, una lactonasa de tipo fosfotriesterasa descrita en *Mycobacterium avium*; QlcA, una lactonasa de la superfamilia de las metalo-beta-lactamasas identificada en un metagenoma; PpH, una lactonasa de tipo fosfotriesterasa descrita en *Mycobacterium tuberculosis*; y QsdA, una lactonasa de tipo fosfotriesterasa descrita en este caso en *Rhodococcus erythropolis*, destacaron por su mayor abundancia al encontrarse 178, 174, 149 y 129 homólogos respectivamente. Al utilizar las condiciones B y C, se identificaron homólogos de la mayoría de las enzimas QQ buscadas, excepto para Bpib04 y Bpib07. En las condiciones tipo B, las enzimas QQ más abundantes coincidieron con las ya mencionadas QsdA, QlcA, PpH y QsdA encontrándose un número de homólogos comprendido entre 301 y 208 (tabla 28). En cuanto a las condiciones C, las enzimas QQ más abundantes fueron las mismas que destacaron en las condiciones A y B: QsdA, PpH, QlcA, PpH y McP; además de la acilasa de la familia de tipo amidasa

descrita a partir de un metagenoma QsdB. Para estas enzimas se encontró un número de homólogos comprendido entre 352 y 484 (tabla 28).

En resumen, en todas las condiciones ensayadas las enzimas de tipo lactonasa McP, QlscA, QsdA y PpH resultaron las más abundantes.

Tabla 28. Abundancia absoluta de homólogos a las 28 enzimas QQ estudiadas en los 60 metagenomas analizados.

Enzima	Condiciones A	Condiciones B	Condiciones C
AiiA	0	2	31
AaC <i>Shewanella</i>	2	7	8
AaC <i>Ralstonia</i>	1	9	68
AhID	19	30	35
AhIK	27	45	85
AhIM	2	4	45
AhID	7	18	30
AidC	0	4	6
AiiM	0	4	44
AiiO	8	26	55
AttM	31	58	90
Bpib01	2	102	170
Bpib04	0	0	0
Bpib05	2	3	6
Bpib07	0	0	0
HacA	1	1	22
HacB	5	9	29
McP	178	287	352
PON	4	8	27
PpH	146	285	360
PvdQ	1	1	21
QlcA	174	288	374
QsdA	129	301	376
QsdB	2	22	484
QsdH	0	209	320
QuiP	11	20	28
Sislac	29	119	236
ssoPox	33	159	285
TOTAL	814	2021	3587

b) Abundancia relativa de enzimas QQ

Para determinar la abundancia relativa de las 28 enzimas QQ en los distintos metagenomas y al mismo tiempo poder comparar entre ellos, se realizó una normalización del número de homólogos siguiendo la metodología descrita previamente, consistente en dividir el número de homólogos por el tamaño del metagenoma.

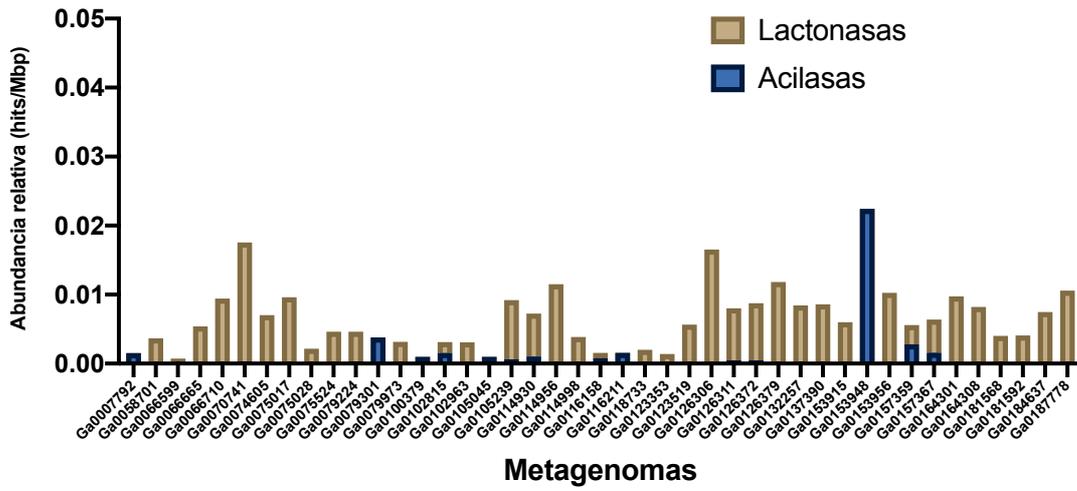
Los resultados, teniendo en cuenta las tres condiciones de homología, se muestran en la figura 44. Al aplicar las condiciones más estrictas (tipo A) se encontraron un total

de 814 homólogos de las enzimas QQ en 43 de los metagenomas, con una abundancia relativa total de 0,006 homólogos/Mbp.

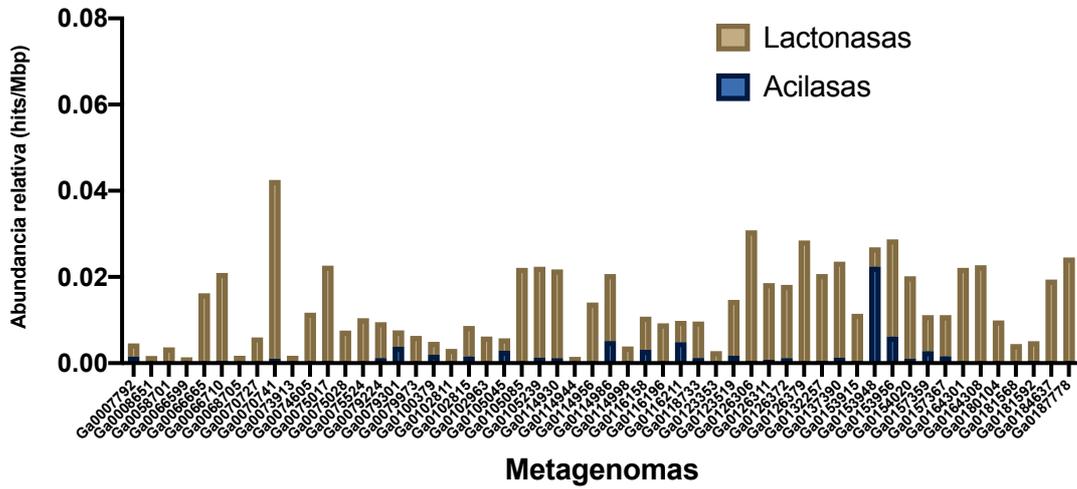
En todas las condiciones ensayadas, destacaron por su abundancia en enzimas QQ los metagenomas pertenecientes a las comunidades microbianas de un suelo superficial (Ga0070741) y las comunidades microbianas de hormigas atinas (Ga0153956 y Ga0153948). En casi todos los casos, las lactonasas fueron más abundantes que las acilasas confirmando lo observado en la abundancia absoluta de enzimas QQ. Como era de esperar, las lactonasas más abundantes fueron las mismas que las indicadas anteriormente en el apartado de abundancia absoluta.

En las condiciones B se seleccionaron homólogos de enzimas QQ en 54 de los metagenomas, con una abundancia relativa media de 0,0134 homólogos/Mbp. Con respecto a las condiciones C, se encontraron homólogos en 57 metagenomas, y su abundancia relativa fue de 0,0233 homólogos/Mbp. Agrupando los metagenomas en función de su origen, la abundancia relativa de enzimas QQ en metagenomas de agua dulce fue de 0,0178 homólogos/Mbp, mientras que en los metagenomas salinos e hipersalinos fue de 0,0143 homólogos/Mbp. Por su parte, la abundancia relativa en metagenomas de suelo fue 0,032 homólogos/Mbp.

Proteínas QQ-Condiciónes A



Proteínas QQ-Condiciónes B



Proteínas QQ-Condiciónes C

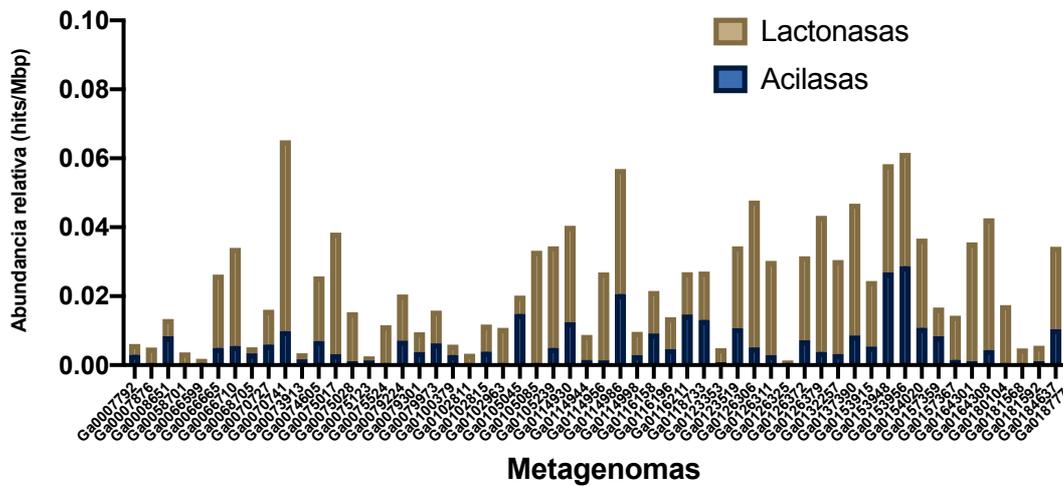


Figura 44. Abundancia relativa de las enzimas QQ en cada uno de los metagenomas estudiados y en las distintas condiciones de homología aplicadas. Solo se muestran los metagenomas en los que se encontraron homólogos.

Los resultados obtenidos de la abundancia relativa en las condiciones C, las menos estrictas, se utilizaron también para representarlos en forma de mapa de calor. Los metagenomas con una abundancia similar tanto de acilasas como de lactonasas se agruparon juntos (figura 45). Así, por ejemplo, los metagenomas de suelo Ga0070741, Ga0137390, Ga0126306, Ga0164308 y Ga0126379 se agruparon juntos, al igual que otros metagenomas con características similares como los metagenomas de agua Ga0007876, Ga0181592 y Ga0181568.

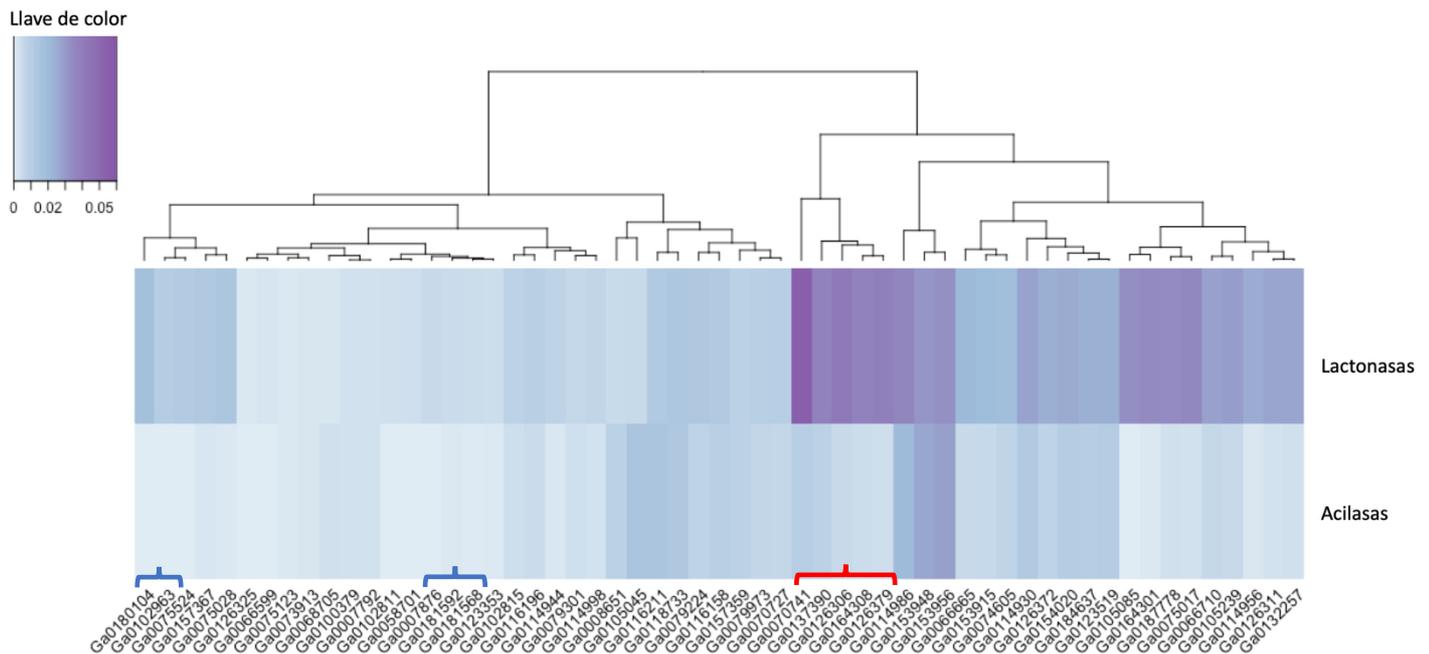


Figura 45. Mapa de calor de la abundancia de proteínas QQ en los distintos metagenomas siguiendo las condiciones de homología C. Los metagenomas acuáticos que agrupan juntos están señalados con color azul, y los de suelo con color rojo.

Las condiciones C, menos estrictas, se utilizaron también para poder discernir si realmente las enzimas QQ eran abundantes o no en los metagenomas analizados y se procedió a comparar la abundancia relativa de las mismas con la abundancia relativa de otras proteínas. Para ello, se eligieron proteínas codificadas por genes con una elevada tasa de transferencia horizontal (como las codificadas por el operón de la ureasa *UreC*, *UreB* y *UreA* de *Bacillus velezensis*, y *NtpC*, *NtpB* y *NtpA*, que constituyen la ATP-sintasa de *Streptococcus pyogenes*) y proteínas de resistencia a antibióticos, como el determinante de la resistencia a tetraciclinas *TetB*, de *Escherichia coli*, o la metilasa *ArmA* del gen ARNr 16S de *Klebsiella pneumoniae*. Estas proteínas tienen homólogos en muchos organismos y se conoce su importante abundancia relativa en los distintos ambientes, así como su elevada capacidad de sufrir fenómenos de transferencia de genes. Además, la comparativa con los operones con elevada tasa de transferencia horizontal de genes nos permitirían determinar si ese proceso es propio también de las enzimas QQ.

Esta comparativa se llevó a cabo con las condiciones C, en las que se obtuvieron un mayor número de homólogos al ser las condiciones menos estrictas. Los resultados

se muestran en la figura 46. Si bien las proteínas correspondientes a los genes con elevada tasa de transferencia horizontal de genes tenían una mayor abundancia relativa en la mayoría de los metagenomas estudiados, las enzimas QQ fueron aproximadamente igual de abundantes que las proteínas de resistencia a antibióticos, e incluso en algunos de los metagenomas las enzimas QQ fueron las más abundantes.

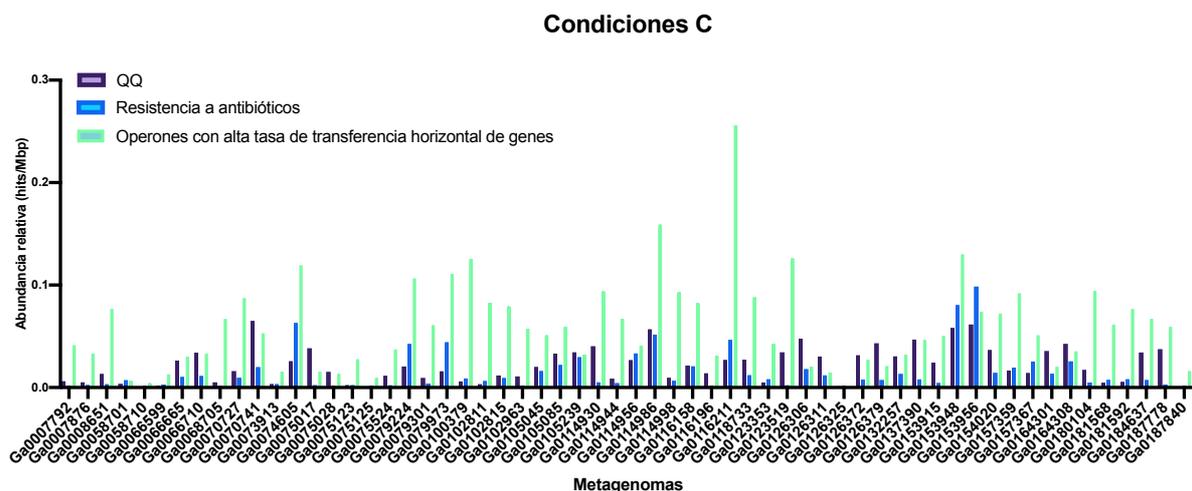


Figura 46. Abundancia relativa en las condiciones de homología menos estrictas de las enzimas QQ y de otras proteínas con elevada tasa de transferencia horizontal de genes y proteínas de resistencia a antibióticos.

c) Asignación taxonómica

Dado que en las condiciones C se seleccionaron mayor número de homólogos de enzimas QQ, éstas se utilizaron para identificar a qué grupo taxonómico pertenecía cada uno de ellos. Para ello, se siguió la metodología descrita en el apartado Material y Métodos. Tras asignar un grupo taxonómico a cada uno de los homólogos de enzimas QQ, se calculó el porcentaje de representación de cada uno de los taxones respecto al total de homólogos seleccionados en dichas condiciones (figura 47). Debido a la estricta metodología de asignación taxonómica, que solo permite asignar un grupo taxonómico a un homólogo si el mismo está representado en más del 30% de los ORF del *scaffold* al que pertenece el homólogo y a la robustez de la misma, la mayoría de los homólogos no pudieron ser asignados a un taxón concreto. Algunos de ellos sí pudieron ser identificados y destaca la gran proporción de homólogos que fueron asignados a los grupos *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Alphaproteobacteria*. En este trabajo es la primera vez que se sigue un protocolo de asignación taxonómica de enzimas QQ en el que se tienen en cuenta todos los ORF de un *scaffold* para la misma, lo que aporta una gran fiabilidad al proceso de asignación taxonómica y asegura que la asignación sea correcta

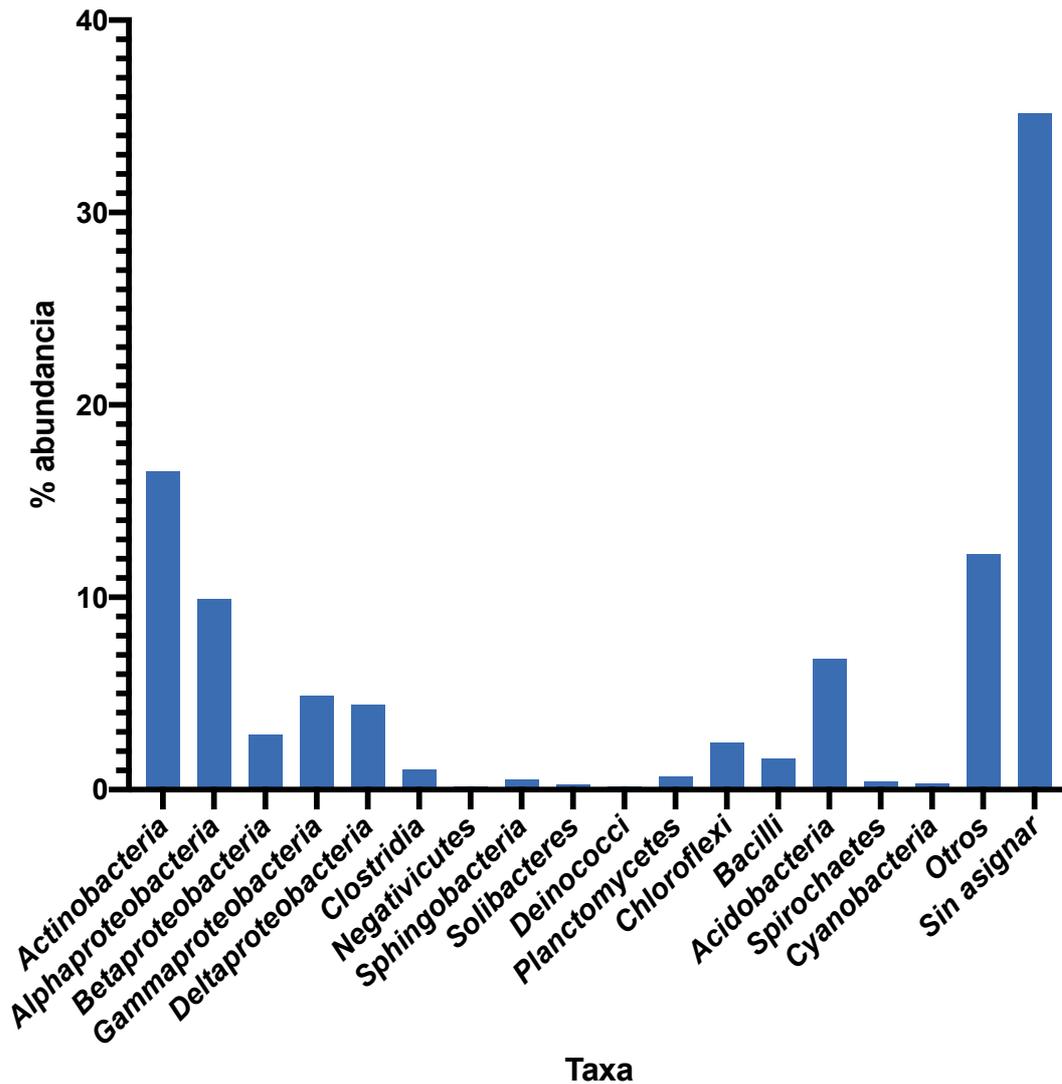


Figura 47. Asignación taxonómica de los homólogos de proteínas QQ en las condiciones C. Se representa el porcentaje de abundancia de cada uno de los taxones respecto al total de homólogos obtenidos.

d) Determinación de la filogenia de los homólogos

Tras realizar la asignación taxonómica, el siguiente paso en la investigación de la abundancia de las enzimas QQ en los distintos metagenomas estudiados fue construir árboles filogenéticos para algunas de las enzimas QQ de la base de datos y los homólogos a las mismas, seleccionados en cada una de las condiciones. Se seleccionaron las enzimas PvdQ y QuiP de la base de datos como ejemplos de acilasas, ya que estas enzimas habían mostrado gran homología a las enzimas encontradas en las cepas objeto de estudio de este trabajo (en capítulos anteriores) y AttM como ejemplo de enzima de tipo lactonasa.

El análisis se realizó para conocer las relaciones filogenéticas entre cada una de las enzimas QQ y sus respectivos homólogos y, además, mostrar su asignación taxonómica para determinar así su posible origen evolutivo. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron todas las condiciones de homología, para

comprobar si alguna de las condiciones aplicada era poco estricta, es decir, si los grupos filogenéticos de homólogos aparecían muy alejados de la enzima QQ de la base de datos utilizada.

En cada uno de los análisis filogenéticos, las secuencias de aminoácidos de cada uno de los homólogos se alinearon mediante el programa MAFFT, incluyendo en cada caso la secuencia de la enzima QQ de la base de datos seleccionada para el análisis genómico. Una vez que se limpiaron las secuencias y se eliminaron las zonas de baja calidad de alineamiento mediante el programa BMGE, se construyeron los árboles filogenéticos utilizando el programa FastTree.

La enzima QuiP de *P. aeruginosa* estaba representada en los metagenomas al aplicar las 3 condiciones A, B y C en un total del 11, 20 y 28 homólogos respectivamente (tabla 29). En el análisis filogenético correspondiente de acilasa QuiP, con las tres condiciones A, B y C (figura 48) se observa que, en todos los casos, los homólogos seleccionados tienen una distancia filogenética corta con la proteína QuiP.



Figura 48. Árboles filogenéticos de los homólogos a QuiP seleccionados en las condiciones A (11 homólogos), B (20 homólogos). En los casos se indica en color rojo la proteína QuiP. También se indica la asignación taxonómica del homólogo.

Tal y como se observa en la figura anterior, en las condiciones más estrictas casi todos los homólogos pertenecen al mismo taxón que la proteína QuiP (*Gammaproteobacteria*). Al rebajar la severidad de las condiciones de homología, en las condiciones B y C, aunque la mayoría de los homólogos tienen homología con la clase *Gammaproteobacteria*, aparecen nuevos homólogos que pertenecen a otros taxones, incluso más alejados filogenéticamente. Por ejemplo, con las condiciones C aparecen homólogos que han sido asignados a *Bacilli* o incluso *Spirochaetes*. No obstante, a pesar de estas diferencias, las distancias filogenéticas siguen siendo cortas. Para la comprobación de que efectivamente estos homólogos probablemente tenían actividad QQ, se realizó un alineamiento múltiple entre el homólogo más lejano de las condiciones C (IcII Ga0154020_100033138), asignado a *Spirochaetes*, el homólogo más cercano (IcII Ga0116211_10093894) seleccionado con las mismas condiciones y asignado a *Gammaproteobacteria* y la proteína QuiP. El alineamiento se muestra en la figura 49 y demuestra que los homólogos tienen una alta homología con la proteína QuiP y que, aún perteneciendo a taxones filogenéticamente lejanos, las proteínas homólogas a QuiP muestran un elevado grado de conservación.

```

QuiP      1  NVSIRRNALGMPLIETGTFHDALFFALGVVHAGSDRLSQMVSLRLLAOGRLAEMVGPGGALEEI
IcII Ga0154020_100033138 1  DVEIRRDAYGVPHTKAONLDDMAFGCAGFAMAADRGFOMEFLRRMAAVGRLSELAGDETLGV
IcII Ga0116211_10093894  1  SASVRRNALGMPLIESGGTFHDALFTLGVVHAGGDRLSQMVGMRLLAOGRLAEMAGPGVLLEM

QuiP      6 1  DRFMRTVNLRASPRLORFFEVYARGVNAYLYPMDLAQSGYRPEYWKPEDSALVFEALLNFG
IcII Ga0154020_100033138 6 1  DVMRSLGIALDPKLQRMRLRSYAAGVNAQRKMLSVTAAGIOVEEWKPEDSLALYOLFSSL
IcII Ga0116211_10093894  6 1  DRFMRAVNLKASPRLKRFFEVYARGVNAYMFPMDLABAGYRPEYWKPEDSVLLLFLCLLNFG

QuiP      1 2 1  LAVNLQEEFASLTTLAOKVGSDKLAWLTPTYPDENLPPDEAEKLKGLRLLGVAASNNWAIAP
IcII Ga0154020_100033138 1 2 1  LATNHIEEVAFLKFAKLEGLERAAWLFPIYDGEPLPFEQANHLKDIDPSLPPASNNWVVIAAR
IcII Ga0116211_10093894  1 2 1  LSVNLQEEVAALTLAQRVGADKLPWLLPIYPDEPLPFAEAEKLAGLDLGVAAASNNWAIAP

QuiP      1 8 1  QRSRSGKSLMANDTHLPLSMPSVWVNYVOIRSPKQAAGVSLAGLPGVVAGFNGKLAWGMTM
IcII Ga0154020_100033138 1 8 1  GKTNGKTLLANDTHLQMTVPAMWYMMMNLECPERAAGVALPGTVVALGTNGVIAWGATM
IcII Ga0116211_10093894  1 8 1  QRTRGKSLLANDTHLPLAMPSLWNFVQIRSPKQAAGVSLAGVPAVVAGVNGKLAWGMTM

QuiP      2 4 1  VLGDNQDIFLEQLRREQGNRLYLYLADGKWQTRERQETFFIKGQRPIRHETRHGPLLNSAL
IcII Ga0154020_100033138 2 4 1  VMADNQDIFLEQLRREQGGTQYLYKGKWENADVVSETGIRGGKSHSIRTRHGVLLNEAF
IcII Ga0116211_10093894  2 4 1  VMGDNQDIYLERIRREGSRLMYEADGKWLEVTERQETFFIKGQRPIRFETRHGVLLNSVL

QuiP      3 0 1  GYGLAYRSIADKTLDGFFDLSRAKTIEOAFDATREIRAMPLNIVFADEHIGVQVTGRYPN
IcII Ga0154020_100033138 3 0 1  DYGLAYKTRETTLAGIFEMAAAADMKTARAALDKVTGIYLNVVADENIGWLATGKYPV
IcII Ga0116211_10093894  3 0 1  GYGLALKTTRDOSLDAFFFDLSRAQSVDAAFEVAREIRAMPLNIVFADAHIGVQVTGRYPN

QuiP      3 6 1  RKEGRLLPSPGWDGRYDWDGYADILHPSQDPOGGWLGTANHRTVQPGYGQLSNSWYYPE
IcII Ga0154020_100033138 3 6 1  RNGVNGLEFRIGWTGEDDWDGYHSENPALNPKEGVATANHKVWNEESEWSSWYGGD
IcII Ga0116211_10093894  3 6 1  RRDGRLLPSPGWDRYTWDGFADMLHPYQDPPOGWLGTANERSVPPGYGQLSSWYYPE

QuiP      4 2 1  RAERIAORMOYDOTSLFVAKLOAMFDPLRQAIDALRAREAYDRLAFDGKLTSSSDAALYG
IcII Ga0154020_100033138 4 2 1  RADRAKERFQADTLSNTAKRTRDLLFELTQLIEQLRAQEALKILDFDGNLGDSAAAVYE
IcII Ga0116211_10093894  4 2 1  RAERIAEAMOYDOTSFFVAKLOAMLNPLRQAIAALRADEALKRLAFDGKLASSDAAIYG

QuiP      4 8 1  AFLHAROIFLDELGPEDGPAWKAFVSYSAQADHLLGRDDSPFWDDTRTKEDKPAILARSL
IcII Ga0154020_100033138 4 8 1  NFVSAILTFADELDGKDSPLWNFQSYNAVQDHLLGRADSPFWDNIQTKETKLIFAAL
IcII Ga0116211_10093894  4 8 1  AFLHAROIFLDELGPEDG-

QuiP      5 4 1  AAAVEFCEQRLGSERAWQWGKLHTYEDSSKMARGPYPAGGDHTTLLDVSAYWQDFDTWLI
IcII Ga0154020_100033138 5 4 1  AAAIRLCEKEMGTNREWKWGSLKKYYEFTKRARGPVAAGGDLHLLLNOAGNWGDNHDVWLI
IcII Ga0116211_10093894  5 4 1  -----

QuiP      6 0 1  PAMRLIVDFGQSEPMIGVNSGQSGNPASAWLKGRVSFFQRLTTP
IcII Ga0154020_100033138 6 0 1  PAMRFIVDFSADEPAQLIVMGVSGNPESLFTNVKHPLELKKFVLKK
IcII Ga0116211_10093894  6 0 1  -----

```

Figura 49. Alineamiento múltiple de las secuencias de QuiP y las proteínas IcII Ga0154020_100033138 y IcII Ga0116211_10093894, los homólogos seleccionados con las condiciones C más lejanos y cercanos, respectivamente, a QuiP.

En la búsqueda de homólogos de la proteína PvdQ de *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró solo 1 homólogo en las condiciones A y B, mientras que 21 homólogos se encontraron con las condiciones C. Por ello, se realizó un árbol filogenético a partir de las 21 secuencias de aminoácidos de los diferentes homólogos y la secuencia de la proteína PvdQ. En la figura 50 se observa cómo la mayoría de los homólogos pertenecen al filo *Proteobacteria*, y, los homólogos agrupados y más cercanos a la proteína PvdQ pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*, la misma en la que se incluye el género *Pseudomonas*. Sin embargo, al ir alejándonos de la proteína PvdQ aparecen otras clases distintas, principalmente pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*.

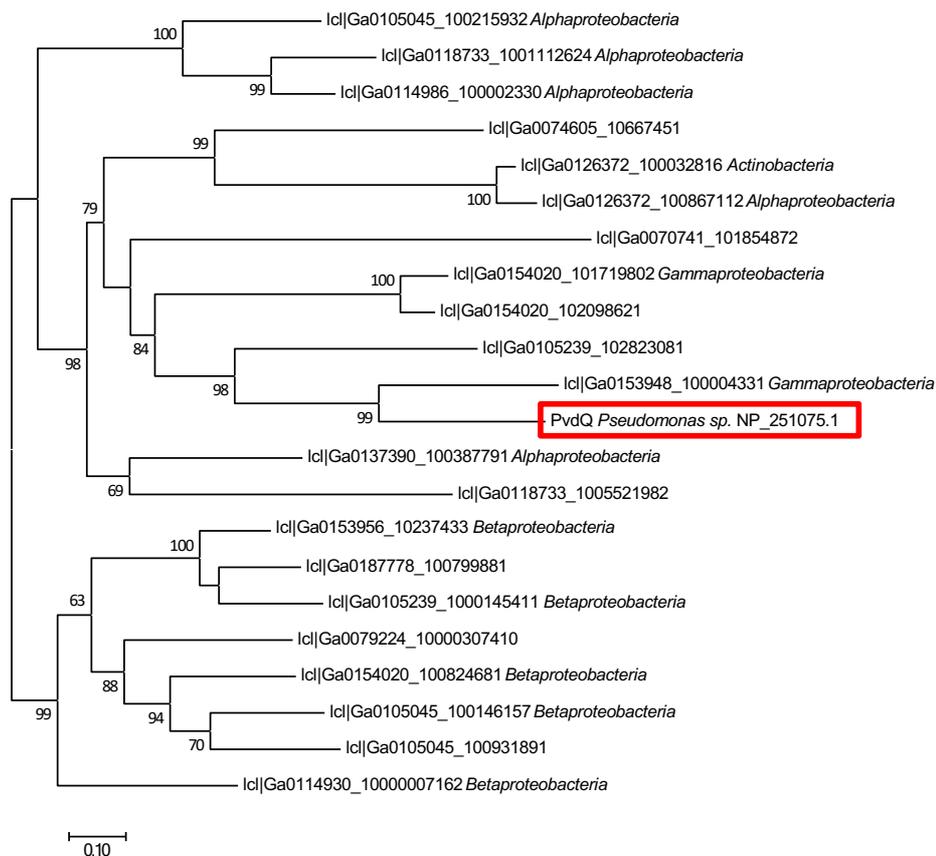


Figura 50. Árbol filogenético de los homólogos a PvdQ seleccionados en las condiciones C. Se indica en color rojo la proteína PvdQ y, además, al lado de cada proteína homóloga se muestra la asignación taxonómica del homólogo.

Del mismo modo que para la proteína QuiP, se muestra en la figura 51 el alineamiento entre la proteína PvdQ original y el homólogo más cercano Icl|Ga0153948_100004331, asignado a una *Gammaproteobacteria* y el más lejano Icl|Ga0114930_10000007162, asignado a *Betaproteobacteria*.

```

PvdQ          1  RGSNAI AVGSERSADGKGMLLANPHFPWNGAMRFYQMHLTIPGRLDVVGASLPLPVVNI
IcII Ga0153948_100004331 1  RGSNAVAVGSERSFNCRGMLLANPHFPWVGCAMRFYQMHLTIPGKLDVVGAAALPGLPMINI
IcII Ga0114930_1000000716 1  IGSNGWAFGAAATDNGHGALLGNPHFPWTTNRFYQVHLTVPGKLDVVGASIAAFPVVSI

PvdQ          61  GFSRHLAWHTHTVDTSSHFHTLYRLALDPKDPFRYLVDGRSVAIEVREHKVYQSIYVGPLVWV
IcII Ga0153948_100004331 61  GFNOHLAWHTHTVDTSSHFHTLYRLALDPKDPFRYLVDGRSVAIEVREHKVYQSIYVGPLVWV
IcII Ga0114930_1000000716 61  GFNRDVAWHTHTVDTGRRFTLFEELKLAEGDPTTYLVDGCTVAFDVKTHTFYSFEVGPVLSM

PvdQ          121  GKLDWNEAYALRDANLENTRVQOWYSINOASDVADLRRRVEQGI PVVNTLAAD EOGNALY
IcII Ga0153948_100004331 121  GKLDWDYAYSILRDANLDNDRVTVQYAMNQASSLKDLOVSVHQGI PVVNTLAAD EOGNALY
IcII Ga0114930_1000000716 121  GMPWTKAYALRDANRNNTSRDTEWLHIAQAKDVAGTRQAI GLGIPVNTLAAD EOGNALY

PvdQ          181  MNQSVVPYVKPELIPACAI EGPALQGD SRCAWSRDPAAAQAGITP ALRDFVONSND
IcII Ga0153948_100004331 181  MNL SVVPNVSADKLAKCSDLQMVLDGSSNSACAWDIDPAAAQKGIYALRDFVONSND
IcII Ga0114930_1000000716 181  ADVSTTPDVS AETLKR CAPVGLVLDGSR SACNWDVDEDPVPEVAPERDFVANSND

PvdQ          241  AWTNPAFSPPLVSOIGPRARVALSVTANHFVSADQVLPDLLRLCRRACAALAO WDRGAGF
IcII Ga0153948_100004331 241  AWTANPAFSPPLISQGLRARFALEVMDDN VYLA TQVLPDLLKFCAPV CVSLKGDGRAGL
IcII Ga0114930_1000000716 241  SWLTNPAFSPVMGSRRLRTRIGLIFR DANLAGHLVADLLFA CKDCAAL T VWNRTSAE

PvdQ          301  VYFORFMGAWKEFFDAQRPLDTPQGI VROALADAAA E V E KSGIPD GARWGDLOVRIAIPG
IcII Ga0153948_100004331 301  VHFONIMD VWRVPDFKDPQHTPRGLLR EALLASAA T AQKMG LKPE TRWGD IQVOTAIHG
IcII Ga0114930_1000000716 301  HLFREFVHVVAVDFNFBADPIDTPRGLVFRALKDAVGA VRTAGFALDARLGTQALIAIHG

PvdQ          361  GDHFGVYNAGGTSYIQLVTFPEEGPKARGLLAFSOSSDP
IcII Ga0153948_100004331 361  GPTLGIYNASGTSYIQVVTFFDKGPHAQGLLAFSLSSDP
IcII Ga0114930_1000000716 361  GEYEGVLNKF GTSYIQVVTFFDSQGPVADALLTYGESTDA

```

Figura 51. Alineamiento múltiple de las secuencias de PvdQ y las proteínas IcII Ga0153948_100004331 y IcII Ga0114930_10000007162, los homólogos seleccionados con las condiciones C más lejanos y cercanos, respectivamente, a PvdQ.

Como ejemplo de la distribución filogenética de homólogos a una lactonasa en los metagenomas analizados, se utilizó la lactonasa AttM de *Agrobacterium tumefaciens*, miembro de la clase *Alphaproteobacteria*. En la figura 52 se muestra el árbol filogenético de los 90 homólogos obtenidos con las condiciones C de dicha proteína. En el mismo, se observa cómo los homólogos más cercanos a AttM, de nuevo vuelven a ser los que se asignan a la misma clase taxonómica, o en su defecto, a una clase perteneciente al mismo filo que AttM. No obstante, hay otros miembros de *Alphaproteobacteria* que aparecen en otros grupos del árbol, junto a homólogos asignados a otros taxones, aunque en general los homólogos asignados al mismo taxón están cercanos, como por ejemplo los homólogos pertenecientes a la clase *Actinobacteria*, que aparecen cercanos en un mismo clúster. Es destacable que incluso aparece un homólogo asignado a un *Candidatus* de una arquea.

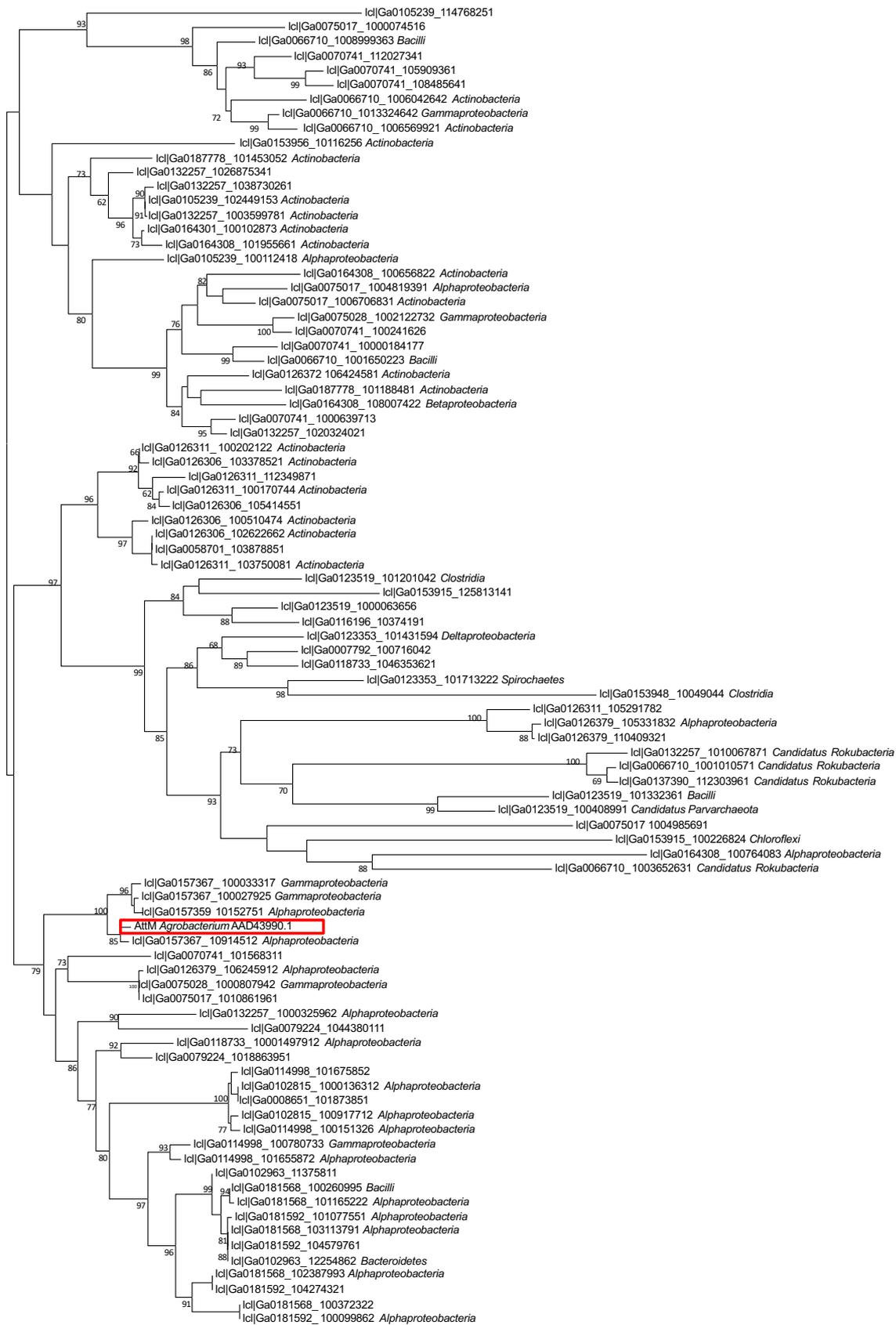


Figura 52. Árbol filogenético de los homólogos a AttM seleccionados en las condiciones C. Se indica en color rojo la proteína AttM y, al lado de cada proteína homóloga, se muestra la asignación taxonómica del homólogo.

Tal y como se realizó con las proteínas QuiP y PvdQ, se hizo un alineamiento múltiple utilizando en este caso la proteína AttM y las proteínas lejanas filogenéticamente IcllGa0132257_1010067871 (asignada a *Candidatus rokubacteria*), IcllGa0153915_100226824 (asignada al filo *Chloroflexi*) y IcllGa0123519_100408991 (asignada a *Candidatus parvarchaeota*) y la proteína más cercana IcllGa0157367_10914512 (asignada a *Alphaproteobacteria*). El resultado del alineamiento (figura 53) muestra que las tres proteínas homólogas de AttM comparten el dominio HXHXDH-H-D, necesario para la actividad QQ (Dong et al., 2018).

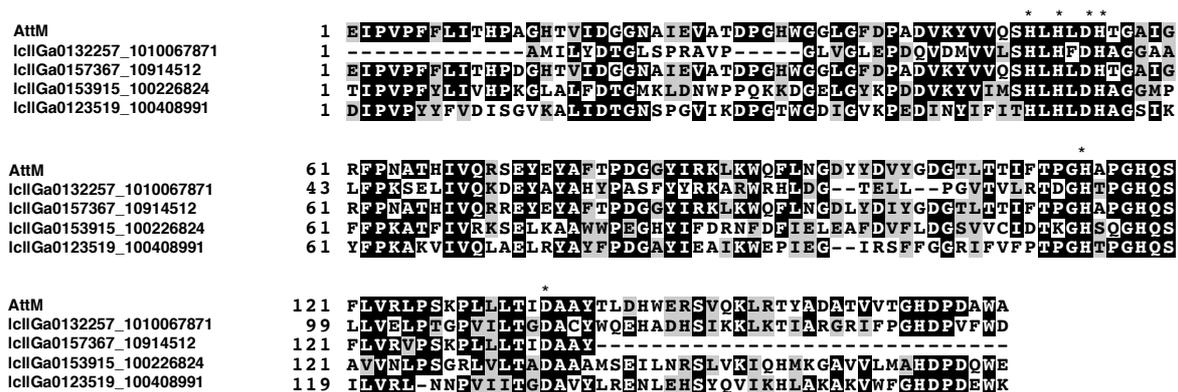


Figura 53. Alineamiento múltiple de las secuencias de QuiP y las proteínas IcllGa0132257_1010067871, IcllGa0157367_10914512, IcllGa0153915_100226824 y IcllGa0123519_100408991. Los dominios conservados necesarios para la actividad lactonasa están indicados con asteriscos.

4.3.3. Discusión

En los capítulos anteriores de esta tesis doctoral se ha descrito la búsqueda de sistemas de interferencia de QS mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos utilizando métodos clásicos. En el presente capítulo se utilizan métodos bioinformáticos para, aprovechando la gran cantidad de metagenomas disponibles que representan los más diversos ambientes, identificar la abundancia relativa de los mecanismos QQ y sus relaciones filogenéticas. Existen algunos trabajos anteriores como publicados por Muras y colaboradores (2018) y Romero y colaboradores (2012) que determinan la presencia de enzimas QQ en metagenomas marinos. Sin embargo, en este trabajo se analiza por primera vez la abundancia de QQ en 60 metagenomas de un origen muy diverso.

En trabajos anteriores en los que se analizaba la presencia de sistemas QS o QQ en distintos metagenomas (Barriuso y Martínez, 2018; Muras et al., 2018; Romero et al., 2012), se seleccionan los homólogos en base a distintos criterios de homología. Romero y colaboradores (2012) utilizaron como criterio que existiese un mínimo de homología del 50% en el 70% de la secuencia. Por su parte, Muras y colaboradores (2018) establecieron como criterio un 50% de identidad en el 50% de la secuencia, mientras que los investigadores Barriuso y Martínez (2018) aplicaron un límite basado en el parámetro *e-value*, concretamente un punto de corte para seleccionar

homólogos de 1×10^{-10} . En el presente trabajo hemos utilizado condiciones parecidas a las descritas por estos investigadores (denominadas condiciones C) y otras mucho más estrictas (condiciones A y B). En estas condiciones se aplicaron como criterios homologías del 45%, 40% y 38% para las condiciones A, B y C, respectivamente. También, se exigió que la longitud del homólogo se mantuviera superior al 90%, 75% y 70%, respectivamente, con respecto a las secuencias de las proteínas QQ de las bases de datos, para evitar seleccionar homólogos con una elevada homología en zonas concretas de las proteínas, pero que, sin embargo, tuvieran una corta longitud. En todos los casos, incluso con las condiciones más estrictas, aparecieron homólogos muy similares a las proteínas QQ de la base de datos utilizada para la búsqueda de homólogos. Además, para comparar los datos obtenidos en nuestro trabajo con los descritos anteriormente, hemos realizado la misma normalización de la abundancia descrita (en base al tamaño de los metagenomas) y los datos son consecuentes con los obtenidos por otros investigadores, ateniéndonos a las condiciones C. Por ejemplo, en las condiciones C, la media de abundancia relativa de enzimas QQ, combinando acilasas y lactonasas, fue de 0,023 homólogos/Mbp, valor inferior al encontrado por Romero y colaboradores en los metagenomas de muestras del Océano Global (GOS) (0,053 homólogos/Mbp). Otros estudios realizados mediante técnicas de construcción de librerías metagenómicas procedentes de suelos y de suelos hipersalinos mostraron una abundancia relativa de enzimas QQ de entre 0,0001 a 0,00033 homólogos/Mbp (Riaz et al., 2008; Torres et al., 2017). No obstante, al analizar estos datos hay que tener en cuenta que la abundancia relativa puede variar en función de si el origen del metagenoma es de suelo, marino, de agua dulce o de cualquier otro ambiente. Por ejemplo, en nuestro estudio la abundancia relativa de enzimas QQ fue similar en los ambientes de agua dulce y en los ambientes salinos e hipersalinos, pero fue mucho mayor en los metagenomas de suelo.

En lo que se refiere al tipo de enzima QQ, nuestros datos demuestran que en general, teniendo en cuenta los 60 metagenomas analizados, las lactonasas fueron más abundantes que las acilasas en la mayoría de ellos. Este es un resultado esperado, ya que en general se reconoce a las lactonasas como las enzimas QQ más abundantes (Grandclément et al., 2016; Romero et al., 2015). Por ejemplo, en los metagenomas cuyo origen es el suelo, como Ga0070741, Ga0105239, Ga0164301, Ga0164308, Ga0126372, Ga0126379, Ga0126306, Ga0126311, Ga0066665 y Ga0066710 encontramos que la abundancia de lactonasas superan considerablemente a la de acilasas, tal y como se ha descrito en otros trabajos con anterioridad (Romero et al., 2012).

Por otro lado, las acilasas se consideran normalmente más abundantes en ambientes acuáticos, salinos y marinos (Muras et al., 2018; Romero et al., 2012; Schipper et al., 2009). En nuestro trabajo, la presencia de acilasas fue mayor en ciertos metagenomas correspondientes a un tapete microbiano de un lago de la Antártida (Ga0105045), una fuente termal en Sudáfrica (Ga0116211), un lago de agua dulce (Ga0007792) y en las comunidades de un tapete microbiano de Yellowstone (Ga0068705). No obstante, al contrario de lo que podría ser esperado, no en todos los ambientes salinos predominaron las enzimas de tipo acilasa. Por ejemplo, en los metagenomas Ga0074605 y Ga0079973, ambos procedentes de tapetes hipersalinos en la Antártida, las acilasas fueron menos abundantes que las lactonasas. Lo mismo

ocurrió con el metagenoma Ga0114998, del Océano Ártico, en el que de nuevo fueron más abundantes las lactonasa.

Una vez que se había determinado la abundancia relativa de acilasas y lactonasa en cada metagenoma, se realizó una representación gráfica en forma de mapa de calor para visualizar cómo se distribuían y agrupaban los metagenomas en función de la presencia en los mismos de enzimas QQ. En el mapa de calor de la figura 45 se puede observar cómo los metagenomas en los que la abundancia de lactonasa es mayor se agrupan juntos. En otros metagenomas, como Ga0153956 y Ga0153948 (ambos pertenecientes a las comunidades microbianas de hormigas atinas en jardines fúngicos), las acilasas fueron muy abundantes, y aparecieron agrupados formando un cluster. También se agrupa el metagenoma Ga0070741 (en el que más enzimas QQ se encontraron) junto con otros metagenomas de suelo como Ga0137390, Ga0126306, Ga0164308 y Ga0126379, que mostraron tener gran cantidad de enzimas de tipo lactonasa. Hay que destacar que hay tendencias de ciertos metagenomas con características similares a agruparse juntos: por ejemplo, metagenomas de agua como Ga01080104 y Ga0102963 quedan juntos; al igual que Ga0007876, Ga0181592 y Ga0181568. No obstante, hay metagenomas de distintos orígenes con una cantidad de homólogos de enzimas QQ similar y que agrupan juntos en el mapa de calor.

Respecto a la abundancia relativa de los homólogos de enzimas QQ, los resultados obtenidos indican que en muchos de los metagenomas analizados, éstos alcanzan valores similares a las proteínas de resistencia a antibióticos, demostrando así su elevada abundancia en los diferentes ambientes analizados. En algunos metagenomas obtenidos de muestras de suelo como Ga0164301 o Ga0164308, la prevalencia de enzimas QQ es incluso mayor que la de proteínas correspondientes a operones con una elevada tasa de transferencia horizontal de genes. Estos datos coinciden con la elevada abundancia relativa de las enzimas QQ encontrada en los metagenomas analizados en estudios previos, en los que como referencia se usaron otras proteínas de los que se conocía su elevada presencia en los distintos ambientes, generalmente proteínas relacionadas con el metabolismo (Muras et al., 2018; Romero et al., 2012).

Para completar el análisis de la abundancia de enzimas QQ en los múltiples ambientes estudiados, se realizó una asignación taxonómica utilizando nuestro propio protocolo, descrito en la figura 10 del apartado 3.11.3 de Material y Métodos. Esta aproximación taxonómica no se ha llevado a cabo en este sentido en los estudios de metagenomas descritos hasta el momento. En el caso de los estudios de abundancia relativa de sistemas QS en metagenomas, los investigadores Barriuso y Martínez si realizaron una asignación taxonómica (Barriuso y Martínez, 2018). Sin embargo, dicha asignación fue deducida del resultado utilizar el programa BLAST de cada homólogo y de su distribución en el árbol filogenético; sin tener en cuenta en qué *scaffold* se encontraba cada homólogo.

En este trabajo, gracias a nuestro protocolo, se ha asignado un taxón a cada uno de los homólogos de enzimas QQ teniendo en cuenta la totalidad del *scaffold* en el que se encontraba dicho homólogo, aumentando por tanto la robustez del análisis. Los

resultados obtenidos demuestran que la mayor parte de las enzimas QQ se asignaron a los taxa *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Acidobacteria*. En los últimos años las actinobacterias han empezado a ser estudiadas por su actividad QQ, debido en parte a su enorme capacidad de producir metabolitos secundarios (Polkade et al., 2016). Las actinobacterias son bacterias gram positivas, cuyas moléculas señal autoinductoras son diferentes de las AHLs. Sin embargo, su capacidad de degradar AHLs es muy reconocida y actualmente se han descrito numerosas especies de este grupo con actividad QQ (Chankhamhaengdech et al., 2013; Devaraj et al., 2017; Fukumoto et al., 2016; Polkade et al., 2016; Romero et al., 2011; Uroz et al., 2008).

Respecto a los miembros de la clase *Alphaproteobacteria*, se ha descrito su actividad QQ en un estudio realizado a aislados marinos, en los que este grupo resultó ser el más activo (Romero et al., 2011). En otro estudio similar se observó que en la microbiota de *Posidonia* sp., la mayoría de las cepas con actividad QQ pertenecían a esta clase (Blanchet et al., 2017). Curiosamente, los investigadores Barriuso y Martínez asignaron una gran proporción de homólogos de proteínas QS a los miembros de la clase *Alphaproteobacteria* (Barriuso y Martínez, 2018). Estos datos, junto con nuestros resultados, refuerzan la importancia de los sistemas QS y de su inhibición en este grupo de bacterias.

En cuanto a los miembros del filo *Acidobacteria* hay que tener en cuenta que constituyen uno de los grupos más abundantes en la naturaleza, y, sin embargo, es uno de los menos estudiados (Kielak et al., 2016). Los estudios de biodiversidad realizados mediante análisis metagenómico de diferentes ambientes han permitido demostrar que este filo está presente en prácticamente todos los hábitats, pero la dificultad para cultivarlas hace difícil su estudio (Kielak et al., 2016). Respecto a la descripción de actividad QQ en este grupo, únicamente se ha identificado la enzima QlcA, a partir de una librería metagenómica de suelo. Los análisis de los genes del fósido que acompañaban al gen *qlcA* determinaron que esta enzima QQ debía pertenecer a *Acidobacteria* (Riaz et al., 2008).

Por último, se llevó a cabo un análisis filogenético de los múltiples homólogos encontrados para las proteínas QuiP y PvdQ, por su relevancia en la presente tesis doctoral y como ejemplos de acilasas; y de AttM como ejemplo de lactonasas. El objetivo era determinar, una vez asignados los taxones a los que pertenecían cada uno de los homólogos, cómo se distribuían los mismos y su similitud filogenética. En los árboles filogenéticos obtenidos en cada caso se observa cómo los homólogos a cada una de las proteínas se agrupan en función de su grupo taxonómico, al igual que lo observado anteriormente con análogos de QS (Barriuso y Martínez, 2018). Otros autores también encontraron el mismo resultado para los homólogos a LuxI/LuxR. Los homólogos que pertenecían a otras clases estaban filogenéticamente alejados (Nasuno et al., 2012), hipotetizando que probablemente la transmisión horizontal de genes no sea tan frecuente, al contrario de lo que se había dicho con anterioridad (Lerat y Moran, 2004). Los árboles reconstruidos demuestran que los distintos homólogos se agrupan juntos si han sido asignados al mismo taxón, mientras que los homólogos más alejados taxonómicamente conforman otros clados, como se observa en la figura correspondiente al árbol de la lactonasa AttM (figura 52). Sin embargo, como muestran los alineamientos, la homología entre las enzimas QQ

analizadas es muy elevada y mantienen los dominios necesarios para la actividad QQ, lo que indica que estos genes están bastante conservados entre los distintos grupos taxonómicos, incluso apareciendo homólogos de AttM (*Agrobacterium tumefaciens*) asignados a espiroquetas o actinobacterias.

En resumen, en este capítulo se ha demostrado la elevada abundancia de las enzimas QQ en 60 metagenomas de orígenes ambientales muy diversos y se ha realizado una robusta asignación taxonómica de los distintos homólogos encontrados en los metagenomas.

4.4. Caracterización del centro activo de enzimas *quorum quenching*

4.4.1. Resumen/Summary

La enzima *quorum quenching* HqiA fue identificada en un trabajo previo a partir de un metagenoma de un suelo hipersalino. Su purificación demostró que el mecanismo enzimático era de tipo lactonasa. No obstante, la secuencia y estructura predicha de HqiA era diferente a otras lactonasas, por lo que constituyó un nuevo grupo de lactonasas. Además, sus homólogos más cercanos pertenecían al grupo de las isocorismatasas; enzimas que catalizan diversas reacciones, pero de las que no se conocía su capacidad *quorum quenching*. En este capítulo se han identificado los aminoácidos esenciales para la actividad *quorum quenching* de HqiA. Tanto la sustitución D38A como C177A provocaron una pérdida de la actividad lactonasa de HqiA; confirmando que ambos aminoácidos eran esenciales para la misma. Dado que HqiA pertenecía a un grupo de isocorismatasas con una cisteína en la posición 177, se purificó la isocorismatasa homóloga a HqiA producida por *Rhodopirellula baltica*, demostrándose su actividad degradadora de AHLs. Los ensayos cinéticos realizados con HqiA y con la isocorismatasa de *R. baltica* pusieron de manifiesto que ambas enzimas eran más eficaces frente a AHLs de cadena corta, aunque en general, HqiA mostró mayor eficiencia catalítica y afinidad que la isocorismatasa de *R. baltica*. No obstante, ésta última demostró una mayor afinidad y eficiencia frente a C4-HSL. Por último, se ha demostrado que la isocorismatasa PhzD de *Pseudomonas aeruginosa*, que pertenece al grupo de isocorismatasas sin la cisteína en posición 177 no degrada las AHLs. Sin embargo, gracias a las sustituciones Y125A/G155C en su secuencia, PhzD adquirió actividad *quorum quenching*, confirmando la necesidad de dichos aminoácidos para dicha actividad.

The quorum quenching enzyme HqiA had been identified in a previous work from a hypersaline soil metagenome. Its purification, demonstrated that it had a lactonase-type quorum quenching mechanism. However, its predicted sequence and structure was different from the known lactonases. Therefore, it constituted a new group of lactonases. Furthermore, their closest homologues belonged to the group of isochorismatases. These enzymes catalyze several reactions, but their ability to degrade AHL was unknown. The key aminoacids for the quorum quenching activity of HqiA have been identified in this chapter. Both D38A and C177A substitutions caused a loss of the lactonase activity of HqiA; confirming that both aminoacids were essential for this activity. Since HqiA belonged to a group of isochorismatases with a cysteine at position 177, the HqiA homologue isochorismatase produced by *R. baltica*, demonstrating its quorum quenching activity. Kinetic assays performed with HqiA and with *R. baltica* isochorismatase showed that both enzymes were more effective against short-chain AHLs. Nevertheless, HqiA showed higher catalytic efficiency and affinity than *R. baltica* isochorismatase. However, the latter showed greater affinity and catalytic efficiency against C4-HSL. Lastly, the PhzD isochorismatase from *P. aeruginosa*, which belongs to the group of isochorismatases without cysteine in position 177, was unable to degrade AHLs. However, the Y125A/G155C substitutions made PhzD to gain quorum quenching activity, thus confirming the need of such aminoacids for said activity.

4.4.2. Determinación de los aminoácidos esenciales para la actividad *quorum quenching* tipo lactonasa

En trabajos anteriores realizados mediante una colaboración del Grupo BIO 188 con el Dr. Stephane Uroz (Universidad de Nancy, Francia) y el Dr. Rafael Salto (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada), se identificó y purificó la enzima HqiA con actividad QQ a partir del análisis del metagenoma de un suelo hipersalino localizado en Rambla Salada, Murcia. Curiosamente, la secuencia del gen que codificaba esta enzima tenía homología con genes de enzimas con actividad isocorismatasa, un grupo de enzimas del tipo de las hidrolasas en las que no se había demostrado hasta la fecha ninguna relación con actividad QQ. Sin embargo, la secuencia génica de HqiA no presenta homología con otras enzimas QQ de tipo lactonasas, por lo que, estos resultados permitieron descubrir un nuevo grupo de enzimas QQ de tipo lactonasa (Torres et al., 2017).

El hecho de la existencia de enzimas isocorismatasas que no presentan actividad QQ nos llevó a analizar el centro activo de HqiA y determinar el papel de ciertos aminoácidos en la actividad QQ, profundizando así en el conocimiento estructural de dicha enzima. La realización de este capítulo de la tesis doctoral se realizó con la colaboración de los Drs. Rafael Salto y Francisco Javier López-Jaramillo (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada).

a) Búsqueda del centro activo de HqiA

El primer paso en este estudio fue la modelización de la enzima HqiA para conseguir de esta forma identificar cuáles eran los aminoácidos clave del centro activo y, por tanto, los que determinaban la actividad QQ de tipo lactonasa.

Para ello se realizó una primera aproximación, en la que se trató de determinar si en el mismo centro activo del enzima reside tanto la actividad isocorismatasa como la actividad lactonasa. Los restos catalíticos que participan en la síntesis del isocorismato son conocidos y están constituidos por una triada catalítica formada por aspartato 38, lisina 144 y cisteína 177 (siendo la numeración la correspondiente a los restos catalíticos en la secuencia de la proteína HqiA).

Es por ello, por lo que en primer lugar se ha procedido a realizar una mutagénesis sitio específica de estos restos catalíticos. Esta parte del trabajo fue realizada por el Dr. Rafael Salto, que proporcionó el mutante D38A de la enzima HqiA, que fue expresado en *E. coli* XL1-Blue. La actividad de este mutante se comprobó mediante un ensayo de difusión en placa utilizando las AHLs comerciales C10 y C12-HSL. Como control positivo, se utilizó la enzima HqiA sin ninguna mutación, mientras que como control negativo se utilizó LB. Los resultados indicaron que la mutación de D38 provocaba la pérdida de actividad QQ de tipo lactonasa, tal y como se observa en la figura 54.

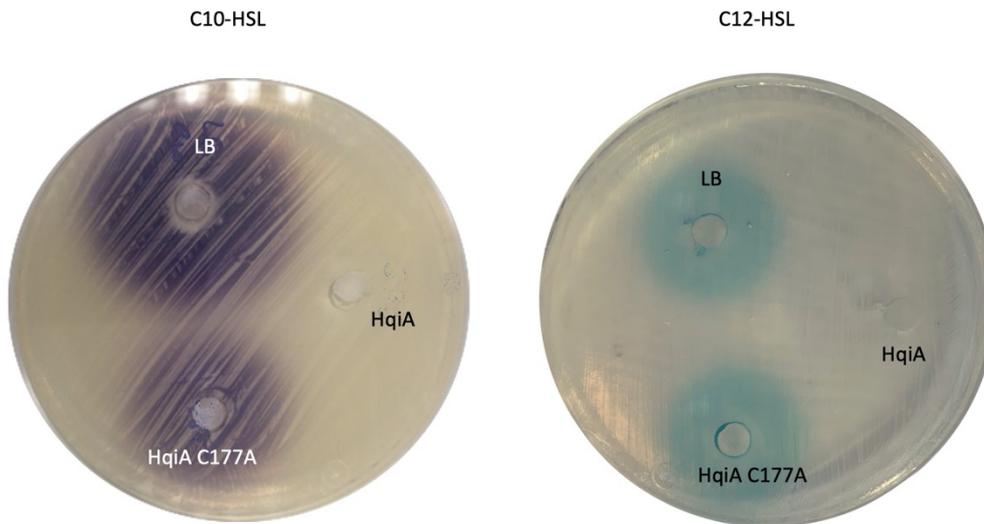


Figura 54. Efectos de la mutación D38A en la enzima HqiA con respecto a la actividad lactonasa. Se realizó un ensayo de difusión en placa con C10 y C12-HSL, que se reveló con *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), respectivamente.

Una segunda posición relevante en la triada catalítica está constituida por la cisteína en posición 177. Por tanto, y siguiendo la misma estrategia, se ha diseñado y expresado el mutante HqiA C177A en *E. coli* XL1-Blue. Los resultados indicaron que la sustitución de C177 provocaba la pérdida parcial de actividad QQ de tipo lactonasa, tal y como se observa en la figura 55.

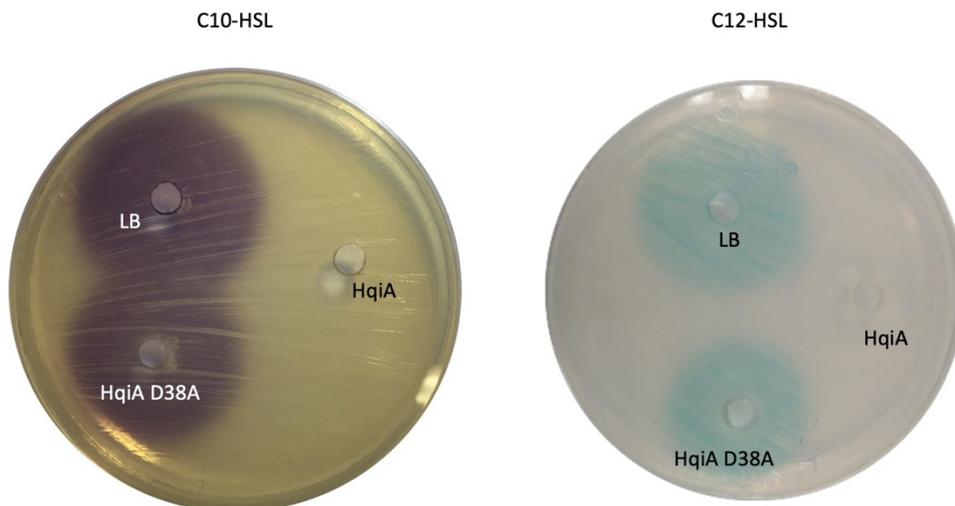


Figura 55. Efectos de la mutación C177A en la enzima HqiA con respecto a la actividad lactonasa. Se realizó un ensayo de difusión en placa con C10 y C12-HSL, que se reveló con *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), respectivamente.

b) Bacterias con actividad isocorismatasa: *Rhodopirelulla baltica* y *Pseudomonas aeruginosa*

Tal y como se ha descrito anteriormente, hasta la fecha, no se ha descrito que ninguna isocorismatasa, más allá de la propia enzima HqiA, tenga actividad QQ. De nuestros resultados mostrados en el apartado anterior se puede intuir que ambas actividades enzimáticas se localizan en el mismo centro activo y dentro del mismo tanto D38 como C177 son esenciales para el mantenimiento de la actividad lactonasa.

Por tanto, se ha realizado un alineamiento múltiple de aquellas secuencias de isocorismatasas que han sido descritas y se ha estudiado cómo estos restos catalíticos se encuentran conservados en la familia. En la figura 56 se muestra un árbol filogenético realizado por el algoritmo neighbor-joining de distintas isocorismatasas, indicando si presentan la cisteína en la posición 177 o no, junto con un grupo de lactonasas con actividad QQ bien descrita, situadas filogenéticamente lejanas a las isocorismatasas.

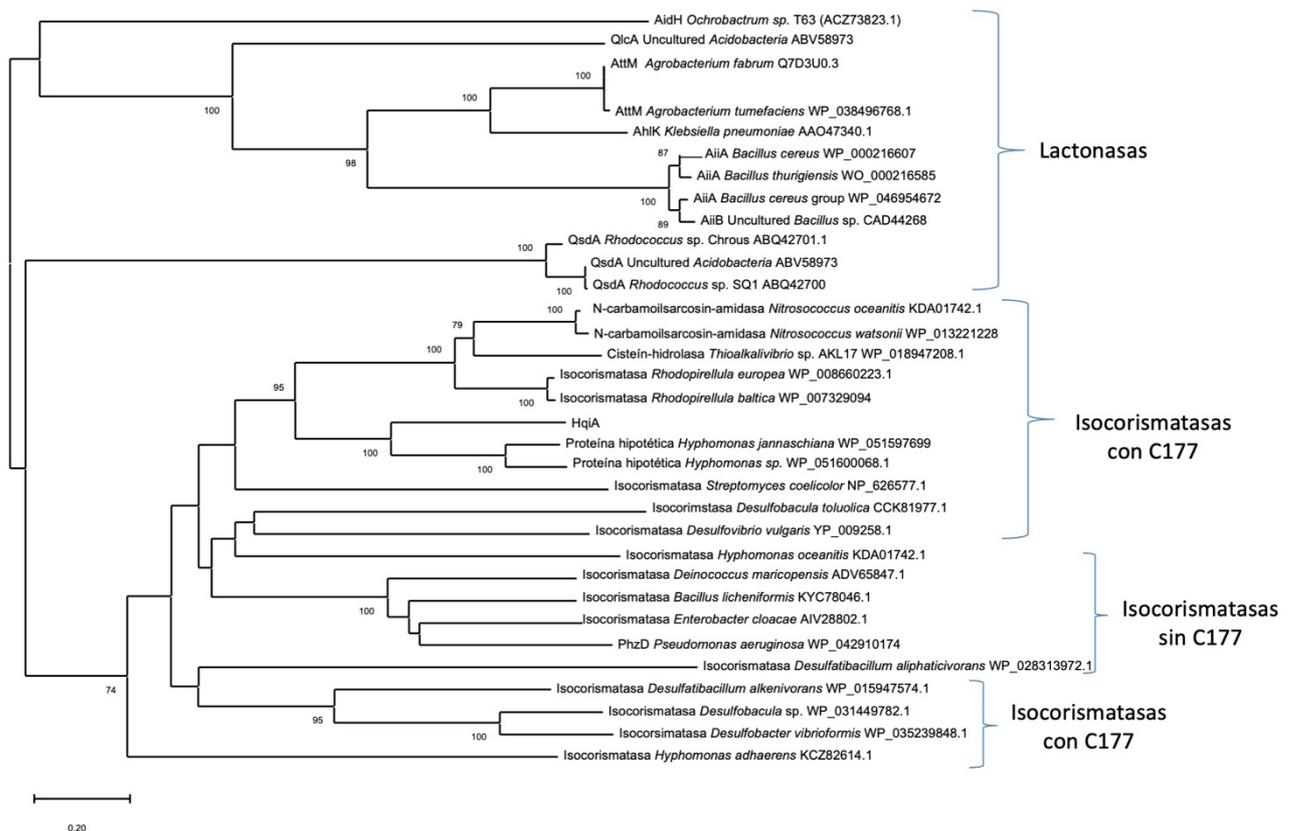


Figura 56. Árbol neighbor-joining de isocorismatasas relacionadas filogenéticamente con HqiA, indicando la presencia de cisteína en la posición 177, junto con un conjunto de lactonasas con actividad QQ.

Puede observarse que dentro de esta familia podemos distinguir enzimas con una secuencia muy conservada pero que difieren fundamentalmente en la cisteína presente en la posición 177. Así, existe un grupo de isocorismatasas que presenta esa cisteína conservada, siendo uno de los representantes de este grupo la isocorismatasa de *Rhodopirelulla baltica*. Por el contrario, un segundo conjunto de

isocorismatasas carece de cisteína en esa posición. Un representante de este grupo cercano filogenéticamente a HqiA es el de la isocorismatasa PhzD de *P. aeruginosa*.

Un alineamiento de las secuencias de estas isocorismatasas realizado mediante el programa MEGA X se muestra en la figura 57 e indica que la enzima PhzD no contiene la cisteína como uno de los aminoácidos identificados como “esenciales” encontrados en HqiA, mientras que el homólogo de *R. baltica* sí tiene los aminoácidos considerados clave para la actividad QQ, tanto D38 como C177.

```

HqiA          1  ----MSEITLADVVAASYKWSEEGMKYLPVATKTNFALLLIDIQOQLATPOYMDATAIAE
PhzD          1  --MSGIPEITAYPTPTAQQLP--ANLARWSMEPRR-AVLLVHDMQRYFLR-----
Isocorismatasa Rhodopirelulla 1  MNDFAPHIEHPDPLREIYHESFVENPAHGEFLVGRHTALLCIDLQVLDAAAPCG--VFVE

HqiA          56  GLDKDQVHAAVADYKORFDAS-LAKAOGVLAARONNVPALHVKIQSOTGDGRDRMMGHK
PhzD          46  -----PLPESLRAGLVANAARTRRWCVVEQGVQIAYTAQPGSMTE-EQRGLLKD
Isocorismatasa Rhodopirelulla 59  GNNHGVSPGQKYVFDRLSSTVLPNVRRLQEAFFRRRLLEVIHTRIQSLTQDGRDRGKGHK

HqiA          115  LGGWYTAESKGAQFLEECKPEFG--EAVLTKTTSGARASTGLDRTLNRNMGIEVLYIVGY
PhzD          93  FWGPGMRASPADRVVEELAPGPD--DWLTKWRYSAPFHSDLQRMRAAGRDOLVLCGV
Isocorismatasa Rhodopirelulla 119  RNLNLAAPGSHAEFLVEVAPQPDREIVINKTASGVESSTNLHYVILKNMGIEALFVVG

HqiA          173  ATDECVETTFRNVDLGYMAMIVSDAMTFYDAAYHOHVINKFTG-WGLVVTSDQVIOQLS
PhzD          151  VAHVGLISTVDAYSNDIQPFVADAIADFSEAHHRMAIEYAASRCAMVVTDEVLE---
Isocorismatasa Rhodopirelulla 179  VTNECVETTVRDACDLGYLVTVVEDCCAIVTPELHNATLATLRDRYARVMTIGEVIOQTVV

HqiA          232  SLEPGS---
PhzD          -----
Isocorismatasa Rhodopirelulla 239  NLIPAKTES

```

Figura 57. Alineamiento de aminoácidos de las enzimas isocorismatasas PhzD, isocorismatasa de *Rhodopirelulla baltica* y HqiA.

El siguiente paso fue confirmar si la presencia de los aminoácidos clave en *R. baltica*, así como su ausencia en *P. aeruginosa* tenía una relación directa con la actividad QQ. Para ello, se extrajo ADN de *P. aeruginosa* PAO1, se amplificó el gen que codificaba la enzima PhzD, y tras introducir la secuencia codificante en un vector de expresión bacteriana, el enzima se expresó en *E. coli* XL1-blue y fue purificado. Tal y como se muestra en la figura 58, la enzima PhzD no presentó ninguna actividad QQ cuando se comprobó su actividad frente a C12-HSL utilizando el ensayo de difusión en placa, en el que como control se utilizó la enzima HqiA purificada.

Por su parte, se extrajo el ADN a la bacteria *R. baltica* DSM 10527, se amplificó el gen que codificaba la enzima isocorismatasa y éste se expresó en *E. coli* XL1-blue utilizando el vector pMAL-TEV-C2x-His. La enzima isocorismatasa de *R. baltica* se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de maltosa y su actividad QQ se comprobó mediante un ensayo de difusión en placa frente a C12-HSL,

utilizando como control la enzima HqiA purificada. Tal y como se muestra en la figura 58, la enzima isocorismatasa de *R. baltica* DSM 10527 sí tenía actividad QQ.

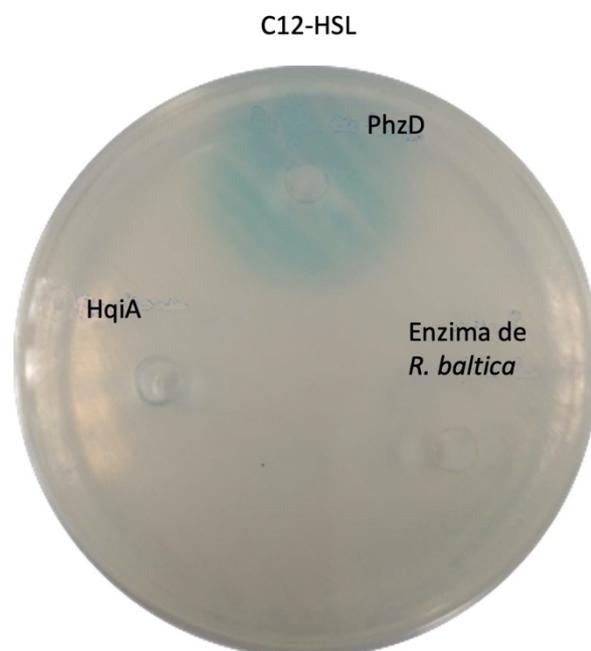


Figura 58. Ensayo de difusión en placa para determinar la actividad QQ de las enzimas isocorismatasas purificadas HqiA, PhzD e isocorismatasa de *R. baltica* frente a C12-HSL. El biosensor utilizado fue *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

Una vez demostrada la actividad QQ de la enzima isocorismatasa de *R. baltica*, se realizó un análisis de sus parámetros cinéticos, así como los de la enzima previamente purificada HqiA, a fin de caracterizar la actividad QQ de las mismas y comprobar cómo la diferente secuencia de aminoácidos en las distintas isocorismatasas afecta a la actividad QQ.

Para ello, se utilizaron las enzimas recombinantes purificadas de *R. baltica* y HqiA en un ensayo de caracterización de parámetros cinéticos, descrito en el apartado 3.8.6. En este ensayo, utilizando un medio muy poco tamponado (MOPS 2,5 mM) y un indicador ácido/base (azul de bromotimol), la actividad lactonasa sobre las AHLs libera protones que provocan un cambio de color en el medio. Con un espectrofotómetro se puede medir dicho cambio de color con respecto al tiempo. Utilizando como sustratos concentraciones crecientes (hasta 10 mM) de diversas AHLs (C4, C6 y C10-HSL), se realizó una medida de la absorbancia cada 10 segundos durante los primeros 5 min. En los primeros segundos en los que la reacción sigue una cinética lineal, la curva de la pendiente de la variación de densidad óptica es constante. Así, se determinó dicha pendiente, pudiendo a partir de esos datos calcular las constantes cinéticas K_m , K_{cat} y V_{max} que permitieran demostrar la eficacia y afinidad de la enzima. En ambos casos se utilizó 1 μ l de enzima purificada, en un volumen final de ensayo de 100 μ l. Los parámetros cinéticos obtenidos con este método se incluyen en la tabla 28.

Los resultados mostraron que la enzima HqiA es más activa frente a C6 y C10-HSL. De hecho, en el caso de la lactonasa de *R. baltica* no se pudieron determinar los parámetros cinéticos con la molécula C10-HSL debido a que, por la baja solubilidad de sustrato y la baja sensibilidad del ensayo, no se apreciaron variaciones en la absorbancia durante el tiempo de ensayo utilizando esta enzima; cambios que sí pudieron ser detectados en el caso de HqiA. No obstante, cabe destacar la enzima de *R. baltica* sí fue capaz de degradar el sustrato C10-HSL en el ensayo de difusión en placa. Por otro lado, curiosamente la enzima con actividad lactonasa de *R. baltica* presentó mayor afinidad y actividad frente a C4-HSL que HqiA.

Tabla 29. Parámetros cinéticos frente a AHLs de las enzimas HqiA e isocorismatasa de *R. baltica*.

	AHL	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	V _{max} (mM/s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
<i>R. baltica</i>	C4-HSL	0,9179	35,76	0,0933	3,89X10 ⁴
	C6-HSL	74,64	336,2	0,8776	4,5x10 ³
	C10-HSL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HqiA	C4-HSL	3,315	70,6	0,0573	2,13X10 ⁴
	C6-HSL	0,9395	142,7	0,1157	1,51x10 ⁵
	C10-HSL	0,3126	0,7947	0,00065	2,54x10 ³

c) Mutaciones en la enzima PhzD de *P. aeruginosa* PAO1

Una vez establecidos cuáles eran los aminoácidos necesarios para la actividad QQ en las enzimas de la familia de las isocorismatasas, se procedió a realizar las correspondientes mutaciones en la secuencia del gen que codifica la enzima PhzD de *P. aeruginosa* PAO1, a fin de incorporar la actividad QQ en dicha proteína. Para ello, el Dr. Rafael Salto nos proporcionó mutantes que permitieran construir sobre el centro activo de la enzima PhzD la actividad lactonasa.

En primer lugar, el Dr. Javier López-Jaramillo realizó una modelización del enzima PhzD. Este modelo (figura 59) se ha basado en las secuencias de las isocorismatasas HqiA, PhzD y otro miembro de la familia que es la Cys-hidrolasa 5. Del modelo se deduce que para establecer la actividad lactonasa en el centro activo de PhzD es necesario en primer lugar introducir la cisteína catalítica que en el caso de PhzD implica la mutación G155C. En segundo lugar, del modelo estructural propuesto se observa que la tirosina en posición 125 constituye un obstáculo para la participación de la cisteína en la catálisis, por lo que la mutación Y125A debería producir la generación de un llamado “oxyanion hole” que condujera a la activación de C148 como resto catalítico en PhzD.

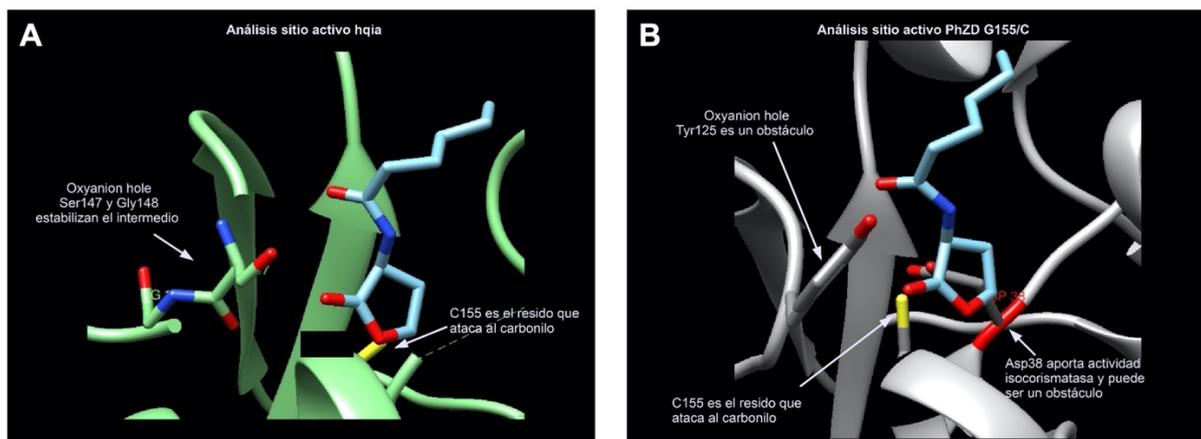


Figura 59. Modelización de los centros activos de los enzimas HqiA (A) y PhzD (B). En ambas figuras se indica la posición relativa del sustrato en el centro activa así como los restos de aminoácidos que intervienen o bien bloquean la actividad lactonasa sobre el sustrato.

Por tanto, a partir de estas predicciones estructurales se construyó el mutante G155C y el doble mutante Y125A/G155C. Para ello, todas las reacciones de mutagénesis sitio-específica se realizaron a partir del plásmido pMAL-TEV-C2x-PhzD-His que permite la sobre-expresión en bacterias del tipo silvestre de PhzD. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *E. coli* XL1-blue y en cada caso se determinó la actividad QQ frente a C10 y C12-HSL, utilizando siempre como control negativo el medio de cultivo estéril adicionado con las AHLs, a partir de los cultivos bacterianos mediante ensayos de difusión en placa utilizando los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Los resultados demostraron que la mutación de solo aminoácido (G155C) no resultaba activa. Sin embargo, los mutantes dobles, Y125A/G155C sí mostraron actividad QQ.

A continuación, se purificó la proteína PhzD Y125A/G155C de *P. aeruginosa* con dos mutaciones para comprobar la actividad QQ. La purificación se realizó mediante una cromatografía de unión a maltosa y se determinó la actividad QQ mediante ensayos de difusión en placa con la proteína purificada utilizando un amplio rango de moléculas AHLs (C4, C6, C10 y C12-HSL) Los resultados se muestran en la figura 60, en la que se observa que la actividad fue mayor frente a moléculas AHLs de cadena lateral larga (a partir de 10 átomos de carbono en su cadena lateral).

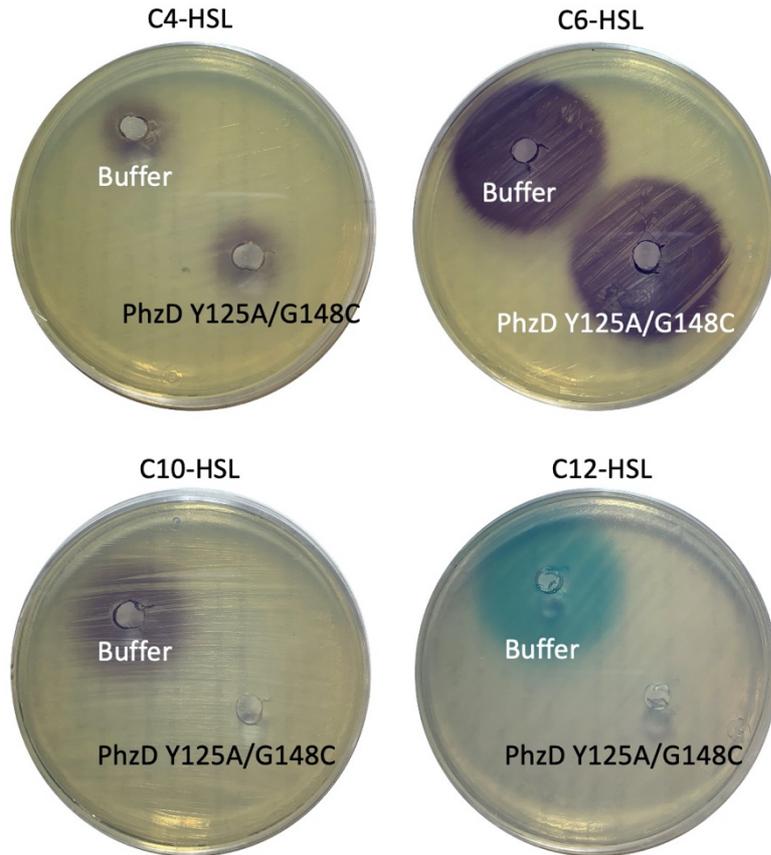


Figura 60. Ensayo QQ de difusión en placa con la enzima purificada PhzD Y125A/G155C. La detección de AHLs se determinó con *C. violaceum* CV026 (C4 y C6-HSL), *C. violaceum* VIR07 (C10-HSL) y *A. tumefaciens* NTL4 (pZRL4) (C12-HSL).

Por otra parte, los parámetros cinéticos de la enzima PhzD Y125A/G155C no pudieron ser calculados debido a la baja afinidad de la misma con las enzimas AHLs. Aunque en el ensayo de difusión en placa sí se observó actividad, la baja sensibilidad del ensayo no nos permitió el cálculo de los parámetros para esta enzima.

Todos los resultados del presente capítulo están en vías de publicación.

4.4.3. Discusión

El grupo de investigación BIO 188, durante el desarrollo de una tesis doctoral previa a ésta y con la colaboración de los Dres. Salto (Universidad de Granada) y Uroz (Universidad de Nancy, Francia) caracterizó la enzima HqiA con actividad QQ tipo lactonasa en 2017 (Torres et al., 2017). En dicho estudio se demostró que no tenía homología con los grupos conocidos hasta la fecha de lactonasas. Su homología era elevada con isocorismatasas entre las que se encontraban la enzima de *Rhodopirelulla baltica* y PhzD de *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, hasta la fecha, no se había demostrado ningún tipo de actividad QQ en las enzimas isocorismatasas mencionadas, ni se había puesto de manifiesto la capacidad de ninguna otra isocorismatasa de degradar AHLs, más allá de la propia actividad de

HqiA. Los miembros de las isocorismatasas son capaces de degradar enlaces del tipo éster, éter y amido. Por ejemplo, la enzima PhzD de *P. aeruginosa* PAO1 está involucrada en la biosíntesis de fenazina (Parsons et al., 2003) y en este trabajo se ha demostrado que no es capaz de degradar AHLs.

En este capítulo se ha demostrado, en primer lugar, cuáles son los aminoácidos necesarios para la actividad QQ tipo lactonasa en la enzima HqiA mediante técnicas de mutagénesis sobre diferentes aminoácidos. Tanto la mutación del aminoácido aspartato en posición 38 como del aminoácido cisteína en posición 177 conducen a la pérdida de la actividad QQ. En distintas hidrolasas se ha demostrado que esas posiciones son relevantes para la actividad isocorismatasa (Parsons et al., 2003). En segundo lugar, mediante modificaciones en la secuencia de aminoácidos de PhzD se ha comprobado cómo dichos aminoácidos influyen en que una enzima isocorismatasa tenga actividad QQ. La enzima PhzD contenía el aminoácido aspartato en posición 38, pero carecía de la cisteína en 177 identificada como esencial para la actividad QQ. De esta forma, tal y como se había previsto, la enzima PhzD fue incapaz de degradar AHLs. Las modificaciones Y125A/G155C permitieron que la enzima mostrara actividad QQ. Este hecho indica una posible evolución de estas enzimas para conseguir la capacidad de degradación QQ.

La ingeniería de enzimas QQ es importante para mejorar tanto la actividad como otros aspectos de las mismas, tal y como se ha puesto de manifiesto en una reciente revisión (Murugayah y Gerth, 2019). De hecho, diferentes investigadores han desarrollado enzimas QQ con mejores propiedades en cuanto a su estabilidad (Liu et al., 2016) o actividad (J. Wang et al., 2019). En nuestro trabajo hemos conseguido demostrar que, con ciertas mutaciones en aminoácidos clave de las isocorismatasas, se puede conseguir la ganancia de actividad QQ en las mismas. Además, ha quedado demostrada la actividad de los grupos de isocorismatasas que tienen cisteína en la posición equivalente a 177 de HqiA, como en el caso de la isocorismatasa de *R. baltica*.

Los parámetros cinéticos calculados en las tres enzimas estudiadas en este trabajo demuestran que en general HqiA presenta mayor eficiencia catalítica que la enzima de *R. baltica* frente todas las AHLs sintéticas ensayadas, a excepción de C4-HSL, con la que la eficiencia catalítica fue ligeramente superior en el caso de la enzima de *R. baltica*. Sin embargo, conforme se aumentó el tamaño de la cadena lateral de la AHL, la afinidad, velocidad y eficiencia catalítica de la actividad lactonasa de la enzima *R. baltica* hacia los sustratos fue descendiendo. De hecho, frente a C10-HSL no pudo ser determinada su actividad debido a su baja afinidad. Los valores de las constantes catalíticas que se han calculado en este trabajo para la enzima HqiA son similares a los encontrados por autores anteriores para otras lactonasas (Anandan y Vittal, 2019; Bergonzi et al., 2018; Kim et al., 2010; Momb et al., 2006) reforzando el potencial biotecnológico de esta enzima.

En cuanto a la enzima PhzD Y125A/G155C, ésta fue inactiva frente a C4, y C6-HSL, pero su actividad fue incrementando conforme la cadena lateral de AHLs se hacía más larga, alcanzándose una elevada actividad frente a AHLs de cadena larga como C10 y C12-HSL, tal y como se muestra en la figura 60. Estos resultados no

concuerdan con lo observado en el caso de la enzima de *R. baltica*, en la que la actividad era menor con las AHLs de cadena larga, lo que puede indicar que, si bien estas mutaciones son claves para conseguir actividad QQ, existen otros aminoácidos implicados en la misma, que pueden hacer modificar su afinidad por el sustrato.

5. Discusión

Desde que se descubrió la relevancia de los sistemas QS en el control de la producción de factores de virulencia de numerosos patógenos, su interrupción ha sido propuesta como una estrategia alternativa, novedosa y prometedora al uso de los antibióticos (Defoirdt, 2018; Grandclément et al., 2016). En esta tesis doctoral nos hemos centrado en los sistemas QS de bacterias gram negativas mediados por AHLs, que son los mecanismos de comunicación más estudiados y propios de bacterias patógenas tan importantes como las pertenecientes al género *Vibrio* o *Pseudomonas aeruginosa*. La primera enzima QQ se describió en el año 2000 (Dong et al., 2000) y, desde entonces, se han desarrollado diversos estudios en los que se utilizan enzimas QQ para controlar infecciones producidas por patógenos humanos como *P. aeruginosa* (Hraiech et al., 2014; Migiyama et al., 2013), patógenos que afectan a la acuicultura (R. Chen et al., 2010; Nhan et al., 2010; Torres et al., 2016, 2013) y a la agricultura (Ban et al., 2009; Molina et al., 2003). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios basados en la interrupción de QS se centran en la degradación de AHLs por parte de enzimas QQ, mientras que solo hay algunos ejemplos de estudios de inhibición de QS no enzimática (Adonizio et al., 2007; Choo et al., 2006; Song et al., 2018; Tello et al., 2012). En esta tesis doctoral se ha realizado un doble enfoque en el que se han identificado tanto sistemas de inhibición QS no enzimáticos como enzimas QQ, y se ha estudiado la abundancia de las enzimas QQ en 60 metagenomas de orígenes muy diversos. Además, se ha completado la investigación con la caracterización del centro activo de una familia de enzimas QQ previamente identificada en nuestro grupo y la identificación de los aminoácidos responsables de la actividad,

Aunque el uso de antibióticos para controlar las infecciones bacterianas que afectan a la acuicultura y a la agricultura está muy extendido (Cabello et al., 2013; Ter Kuile et al., 2016; Zaman et al., 2017), debido al aumento de las resistencias se están haciendo esfuerzos importantes para encontrar nuevas estrategias para combatir dichas enfermedades sin necesidad de usar los antibióticos, o para usarlos en combinación con otros compuestos (WHO, 2017). De hecho, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de nuevas herramientas que aseguren un tratamiento eficaz de bacterias multirresistentes se ha convertido en un objetivo primordial a nivel mundial (Penesyan et al., 2015). Con esta estrategia, tal y como se ha explicado en la introducción, se establece una menor presión selectiva y por tanto, la aparición de resistencias es menos probable (Bzdrenga et al., 2017; Defoirdt, 2018). Por esta razón, se espera que esta estrategia sea más eficaz y beneficiosa que los antibióticos (Bjarnsholt et al., 2010; Rasko y Sperandio, 2010).

Dados sus resultados satisfactorios, la degradación enzimática de las AHLs (mecanismo referido en esta tesis doctoral como QQ) se ha recomendado como una novedosa y eficaz estrategia para combatir las infecciones bacterianas en diversos campos. Por ejemplo, en acuicultura ya se han empleado enzimas o cepas QQ que permiten aumentar la supervivencia de peces y crustáceos infectados por *Aeromonas hydrophila* (R. Chen et al., 2010; Chu et al., 2014) o por vibrios (Torres et al., 2018,

2016). Por su parte, en agricultura, las enzimas QQ también han demostrado ser capaces de reducir la virulencia de patógenos cuya producción de factores de virulencia está mediada por moléculas AHLs como *A. tumefaciens* (Molina et al., 2003) y *Pectobacterium carotovorum* (Ban et al., 2009; Torres et al., 2017). En lo que respecta a los patógenos que afectan a humanos, hay una importante investigación realizada respecto a *P. aeruginosa*, patógeno en el que se ha documentado en múltiples ocasiones la importancia de sus sistemas QS y la posibilidad de afectar a su virulencia al interrumpir los mismos (Hraiech et al., 2014; Hurley et al., 2012; Soukarieh et al., 2018).

El medio marino está considerado una fuente inexplorada de moléculas y productos naturales de gran diversidad con actividad biológica (Bhatnagar y Kim, 2010; Hughes y Fenical, 2012; Tinta et al., 2019; Valliappan et al., 2014). De hecho, se calcula que el 91% de las especies que habitan los océanos aún no se han descrito (Mora et al., 2011) y la microbiota de las mismas es una fuente importante y prometedora para encontrar nuevos principios activos (Romano et al., 2017). Concretamente, no hay apenas estudios respecto a la identificación de moléculas con capacidad de inhibir los sistemas QS (Chen et al., 2019; Saurav et al., 2017; Torres et al., 2019; Zhao et al., 2019). El primer inhibidor de QS que se describió fue la furanona halogenada producidas por el alga *Delisea pulchra* (Givskov et al., 1996). La adición de este compuesto es capaz de proteger a truchas contra la vibriosis (Rasch et al., 2004). Del mismo modo, otros compuestos brominados como las tiofenonas también han sido capaces de reducir la mortalidad causada por vibrios en larvas de *Artemia* (Defoirdt et al., 2012). Sin embargo, nuestros conocimientos de la biodiversidad marina y de los metabolitos bioactivos que podemos encontrar es muy limitado, dado que muchas de las especies marinas permanecen sin estudiar (Hughes y Fenical, 2012). Con respecto a los invertebrados marinos, que son considerados una fuente inexplorada de nuevas moléculas bioactivas y uno de los campos de investigación importantes (Bhatnagar y Kim, 2010; Rosenberg et al., 2007; Valliappan et al., 2014), hay algunos ejemplos de extractos de los mismos que han demostrado su capacidad inhibidora de QS (Dobretsov et al., 2009; Saurav et al., 2016; Skindersoe et al., 2008; Tello et al., 2012).

En esta tesis doctoral se ha demostrado que la microbiota asociada los invertebrados marinos pertenecientes a los fila *Echinodermata* y *Cnidaria* es una fuente considerable de cepas con actividad QSI y QQ. De hecho, anteriormente a este trabajo ya se había demostrado que los invertebrados pertenecientes al filo *Echinodermata* producían compuestos bioactivos como péptidos antimicrobianos (Cunsolo et al., 2013; Cusimano et al., 2019). Sin embargo, no existe mucha información acerca de la producción de compuestos QSI en bacterias simbiotas de invertebrados tipo anémonas y holoturias, como se ha investigado en este trabajo. En algunas bacterias asociadas a invertebrados marinos pertenecientes al filo *Cnidaria* como corales se han encontrado compuestos, como el isotiocianato de rodamina, que inhibe el sistema QS en *C. violaceum* por mecanismos no enzimáticos (Golberg et al., 2013; Song et al., 2018; Tello et al., 2012). Con respecto a la actividad QQ, no se ha encontrado información relativa al descubrimiento de cepas con esta actividad en holoturias o anémonas.

En este trabajo, a partir de una colección de 827 cepas aisladas previamente de la microbiota de anémonas y holoturias, se han identificado 23 cepas con actividad QSI y 21 cepas productoras de enzimas QQ. En el caso de las primeras, todas pertenecen al género *Vibrio* y son capaces de interferir con los sistemas QS de *C. violaceum* ATCC 12472. Entre ellas, destaca *V. alginolyticus* M3-10. Si bien previamente se había caracterizado la capacidad QSI de diferentes cepas de *V. alginolyticus* (Padmavathi et al., 2014; Song et al., 2018; Wang et al., 2017) en este trabajo se describe por primera vez la actividad QSI de los compuestos tiramina y *N*-acetiltiramina producidos por esta especie. Este resultado aumenta aún más el potencial biotecnológico de inhibición de QS de esta especie, en la que ya se han encontrado diversos compuestos con capacidad de interferencia con la comunicación intercelular, como el fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) (Padmavathi et al., 2014) o el isotiocianato de rodamina (Song et al., 2018).

En lo que se refiere a las cepas QQ seleccionadas, éstas pertenecen a diferentes especies, la mayoría de ellas conocidas por su presencia en el medio marino, como *Acinetobacter junii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter* sp., *Rheinheimera aquimaris* o *Ruegeria atlantica*. Todas ellas mostraron tener enzimas tipo acilasas, lo que confirma la hipótesis de que en el medio marino son más abundantes las acilasas que las lactonasas (Muras et al., 2018; Romero et al., 2012). Además, la mayoría de las cepas QQ demostraron tener la capacidad de aumentar la supervivencia de nauplios de *Artemia salina* infectados con el patógeno *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193.

En el caso de la cepa *Psychrobacter* sp. M9-54-1, ésta se destacó por producir la enzima AhaP que era capaz de degradar un amplio rango de AHLs. Además, la expresión de AhaP en el patógeno *P. aeruginosa* PAO1 redujo tanto la expresión del gen *lecA*, implicado en la producción de lectinas, que actúan como adhesinas y citotoxinas (Winzer et al., 2000) como la movilidad tipo *swarming* de forma muy significativa. Estas propiedades hacen de la cepa M9-54-1 y de su enzima AhaP potenciales herramientas biotecnológicas de biocontrol. Así mismo, también se ha demostrado el potencial uso *in vivo* de las cepas con actividad QQ pertenecientes a la especie *S. maltophilia*, una bacteria bien conocida y ubicua en múltiples ambientes como la rizosfera de plantas y los invertebrados marinos, en el control de infecciones bacterianas en acuicultura y agricultura cuyos factores de virulencia estén controlados por QS.

Los sistemas QS están ampliamente distribuidos (Abisado et al., 2018) e incluso se conoce que muchas bacterias, aunque no sean capaces de sintetizar sus propias AHLs, son capaces de reconocerlas a través de LuxR “solos”, es decir, tienen receptores para las moléculas señal (Whiteley et al., 2017). De hecho, ya se habían llevado a cabo algunos estudios en los que, mediante técnicas metagenómicas y bioinformáticas determinaban la abundancia de los sistemas QS (Barriuso y Martínez, 2018). En la presente tesis doctoral hemos puesto de manifiesto, gracias a herramientas bioinformáticas, que los sistemas QQ también son abundantes en los diversos metagenomas analizados, que incluyen desde metagenomas pertenecientes a suelos como a metagenomas de aguas salinas, hipersalinas y dulces, pasando por tapetes microbianos. Estudios bioinformáticos anteriores a nuestro trabajo habían demostrado que los sistemas QQ eran frecuentes en ambientes marinos (Muras et

al., 2018; Romero et al., 2012). No obstante, es la primera vez que se investiga su presencia en un número tan alto de metagenomas y de un origen tan diverso. Nuestros resultados demuestran una abundancia relativa media en todos los metagenomas de 0,023 homólogos/Mbp, en consonancia con datos previos obtenidos tanto por técnicas bioinformáticas como mediante librerías metagenómicas (Riaz et al., 2008; Romero et al., 2012; Torres et al., 2017).

En cualquier caso, los datos de abundancia de genes QQ en metagenomas tienen que ser estudiados con precaución, ya que una gran similitud en la secuencia no significa siempre una conservación de la función ni la expresión en determinadas condiciones ambientales. Por ejemplo, los homólogos del gen de la lactonasa QsdA en otras bacterias no degradan AHLs (Afriat et al., 2006). Además, las enzimas QQ también pueden llevar a cabo funciones biológicas distintas a la degradación de AHLs, por lo que la abundancia elevada no tiene por qué estar directamente relacionada con la degradación de AHLs (Muras et al., 2018).

Por otro lado, aún no se han descubierto todas las familias de enzimas QQ, como demuestra la actividad QQ de nuevas isocorismatasas como HqiA (Torres et al., 2017) o la de la isocorismatasa de *Rhodopireulla baltica*, demostrada en esta tesis doctoral, y además, las condiciones de selección de los homólogos son bastante estrictas y pueden hacer que se pierdan algunos homólogos de secuencias QQ que no encajen en nuestros límites, tal y como se ha explicado con anterioridad (Romero et al., 2012). En cualquier caso, los datos aquí mostrados demuestran la gran relevancia de estos sistemas en la naturaleza.

Finalmente, la enzima HqiA constituyó un nuevo grupo de enzimas QQ de tipo lactonasa (Torres et al., 2017) siendo sus homólogos más cercanos enzimas del tipo de las isocorismatasas. En esta tesis doctoral hemos demostrado mediante mutagénesis que la actividad QQ de enzima HqiA depende de los aminoácidos Aspartato en posición 38 y Cisteína en posición 177, que una vez sustituidos por alanina provocaron la pérdida de la actividad QQ de la enzima HqiA. Curiosamente, esos aminoácidos ya se habían considerado como esenciales en la actividad hidrolasa de las isocorismatasas (Parsons et al., 2003) y ahora ha quedado demostrado que son necesarios para la actividad QQ. Del mismo modo, hemos demostrado que la enzima isocorismatasa de *R. baltica* tiene actividad QQ ya que comparte con HqiA esos aminoácidos en las posiciones clave para la actividad QQ. Esto supone un gran avance en el conocimiento del mecanismo por el que las enzimas de tipo isocorismatasas adquieren su actividad QQ. Por último, en la enzima isocorismatasa PhzD de *P. aeruginosa* que no tiene actividad QQ al no disponer de los aminoácidos esenciales para la misma, se consiguió al mutar el gen que codifica para esa enzima e introducirle esos aminoácidos clave dicha actividad QQ.

6. Conclusiones

Las conclusiones de la tesis doctoral son las siguientes:

1. La microbiota de los invertebrados marinos es una fuente de bacterias productoras de compuestos y enzimas que interfieren los sistemas *quorum sensing*, teniendo, por ello, un elevado potencial biotecnológico.
2. Entre las 23 cepas seleccionadas con actividad inhibidora de los sistemas *quorum sensing* mediante un mecanismo no enzimático, destaca la cepa *Vibrio alginolyticus* M3-10. Las moléculas tiramina y *N*-acetiltiramina son responsables de dicha actividad: reducen la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, y la producción de pioverdina y movilidad en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Es la primera vez que se describen estos compuestos como inhibidores de QS.
3. Las 21 cepas productoras de enzimas *quorum quenching* pertenecen a las especies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter junii*, *Psychrobacter* sp., *Ruegeria atlantica*, *Rheinheimera aquimaris*, *Pseudomonas pachastrellae*, *P. sihuensis* y *Microbulbifer echini*. En la mayoría de ellas se ha demostrado por primera vez la actividad degradadora de AHLs y han mostrado ser capaces de disminuir la virulencia del patógeno *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193. Entre ellas, destacan *S. maltophilia* M9-54-2, que también reduce la virulencia de patógenos de plantas, y *Psychrobacter* sp. M9-54-1, eficaz frente a AHLs a bajas temperaturas. La expresión de la enzima AhaP de esta última cepa en *P. aeruginosa* PAO1 ha reducido la producción de algunos factores de virulencia.
4. Las enzimas *quorum quenching* presentan una elevada abundancia en los 60 metagenomas analizados representantes de una amplia variedad de diferentes hábitats, siendo más prevalentes en metagenomas de suelo, predominando en general la presencia de lactonasas. La asignación taxonómica de los homólogos encontrados demuestra una mayor incidencia en los taxa *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria*.
5. Finalmente, en relación a la caracterización estructural de la enzima HqiA, se demuestra que los aminoácidos aspartato 38 y cisteína 177 son esenciales para su actividad *quorum quenching*.

6. Conclusions

The conclusions of the doctoral thesis are:

1. Marine invertebrates microbiota is a source of bacteria capable of producing compounds and enzymes that interfere with quorum sensing systems, thus having a high biotechnological potential.

2. Among the 23 selected strains with quorum sensing inhibitory activity through a non-enzymatic mechanism, the strain *Vibrio alginolyticus* M3-10 stands out. Tyramine and *N*-acetyltyramine are responsible of this activity: they reduce the violacein production in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, and the pyoverdine production as well as motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. It is the first time that these compounds have been described as QS inhibitors

3. The 21 quorum quenching enzymes-producing strains belong to the species *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter junii*, *Psychrobacter* sp., *Ruegeria atlantica*, *Rheinheimera aquimaris*, *Pseudomonas pachastrellae*, *P. sihuensis* and *Microbulbifer echini*. In most of them, the capability to degrade AHLs has been demonstrated for the first time and they have shown ability in reducing the virulence of the pathogen *Vibrio coralliilyticus* VibC-Oc-193. Among them, *S. maltophilia* M9-54-2 stands out, which also reduces the virulence of plant pathogens, and *Psychrobacter* sp. M9-54-1, effective against AHLs at low temperatures. The expression of the AhaP enzyme from the latter in *P. aeruginosa* PAO1 has reduced the production of some virulence factors.

4. Quorum quenching enzymes are present in high abundance in the 60 metagenomes analyzed representing a wide variety of different habitats, being more prevalent in soil metagenomes. Lactonases are generally predominant. The taxonomic assignment of the found homologues shows a higher incidence in the taxa *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria*.

5. Finally, in relation to the structural characterization of the HqiA enzyme, it is shown that the aminoacids aspartate 38 and cysteine 177 are essential for its quorum quenching activity.

7. Bibliografía

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S., Al-Fori, M., Gunasekera, S.P., Sudesh, K., Paul, V.J., 2013. Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 759-772. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1276-4>
- Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A., Chandler, J.R., 2018. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *MBio* 9, 1-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17>
- Adonizio, A., Kong, K.-F., Mathee, K., 2007. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 198-203. <https://doi.org/10.1128/AAC.00612-07>
- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G., Tawfik, D.S., 2006. The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry* 45, 13677-13686. <https://doi.org/10.1021/bi061268r>
- Alcalde-Rico, M., Olivares-Pacheco, J., Alvarez-Ortega, C., Cámara, M., Martínez, J.L., 2018. Role of the multidrug resistance efflux pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response. *Front. Microbiol.* 9, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02752>
- Alikhan, N.-F., Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., Beatson, S.A., 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12, 402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Carranza, D., Abrini, J., Siquin, C., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S., Llamas, I., 2015. Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 117-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052>
- Anandan, K., Vittal, R.R., 2019. Quorum quenching activity of AiiA lactonase KMMI17 from endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 on AHL-mediated pathogenic phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* 132, 230-242. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.015>
- Austin, B., Austin, A.D., 2012. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4884-2_5
- Austin, B., Zhang, X.H., 2006. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

- Baird-Parker, A.C., 1963. A classification of *micrococci* and *staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.* 30, 409-427. <https://doi.org/10.1099/00221287-30-3-409>
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J., 2018. *Vibrio spp.* infections. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Ban, H., Chai, X., Lin, Y., Zhou, Ying, Peng, D., Zhou, Yi, Zou, Y., Yu, Z., Sun, M., 2009. Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Rep.* 28, 1847-1855. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0788-x>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V, Sirotkin, A. V, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455-77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2007. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun.* 75, 4597-4607. <https://doi.org/10.1128/IAI.00630-07>
- Bar-Rogovsky, H., Hugenmatter, A., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427922>
- Barbey, C., Crépin, A., Bergeau, D., Ouchiha, A., Mijouin, L., Taupin, L., Orange, N., Feuilloley, M., Dufour, A., Burini, J.-F., Latour, X., 2013. In Planta Biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* Involves Silencing of Pathogen Communication by the Rhodococcal Gamma-Lactone Catabolic Pathway. *PLoS One* 8, e66642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066642>
- Barriuso, J., Martínez, M.J., 2018. In Silico Analysis of the Quorum Sensing Metagenome in Environmental Biofilm Samples. *Front. Microbiol.* 9, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01243>
- Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.* Cambridge University Press.
- Bassetto, F., Maschio, N., Abatangelo, G., Zavan, B., Scarpa, C., Vindigni, V., 2016. Collagenase from *Vibrio alginolyticus* Cultures. *Surg. Innov.* 23, 557-562. <https://doi.org/10.1177/1553350616660630>
- Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., Elias, M., 2018. Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. *Sci. Rep.* 8, 19-21. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5>
- Bhardwaj, A.K., Vinothkumar, K., Rajpara, N., 2013. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 8, 68-83. <https://doi.org/10.2174/1574891x11308010012>
- Bhatnagar, I., Kim, S.K., 2010. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Mar. Drugs* 8, 2673-2701. <https://doi.org/10.3390/md8102673>
- Bi, Z.X., Liu, Y.J., Lu, C.P., 2007. Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas*

- hydrophila* J-1. Res. Vet. Sci. 83, 150-156.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.003>
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., Szesny, M., Grond, S., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Daniel, R., Dierking, K., Schulenburg, H., Streit, W.R., 2011a. A novel metagenomic Short-Chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. PLoS One 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026278>
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., Streit, W.R., 2011b. BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. J. Biotechnol. 155, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.016>
- Birmes, F.S., Säring, R., Hauke, M.C., Ritzmann, N.H., Drees, S.L., Daniel, J., Treffon, J., Liebau, E., Kahl, B.C., Fetzner, S., 2019. Interference with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence by the mycobacterial *Pseudomonas* quinolone signal dioxygenase AQDC in combination with the N-Acylhomoserine lactone lactonase QsdA. Infect. Immun. 87, 1-14. <https://doi.org/10.1128/IAI.00278-19>
- Bjarnsholt, T., Gennip, M. van, Jakobsen, T.H., Christensen, L.D., Jensen, P.Ø., Givskov, M., 2010. *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect. Nat. Protoc. 2010 5, 282. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.205>
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L., Høiby, N., Givskov, M., 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. Microbiology 151, 3873-3880. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27955-0>
- Blanchet, E., Prado, S., Stien, D., Oliveira da Silva, J., Ferandin, Y., Batailler, N., Intertaglia, L., Escargueil, A., Lami, R., 2017. Quorum Sensing and Quorum Quenching in the Mediterranean Seagrass *Posidonia oceanica* Microbiota. Front. Mar. Sci. 4, 218. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00218>
- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M.G., Lu, X., Schwalen, C.J., Kautsar, S.A., Suarez Duran, H.G., de los Santos, E.L.C., Kim, H.U., Nave, M., Dickschat, J.S., Mitchell, D.A., Shelest, E., Breitling, R., Takano, E., Lee, S.Y., Weber, T., Medema, M.H., 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. Nucleic Acids Res. 45, W36-W41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx319>
- Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H.J., Butler, D., Pirovano, W., 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. Bioinformatics 27, 578-579. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>
- Boller, T., Felix, G., 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Borges, A., Simões, M., 2019. Quorum sensing inhibition by marine bacteria. Mar. Drugs 17. <https://doi.org/10.3390/md17070427>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.

- 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brooke, J.S., 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Bullock, O., W., 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Bzdrenga, J., Daudé, D., Rémy, B., Jacquet, P., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., 2017. Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 267, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.028>
- Bzdrenga, J., Hiblot, J., Gotthard, G., Champion, C., Elias, M., Chabriere, E., 2014. SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase. *BMC Res. Notes* 7, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-333>
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Cai, X., Yu, M., Shan, H., Tian, X., Zheng, Y., Xue, C., Zhang, X.H., 2018. Characterization of a novel N-acylhomoserine lactonase RmmL from *Ruegeria mobilis* YJ3. *Mar. Drugs* 16, 1-11. <https://doi.org/10.3390/md16100370>
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G.D., Blackwell, H.E., 2009. New and Unexpected Insights into the Modulation of LuxR-Type Quorum Sensing by Cyclic Dipeptides. *ACS Chem. Biol.* 4, 1051-1059.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4989-4993.2003>
- Chan, K.G., Yin, W.F., Sam, C.K., Koh, C.L., 2009. A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 247-251. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0491-x>
- Chan, Y.Y., Chua, K.L., 2005. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: Expression and impact on quorum sensing and virulence. *J. Bacteriol.* 187, 4707-4719. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4707-4719.2005>
- Chang, J., Lee, Y.-S., Fang, S.-J., Park, I.-H., Choi, Y.-L., 2013. Recombinant Expression and Characterization of an Organic-Solvent-Tolerant α -Amylase from *Exiguobacterium* sp. DAU5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 1870-1883. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0101-x>
- Chankhamhaengdecha, S., Hongvijit, S., Srichaisupakit, A., Charnchai, P., Panbangred, W., 2013. Endophytic *Actinomycetes*: A Novel Source of Potential Acyl Homoserine Lactone Degrading Enzymes. *Biomed Res. Int.* 2013, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/782847>
- Chapman, E., Wong, C., 2002. A pH Sensitive Colorimetric Assay for the High-Throughput Screening of Enzyme Inhibitors and Substrates: A Case Study Using Kinases 10, 551-555.
- Chen, C.-N., Chen, C.-J., Liao, C.-T., Lee, C.-Y., 2009. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone

- acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiol.* 9, 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-89>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., Li, X., 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17477-17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>
- Chen, G., Swem, L.R., Swem, D.L., Stauff, D.L., O'Loughlin, C.T., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2011. A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing. *Mol. Cell* 42, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003>
- Chen, J., Wang, B., Lu, Y., Guo, Y., Sun, J., Wei, B., Zhang, H., Wang, H., 2019. Quorum Sensing Inhibitors from Marine Microorganisms and Their Synthetic Derivatives. *Mar. Drugs* 17, 80. <https://doi.org/10.3390/md17020080>
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., 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. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-39>
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549. <https://doi.org/10.1038/415545a>
- Chen, Y.-C., Ho, H.-O., Su, C.-H., Sheu, M.-T., 2010. Anticancer Effects of *Taiwanofungus camphoratus* Extracts, Isolated Compounds and its Combinational use. *J. Exp. Clin. Med.* 2, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2010.08.003>
- Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 Bacteriophage DNA Not Detected in Crown Gall Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3672-3676. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3672>
- Choi, S.H., Greenberg, E.P., 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11115-11119. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11115>
- Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 637-641. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>
- Choopun, N., Louis, V., Huq, A., Colwell, R.R., 2002. Simple procedure for rapid identification of *Vibrio cholerae* from the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 995-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.995-998.2002>
- Christensen, Q.H., Grove, T.L., Booker, S.J., Greenberg, E.P., 2013. A high-throughput screen for quorum-sensing inhibitors that target acyl-homoserine lactone synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13815-13820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313098110>
- Chu, W., Jiang, Y., Yongwang, L., Zhu, W., 2011. Role of the quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *African J. Microbiol. Res.* 5, 5819-5825. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.684>
- Chu, W., Zhou, S., Zhu, W., Zhuang, X., 2014. Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Sci. Rep.* 4, 1-6. <https://doi.org/10.1038/srep05446>
- Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., Kim, H., Igarashi, J., Suga, H., Moon, J.S., Hwang, I., Rhee, S., 2011. Small-molecule inhibitor binding to an N-

- acyl-homoserine lactone synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12089-12094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103165108>
- Ciok, A., Dziewit, L., 2019. Exploring the genome of Arctic *Psychrobacter sp.* DAB_AL32B and construction of novel *Psychrobacter*-specific cloning vectors of an increased carrying capacity. *Arch. Microbiol.* 201, 559-569. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1595-y>
- Cirou, A., Mondy, S., An, S., Charrier, A., Sarrazin, A., Thoison, O., DuBow, M., Faure, D., 2012. Efficient Biostimulation of Native and Introduced Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* Populations Is Revealed by a Combination of Analytical Chemistry, Microbiology, and Pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 481-492. <https://doi.org/10.1128/AEM.06159-11>
- Corral, P., Amoozegar, M.A., Ventosa, A., 2019. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Mar. Drugs* 18. <https://doi.org/10.3390/md18010033>
- Costoya, A., Velázquez Becerra, L.E., Meléndez-Ortiz, H.I., Díaz-Gómez, L., Mayer, C., Otero, A., Concheiro, A., Bucio, E., Alvarez-Lorenzo, C., 2019. Immobilization of antimicrobial and anti-quorum sensing enzymes onto GMA-grafted poly(vinyl chloride) catheters. *Int. J. Pharm.* 558, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.075>
- Crépin, A., Barbey, C., Beury-Cirou, A., Hélias, V., Taupin, L., Reverchon, S., Nasser, W., Faure, D., Dufour, A., Orange, N., Feuilleley, M., Heurlier, K., Burini, J.F., Latour, X., 2012. Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS One* 7, e35176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035176>
- Criscuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Croxatto, A., Chalker, V.J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Cámara, M., Milton, D.L., 2002. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 184, 1617-1629. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1617-1629.2002>
- Cunsolo, V., Cusimano, M., Vazzana, M., Russo, D., Arizza, V., Vitale, M., Schillaci, D., Saletti, R., 2013. Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (*Echinodermata*) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. *AMB Express* 3, 35. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-35>
- Cusimano, M., Spinello, A., Barone, G., Schillaci, D., Cascioferro, S., Magistrato, A., Parrino, B., Arizza, V., Vitale, M., 2019. A Synthetic Derivative of Antimicrobial Peptide Holothuroidin 2 from Mediterranean Sea Cucumber (*Holothuria tubulosa*) in the Control of *Listeria monocytogenes*. *Mar. Drugs* 17, 159. <https://doi.org/10.3390/md17030159>
- Czajkowski, R., Jafra, S., 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochim. Pol.* 56, 1-16.
- Czajkowski, R., Krzyzanowska, D., Karczewska, J., Atkinson, S., Przysowa, J., Lojkowska, E., Williams, P., Jafra, S., 2011. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 59-68. <https://doi.org/10.1111/j.1758->

2229.2010.00188.x

- Defoirdt, T., 2018. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol.* 26, 313-328. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.10.005>
- Defoirdt, T., Benneche, T., Brackman, G., Coenye, T., Sorgeloos, P., Scheie, A.A., 2012. A quorum sensing-disrupting brominated thiophenone with a promising therapeutic potential to treat luminescent vibriosis. *PLoS One* 7, 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041788>
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., 2010. Can Bacteria Evolve Resistance to Quorum Sensing Disruption? *PLoS Pathog.* 6, e1000989. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000989>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: Lessons learned from in vivo work. *ISME J.* 2, 19-26. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.92>
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environ. Microbiol.* 7, 1239-1247. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x>
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-06>
- Defoirdt, T., Miyamoto, C.M., Wood, T.K., Meighen, E.A., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01367.x>
- Defoirdt, T., Pande, G.S.J., Baruah, K., Bossier, P., 2013. The Apparent Quorum-Sensing Inhibitory Activity of Pyrogallol Is a Side Effect of Peroxide Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2870-2873. <https://doi.org/10.1128/AAC.00401-13>
- del Rio, B., Sánchez-Llana, E., Redruello, B., Magadan, A.H., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez, M.A., 2019. *Enterococcus faecalis* Bacteriophage 156 Is an Effective Biotechnological Tool for Reducing the Presence of Tyramine and Putrescine in an Experimental Cheese Model. *Front. Microbiol.* 10, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00566>
- des Essarts, Y.R., Sabbah, M., Comte, A., Soullère, L., Queneau, Y., Dessaux, Y., Hélias, V., Faure, D., 2013. N,N'-alkylated imidazolium-derivatives act as quorum-sensing inhibitors targeting the *Pectobacterium atrosepticum*-induced symptoms on potato tubers. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 19976-19986. <https://doi.org/10.3390/ijms141019976>
- Deschaght, P., Janssens, M., Vanechoutte, M., Wauters, G., 2012. *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 671-674. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.032631-0>

- Dessaux, Y., Chapelle, E., Faure, D., 2011. Quorum Sensing and Quorum Quenching in Soil Ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 339-367. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14512-4_13
- Devaraj, K., Tan, G.Y.A., Chan, K.G., 2017. Quorum quenching properties of *Actinobacteria* isolated from Malaysian tropical soils. Arch. Microbiol. 199, 897-906. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1371-4>
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Paul, V., 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. Biofouling 25, 413-427. <https://doi.org/10.1080/08927010902853516>
- Dong, W., Zhu, J., Guo, X., Kong, D., Zhang, Q., Zhou, Y., Liu, X., Zhao, S., Ruan, Z., 2018. Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakui* LAM0618T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Sci. Rep. 8, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24507-8>
- Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Zhang, L.-H., 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 362, 1201-1211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., Zhang, L.H., 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411, 813-817. <https://doi.org/10.1038/35081101>
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H., 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, 3526-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.060023897>
- Dubert, J., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2017. New Insights into Pathogenic *Vibrios* Affecting Bivalves in Hatcheries: Present and Future Prospects. Front. Microbiol. 8, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00762>
- Durán, N., Justo, G.Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G.R., Nakazato, G., 2016. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. Biotechnol. Adv. 34, 1030-1045. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>
- Egland, K.A., Greenberg, E.P., 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. Mol. Microbiol. 31, 1197-1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01261.x>
- Enomoto, M., Nakagawa, S., Sawabe, T., 2012. Microbial communities associated with holothurians: presence of unique bacteria in the coelomic fluid. Microbes Environ. 27, 300-5. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me12020>
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. <https://doi.org/issn 10>
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T., 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. Plant J. 4, 307-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020307.x>
- Fetzner, S., 2014. Quorum quenching enzymes. J. Biotechnol. 201, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. 26, 251-259.

- <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5661945.x>
- Flynn, P.B., Buseti, A., Wielogorska, E., Chevallier, O.P., Elliott, C.T., Lavery, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F., 2016. Non-thermal plasma exposure rapidly attenuates bacterial AHL-dependent quorum sensing and virulence. *Sci. Rep.* 6, 18-30. <https://doi.org/10.1038/srep26320>
- Fukumoto, A., Murakami, C., Anzai, Y., Kato, F., 2016. Maniwamycins: New quorum-sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026 were isolated from *Streptomyces* sp. TOHO-M025. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 69, 395-399. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.126>
- Fuqua, C., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2001. Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439-468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275.
- Furushita, M., Okamoto, A., Maeda, T., Ohta, M., Shiba, T., 2005. Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a Marine Fish Farm 71, 9-12. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5598>
- Garcez, W.S., Martins, D., Garcez, F.R., Marques, M.R., Pereira, A.A., Oliveira, L.A., Rondon, J.N., Peruca, A.D., 2000. Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3662-3665. <https://doi.org/10.1021/jf991146o>
- García-Contreras, R., Maeda, T., Wood, T.K., 2013. Resistance to quorum-quenching compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6840-6846. <https://doi.org/10.1128/AEM.02378-13>
- García-Rocha, M., García-Gravalos, M.D., Avila, J., 1996. Characterisation of antimetabolic products from marine organisms that disorganise the microtubule network: ecteinascidin 743, isohomohalichondrin-B and LL-15. *Br. J. Cancer* 73, 875-883. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.176>
- Garg, N., Manchanda, G., Kumar, A., 2014. Bacterial quorum sensing: circuits and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 289-305. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0082-3>
- Garge, S.S., Nerurkar, A.S., 2016. Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLoS One* 11, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167344>
- George, E.A., Muir, T.W., 2007. Molecular Mechanisms of *agr* Quorum Sensing in Virulent *Staphylococci*. *ChemBioChem* 8, 847-855. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700023>
- Gilson, L., Kuo, A., Dunlap, P. V., 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* 177, 6946-51. <https://doi.org/10.1128/jb.177.23.6946-6951.1995>
- Girard, L., 2019. Quorum sensing in *Vibrio* spp.: the complexity of multiple signalling molecules in marine and aquatic environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 0, 1-21. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1624499>

- Givskov, M., De Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* 178, 6618-6622. <https://doi.org/10.1128/jb.178.22.6618-6622.1996>
- Golberg, K., Pavlov, V., Marks, R.S., Kushmaro, A., 2013. Coral-associated bacteria, quorum sensing disrupters, and the regulation of biofouling. *Biofouling* 29, 669-682. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.796939>
- González, J.E., Keshavan, N.D., 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 859-75. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-06>
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D., 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 86-116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
- Gray, K.M., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P., 1994. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 3076-80. <https://doi.org/10.1128/jb.176.10.3076-3080.1994>
- Gupta, P., Chhibber, S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.06.009>
- Gutiérrez-Barranquero, J.A., Reen, F.J., Parages, M.L., McCarthy, R., Dobson, A.D.W., O'Gara, F., 2019. Disruption of N-acyl-homoserine lactone-specific signalling and virulence in clinical pathogens by marine sponge bacteria. *Microb. Biotechnol.* 12, 1049-1063. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12867>
- Gutiérrez, M., Capson, T.L., Guzmán, H.M., González, J., Ortega-Barría, E., Quiñoá, E., Riguera, R., 2006. Antiplasmodial metabolites isolated from the marine octocoral *Muricea austera*. *J. Nat. Prod.* 69, 1379-1383. <https://doi.org/10.1021/np060007f>
- Ha, C., Kim, S.K., Lee, M.N., Lee, J.H., 2014. Quorum sensing-dependent metalloprotease VvpE is important in the virulence of *Vibrio vulnificus* to invertebrates. *Microb. Pathog.* 71-72, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.04.001>
- Haque, S., Yadav, D.K., Bisht, S.C., Yadav, N., Singh, V., Dubey, K.K., Jawed, A., Wahid, M., Dar, S.A., 2019. Quorum sensing pathways in Gram-positive and -negative bacteria: potential of their interruption in abating drug resistance. *J. Chemother.* <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1599175>
- Harvey, E.L., Deering, R.W., Rowley, D.C., El Gamal, A., Schorn, M., Moore, B.S., Johnson, M.D., Mincer, T.J., Whalen, K.E., 2016. A Bacterial Quorum-Sensing Precursor Induces Mortality in the Marine Cocolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Front. Microbiol.* 7, 59. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00059>
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 384-397. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9)
- Hayward, A.C., Fegan, N., Fegan, M., Stirling, G.R., 2010. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: Ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *J. Appl. Microbiol.* 108, 756-770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04471.x>

- Heidari, B., Mohammadipanah, F., 2018. Isolation and identification of two alkaloid structures with radical scavenging activity from *Actinokineospora* sp. UTMC 968, a new promising source of alkaloid compounds. *Mol. Biol. Rep.* 45, 2325-2332. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4395-1>
- Heilmann, S., Krishna, S., Kerr, B., 2015. Why do bacteria regulate public goods by quorum sensing?-How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation. *Front. Microbiol.* 6, 767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00767>
- Helman, Y., Chernin, L., 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Mol. Plant Pathol.* 16, 316-329. <https://doi.org/10.1111/mpp.12180>
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 14, 648-656. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012>
- Hernández-Robles, M.F., Álvarez-Contreras, A.K., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, E.I., 2016. Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. *Int. Microbiol.* 19, 191-198. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.277>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., Elias, M., 2012. Structural and Enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047028>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Elias, M., Chabriere, E., 2013. Differential Active Site Loop Conformations Mediate Promiscuous Activities in the Lactonase SsoPox. *PLoS One* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075272>
- Hoang, T.T., Schweizer, H.P., 1999. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* 181, 5489-97.
- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J.M., Raoult, D., Elias, M., Silby, M.W., Bzdrenga, J., Bregeon, F., Chabriere, E., 2014. Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One* 9, 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107125>
- Hrenovic, J., Kovacevic, D., Ivankovic, T., Tibljas, D., 2011. Selective immobilization of *Acinetobacter junii* on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 88, 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.033>
- Huang, J.J., Han, J., Zhang, L., Leadbetter, J.R., 2003. Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil Pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5941-5949. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5941>
- Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M., Leadbetter, J.R., 2006. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1190-1197. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1190-1197.2006>
- Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu, P., Shen, J., Shao, Z., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046587>
- Hudaiberdiev, S., Choudhary, K.S., Vera Alvarez, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba,

- D., Pongor, S., 2015. Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00020>
- Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I., Yero, D., 2018. Quorum sensing signaling and quenching in the multidrug-resistant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 122. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00122>
- Hughes, C., Fenical, W., 2012. Antibacterials from the sea. *Chemistry (Easton)*. 42, 12512-12525. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid
- Hung, Y.-T., Lee, Y.-T., Huang, L.-J., Chen, T.-L., Yu, K.-W., Fung, C.-P., Cho, W.-L., Liu, C.-Y., 2009. Clinical characteristics of patients with *Acinetobacter junii* infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 42, 47-53.
- Hurley, M.N., Cámara, M., Smyth, A.R., 2012. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* <https://doi.org/10.1183/09031936.00042012>
- Ibrahim, A.Y., Youness, E.R., Mahmoud, M.G., Asker, M.S., El-Newary, S.A., 2020. Acidic Exopolysaccharide Produced from Marine *Bacillus amyloliquefaciens* 3MS 2017 for the Protection and Treatment of Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 14, 1178223420902075. <https://doi.org/10.1177/1178223420902075>
- Ionescu, M., Newman, K., Iavarone, A.T., Chatterjee, S., Lindow, S., Baccari, C., 2014. Production of *Xylella fastidiosa* Diffusible Signal Factor in Transgenic Grape Causes Pathogen Confusion and Reduction in Severity of Pierce's Disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 244-254. <https://doi.org/10.1094/mpmi-07-13-0197-fi>
- Ivanova, K., Fernandes, M.M., Francesko, A., Mendoza, E., Guezzuez, J., Burnet, M., 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. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09489>
- Jakšić, S., Uhtil, S., Petrak, T., Bažulić, D., Gumhalter Karolyi, L., 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control* 13, 491-493. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00027-0)
- Jayanetti, D.R., Braun, D.R., Barns, K.J., Rajski, S.R., Bugni, T.S., 2019. Bulbiferates A and B: Antibacterial Acetamidohydroxybenzoates from a Marine Proteobacterium, *Microbulbifer* sp. *J. Nat. Prod.* 82, 1930-1934. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00312>
- Jayaraman, A., Wood, T.K., 2008. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10, 145-167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F., Guse, D.G., 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.* 590-591.
- Jeng, Y.C., Wu, L., Wen, S.Y., 2009. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 48, 4344-4353. <https://doi.org/10.1021/bi9004045>
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., Yao, K., Song, D., 2019. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>
- Jiang, Z., Guo, Y., Wang, X., Li, H., Ni, H., Li, L., Xiao, A., Zhu, Y., 2019. Molecular

- cloning and characterization of AlgL17, a new exo-oligoalginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1. *Protein Expr. Purif.* 161, 17-27. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2019.03.015>
- Juni, E., Heym, G.A., 1986. *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: Genospecies Composed of Gram-Negative, Aerobic, Oxidase-Positive Coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 388-391. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-3-388>
- Kai, K., Ohnishi, H., Shimatani, M., Ishikawa, S., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., Tabuchi, M., Hikichi, Y., 2015. Methyl 3-Hydroxymyristate, a Diffusible Signal Mediating *phc* Quorum Sensing in *Ralstonia solanacearum*. *Chembiochem* 16, 2309-18. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500456>
- Kalia, V.C., 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol. Adv.* 31, 224-245. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
- Kalia, V.C., Patel, S.K.S., Kang, Y.C., Lee, J.K., 2019. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 37, 68-90. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.006>
- Kang, J.E., Han, J.W., Jeon, B.J., Kim, B.S., 2016. Efficacies of quorum sensing inhibitors, piericidin A and glucopiericidin A, produced by *Streptomyces xanthocidicus* KPP01532 for the control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Microbiol. Res.* 184, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.005>
- Katebian, L., Gomez, E., Skillman, L., Li, D., Ho, G., Jiang, S.C., 2016. Inhibiting quorum sensing pathways to mitigate seawater desalination RO membrane biofouling. *Desalination* 393, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.01.013>
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772-780.
- Kaufmann, G.F., Park, J., Mee, J.M., Ulevitch, R.J., Janda, K.D., 2008. The quorum quenching antibody RS2-1G9 protects macrophages from the cytotoxic effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone. *Mol. Immunol.* 45, 2710-2714. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.010>
- Kelly, R.C., Bolitho, M.E., Higgins, D.A., Lu, W., Ng, W.L., Jeffrey, P.D., Rabinowitz, J.D., Semmelhack, M.F., Hughson, F.M., Bassler, B.L., 2009. The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: Analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat. Chem. Biol.* 5, 891-895. <https://doi.org/10.1038/nchembio.237>
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of *Acidobacteria*: Moving beyond genes and genomes. *Front. Microbiol.* 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>
- Kim, C., Kim, J., Park, H.-Y., Park, H.-J., Lee, J.H., Kim, C.K., Yoon, J., 2008. Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 37. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1474-6>
- Kim, J.H., Lee, S.C., Kyeong, H.H., Kim, H.S., 2010. A genetic circuit system based on quorum sensing signaling for directed evolution of quorum-quenching enzymes. *ChemBioChem* 11, 1748-1753. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000033>
- Koonin, E. V., Makarova, K.S., Aravind, L., 2001. Horizontal Gene Transfer In

- Prokaryotes: Quantification and Classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 709-74. <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg07504>
- Kuley, E., Özogul, F., 2011. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chem.* 127, 1163-1168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.118>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumari, A., Pasini, P., Deo, S.K., Flomenhoft, D., Shashidhar, H., Daunert, S., 2006. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal. Chem.* 78, 7603-7609. <https://doi.org/10.1021/ac061421n>
- Kuo, A., Blough, N. V., Dunlap, P. V., 1994. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 176, 7558-65. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7558-7565.1994>
- Kusada, H., Tamaki, H., Kamagata, Y., Hanada, S., Kimura, N., 2017. A novel quorumquenching N-acylhomoserine lactone acylase from *Acidovorax* sp. strain MR-S7 mediates antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-17>
- Kwan, J.C., Meickle, T., Ladwa, D., Teplitski, M., Paul, V., Luesch, H., 2011. Lyngbyoic acid, a «tagged» fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biosyst.* 7, 1205-1216. <https://doi.org/10.1039/c0mb00180e>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lane, D., 1991. 16S/23S rRNA Sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. London, pp. 115–175.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S.A.B., Hardman, A., Downie, J.A., O’Gara, F., Williams, P., 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146, 2469-2480. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2469>
- Leadbetter, J.R., Greenberg, E.P., 2000. Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182, 6921-6926. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6921-6926.2000>
- Lee, J., Attila, C., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., Wood, T.K., 2009. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb. Biotechnol.* 2, 75-90. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00061.x>
- Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, K., Yu, H., Zhang, X., Choo, K.H., 2018. Quorum sensing and quenching in membrane bioreactors: Opportunities and challenges for biofouling control. *Bioresour. Technol.* 270, 656-668. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.019>
- Lee, S., Park, S.K., Kwon, H., Lee, S.H., Lee, K., Nahm, C.H., Jo, S.J., Oh, H.S., Park,

- P.K., Choo, K.H., Lee, C.H., Yi, T., 2016. Crossing the Border between Laboratory and Field: Bacterial Quorum Quenching for Anti-Biofouling Strategy in an MBR. *Environ. Sci. Technol.* 50, 1788-1795. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04795>
- Lee, W., Kim, M.A., Park, I.W., Hwang, J.S., Na, M.K., Bae, J.S., 2017. Novel direct factor Xa inhibitory compounds from *Tenebrio molitor* with anti-platelet aggregation activity. *Food Chem. Toxicol.* 109, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.026>
- Lefebvre, M.D., Valvano, M.A., 2002. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5956-64. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.5956-5964.2002>
- León-Palmero, E., Joglar, V., Álvarez, P.A., Martín-Platero, A., Llamas, I., Reche, I., 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLoS One* 13, e0196178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196178>
- Lerat, E., Moran, N.A., 2004. The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 21, 903-913. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh097>
- Li, H., Lee, B.C., Kim, T.S., Bae, K.S., Hong, J., Choi, S.H., Bao, B., Jung, J.H., 2008. Bioactive cyclic dipeptides from a marine sponge-associated bacterium, *Psychrobacter* sp. *Biomol. Ther.* 16, 356-363. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2008.16.4.356>
- Li, X., Qian, P., Wu, S.-G., Yu, H.-Y., 2014. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Idiomarina* sp. W33 and its application for biodiesel production using *Jatropha* oil. *Extremophiles* 18, 171-178. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0610-0>
- Li, Z., Nair, S.K., 2012. Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci.* 21, 1403-1417. <https://doi.org/10.1002/pro.2132>
- Liaqat, I., Bachmann, R.T., Edyvean, R.G.J., 2014. Type 2 Quorum Sensing Monitoring, Inhibition and Biofilm Formation in Marine Microorganisms. *Curr. Microbiol.* 68, 342-351. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0484-5>
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Leong Ong, S., Renton Leadbetter, J., Zhang, L.H., 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47, 849-860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x>
- Linde, H.J., Hahn, J., Holler, E., Reischl, U., Lehn, N., 2002. Septicemia due to *Acinetobacter junii*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2696-2697. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2696-2697.2002>
- Lintz, M.J., Oinuma, K.-I., Wysoczynski, C.L., Greenberg, E.P., Churchill, M.E.A., 2011. Crystal structure of QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 15763-15768. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112398108>
- Lira, F., Berg, G., Martínez, J.L., 2017. Double-face meets the bacterial world: The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 8, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02190>
- Liu, C., Guo, S., Turak, A., Zhang, J., Zhang, L., 2017. AidE encodes an N-acyl homoserine lactonase in *Acinetobacter*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 33, 1625-1639. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.170156>

- Liu, J., Fu, K., Wu, C., Qin, K., Li, F., Zhou, L., 2018. «In-Group» communication in marine *Vibrio*: A review of N-Acyl Homoserine Lactones-Driven Quorum Sensing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00139>
- Liu, N., Yu, M., Zhao, Y., Cheng, J., An, K., Zhang, X.H., 2017. PfmA, a novel quorum-quenching N-acylhomoserine lactone acylase from *Pseudoalteromonas flavipulchra*. *Microbiol. (United Kingdom)* 163, 1389-1398. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000535>
- Liu, P., Chen, Y., Shao, Z., Chen, J., Wu, J., Guo, Q., Shi, J., Wang, H., Chu, X., 2019. AhlX, an N-acylhomoserine Lactonase with Unique Properties. *Mar. Drugs* 17, 387. <https://doi.org/10.3390/md17070387>
- Liu, X., Cao, L.C., Fan, X.J., Liu, Y.H., Xie, W., 2016. Engineering of a thermostable esterase Est816 to improve its quorum-quenching activity and the underlying structural basis. *Sci. Rep.* 6, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep38137>
- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J.A., Quesada, E., Béjar, V., 2012. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* 17, 7103-20. <https://doi.org/10.3390/molecules17067103>
- Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Gronquist, M., Eberhard, A., 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. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0448-1>
- Lotz, M.J., Tamplin, M.L., Rodrick, G.E., 1983. Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 13, 45-48.
- Lu, C., Kirsch, B., Zimmer, C., de Jong, J.C., Henn, C., Maurer, C.K., Müsken, M., Häussler, S., Steinbach, A., Hartmann, R.W., 2012. Discovery of Antagonists of PqsR, a Key Player in 2-Alkyl-4-quinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* 19, 381-390. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2012.01.015>
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E.R., Williams, P., 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* 4, 18-28. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00264.x>
- Ma, Z.-P., Song, Y., Cai, Z.-H., Lin, Z.-J., Lin, G.-H., Wang, Y., Zhou, J., 2018. Anti-quorum Sensing Activities of Selected Coral Symbiotic Bacterial Extracts From the South China Sea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00144>
- Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Innocente, N., Biasutti, M., Marino, M., 2013. Identification of the *Enterobacteriaceae* in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *J. Dairy Res.* 80, 122-127. <https://doi.org/10.1017/S002202991200074X>
- Malve, H., 2016. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 8, 83. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>
- Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 148, 1119-1127. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1119>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow,

- M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614-29. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mansson, M., Nielsen, A., Kjærulff, L., Gotfredsen, C.H., Wietz, M., Ingmer, H., Gram, L., Larsen, T.O., 2011. Inhibition of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus* by Novel Depsipeptides from a Marine Photobacterium. *Mar. Drugs* 9, 2537-2552. <https://doi.org/10.3390/md9122537>
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y., Bryant, S.H., 2017. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45, D200-D203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>
- Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H., 2004. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32, W327-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh454>
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S.H., 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, D222-D226. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Landete, J.M., Tabera, L., Muñoz, R., 2012. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 448-467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500545>
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G., 2000. The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 169-173. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00783.x>
- Marketon, M.M., Gronquist, M.R., Eberhard, A., González, J.E., 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* 184, 5686-95. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5686-5695.2002>
- Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Martín, J., Crespo, G., González-Menéndez, V., Pérez-Moreno, G., Sánchez-Carrasco, P., Pérez-Victoria, I., Ruiz-Pérez, L.M., González-Pacanowska, D., Vicente, F., Genilloud, O., Bills, G.F., Reyes, F., 2014. MDN-0104, an Antiplasmodial Betaine Lipid from *Heterospora chenopodii*. *J. Nat. Prod.* 77, 2118-2123. <https://doi.org/10.1021/np500577v>
- Martínez-Matamoros, D., Laiton-Fonseca, M., Duque, C., Ramos, F.A., Castellanos, L., 2016. Búsqueda de bacterias marinas como fuente de inhibidores quorum sensing. *Vitae* 23, 30-47.
- Mayer, C., Muras, A., Romero, M., López, M., Tomás, M., Otero, A., 2018. Multiple Quorum Quenching Enzymes Are Active in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1-16.

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00310>
- Mayer, C., Romero, M., Muras, A., Otero, A., 2015. Aii20J, a wide-spectrum thermostable N-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum sp.* 20J, can quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9523-9539. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6741-8>
- Mcclean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., John, H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. a B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703-3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- Mei, G.Y., Yan, X.X., Turak, A., Luo, Z.Q., Zhang, L.Q., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.00477-10>
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Göker, M., 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Meron, D., Buia, M.-C., Fine, M., Banin, E., 2013. Changes in Microbial Communities Associated with the Sea Anemone *Anemonia viridis* in a Natural pH Gradient. *Microb. Ecol.* 65, 269-276. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0127-6>
- Migiyama, Y., Kaneko, Y., Yanagihara, K., Morohoshi, T., Morinaga, Y., Nakamura, S., Miyazaki, T., Hasegawa, H., Izumikawa, K., Takeya, H., Kohrogi, H., Kohno, S., 2013. Efficacy of AiiM, an N-Acylhomoserine Lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a Mouse Model of Acute Pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3653-3658. <https://doi.org/10.1128/aac.00456-13>
- Milton, D.L., 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.044>
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3537-3547.2001>
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., 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, 3004-12. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.3004-3012.1997>
- Minagawa, S., Inami, H., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J., Gotoh, N., 2012. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* 12, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-70>
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., 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. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00125-9)
- Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G., Duffy, B., 2005. Autoinduction in *Erwinia amylovora*: Evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight

- pathogen. *J. Bacteriol.* 187, 3206-3213. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3206-3213.2005>
- Momb, J., Thomas, P.W., Breece, R.M., Tierney, D.L., Fast, W., 2006. The quorum-quenching metallo- γ -lactonase from *Bacillus thuringiensis* exhibits a leaving group thio effect. *Biochemistry* 45, 13385-13393. <https://doi.org/10.1021/bi061238o>
- Moore, J.D., Gerdt, J.P., Eibergen, N.R., Blackwell, H.E., 2014. Active efflux influences the potency of quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemBioChem* 15, 435-442. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300701>
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B., 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol.* 9, e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T., 2008a. N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.* 279, 124-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., Ikeda, T., 2008b. Identification and Characterization of N -Acylhomoserine Lactone-Acylase from the Fish Intestinal *Shewanella* sp. Strain MIB015. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1887-1893. <https://doi.org/10.1271/bbb.80139>
- Morohoshi, T., Tominaga, Y., Someya, N., Ikeda, T., 2012. Complete genome sequence and characterization of the N-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.006>
- Mourey, A., Kilbertus, G., 1976. Simple Media Containing Stabilized Tributyrin for Demonstrating Lipolytic Bacteria in Foods and Soils. *J. Appl. Bacteriol.* 40, 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb00589.x>
- Mueller, R.S., Beyhan, S., Saini, S.G., Yildiz, F.H., Bartlett, D.H., 2009. Indole Acts as an Extracellular Cue Regulating Gene Expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 191, 3504-3516. <https://doi.org/10.1128/JB.01240-08>
- Mukherjee, P., Roy, P., 2016. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Front. Microbiol.* 7, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967>
- Mukherji, R., Varshney, N.K., Panigrahi, P., Suresh, C.G., Prabhune, A., 2014. A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* 56, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.010>
- Muras, A., López-Pérez, M., Mayer, C., Parga, A., Amaro-Blanco, J., Otero, A., 2018. High prevalence of quorum-sensing and quorum-quenching activity among cultivable bacteria and metagenomic sequences in the mediterranean sea. *Genes (Basel)*. 9, 1-20. <https://doi.org/10.3390/genes9020100>
- Murugayah, S.A., Gerth, M.L., 2019. Engineering quorum quenching enzymes: progress and perspectives. *Biochem. Soc. Trans.* 0, BST20180165. <https://doi.org/10.1042/bst20180165>
- Musthafa, K.S., Saroja, V., Pandian, S.K., Ravi, A.V., 2011. Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine- lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *J. Biosci.* 36, 55-67. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9011-7>

- Nasuno, E., Kimura, N., Fujita, M.J., Nakatsu, C.H., Kamagata, Y., Hanada, S., 2012. Phylogenetically novel LuxI/LuxR-type quorum sensing systems isolated using a metagenomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8067-8074. <https://doi.org/10.1128/AEM.01442-12>
- Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., Menon, V., 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 3, 32.
- Natrah, F.M.I., Alam, M.I., Pawar, S., Harzevili, A.S., Nevejan, N., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2012. The impact of quorum sensing on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota* L.) larvae. *Vet. Microbiol.* 159, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.014>
- Natrah, F.M.I., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Disruption of Bacterial Cell-to-Cell Communication by Marine Organisms and its Relevance to Aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 13, 109-126. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9346-3>
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313-22.
- Newman, J.R., Fuqua, C., 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* 227, 197-203. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00601-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00601-5)
- Ng, W.-L., Bassler, B.L., 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* 43, 197-222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
- Nhan, D.T., Cam, D.T. V, Wille, M., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., 2010. Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1007-1016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04728.x>
- Niu, B., Paulson, J.N., Zheng, X., Kolter, R., 2017. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2450-E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
- O'Toole, G.A., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Ochiai, S., Morohoshi, T., Kurabeishi, A., Shinozaki, M., Fujita, H., Sawada, I., Ikeda, T., 2013. Production and Degradation of N -Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signal Molecules in Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2436-2440. <https://doi.org/10.1271/bbb.130553>
- Ochiai, S., Yasumoto, S., Morohoshi, T., Ikeda, T., 2014. AmiE, a novel N-Acylhomoserine Lactone acylase belonging to the Amidase family, from the activated-sludge isolate *Acinetobacter* sp. strain Ooi24. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6919-6925. <https://doi.org/10.1128/AEM.02190-14>
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., Reiser, J., 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 2044-54. <https://doi.org/10.1128/jb.176.7.2044-2054.1994>
- Ohadi, M., Forootanfar, H., Rahimi, H.R., Jafari, E., Shakibaie, M., Eslaminejad, T.,

- Dehghannoudeh, G., 2017. Antioxidant Potential and Wound Healing Activity of Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18, 900-908. <https://doi.org/10.2174/1389201018666171122121350>
- Ohtani, K., Yuan, Y., Hassan, S., Wang, R., Wang, Y., Shimizu, T., 2009. Virulence Gene Regulation by the *agr* System in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 191, 3919-3927. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-08>
- Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56-63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Ortori, C.A., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., 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. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0710-0>
- Otero, A.M., Romero, M., Mayer, C., 2014. Péptido con actividad inhibidora de quorum sensing, polinucleótido que codifica dicho péptido y sus aplicaciones. *WO 2015/004305 A1*.
- Pachori, P., Gothwal, R., Gandhi, P., 2019. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 6, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Padmavathi, A.R., Abinaya, B., Pandian, S.K., 2014. Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*. *Biofouling* 30, 1111-1122. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.972386>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K., 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1871-1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Pan, Y., Wang, Y., Yan, X., Liu, C., Wu, B., He, X., Liang, Y., 2019. Quorum Quenching Enzyme APTM01, an Acylhomoserine-Lactone Acylase from Marine Bacterium of *Pseudoalteromonas tetraodonis* Strain MQS005. *Curr. Microbiol.* 76, 1387-1397. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01739-z>
- Pande, G.S.J., Scheie, A.A., Benneche, T., Wille, M., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2013. Quorum sensing-disrupting compounds protect larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* from *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 406-407, 121-124. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.05.015>
- Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576-588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Park, J., Jagasia, R., Kaufmann, G.F., Mathison, J.C., Ruiz, D.I., Moss, J.A., Meijler, M.M., Ulevitch, R.J., Janda, K.D., 2007. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem. Biol.* 14, 1119-27. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.08.013>
- Park, S., Kang, H., Jang, H., Koo, B., Yum, D., Park, S., Kang, H., Jang, H., Lee, J., Koo, B., 2005. Identification of Extracellular N -Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp. and Its Application to Quorum Quenching. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2632-2641. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2632>
- Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Yum, D.Y., Lee, J.K., 2003. AhID,

- an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149, 1541-1550. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26269-0>
- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E., Ladner, J.E., 2003. Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry* 42, 5684-5693. <https://doi.org/10.1021/bi027385d>
- Penesyanyan, A., Gillings, M., Paulsen, I.T., 2015. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules* 20, 5286-5298. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>
- Pérez-Victoria, I., Martín, J., Reyes, F., 2016. Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products. *Planta Med.* 82, 857-871. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101763>
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 362-370.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., 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, 2467-76.
- Polkade, A. V, Mantri, S.S., Patwekar, U.J., Jangid, K., 2016. Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the *Phylum Actinobacteria*. *Front. Microbiol.* 7, 131. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00131>
- Prescott, R.D., Decho, A.W., 2020. Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature. *Trends Microbiol.* 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.004>
- Prester, L., 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit. Contam.* 28, 1547-1560.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641-1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>
- Proctor, C.R., McCarron, P.A., Ternan, N.G., 2020. Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 69, 195-206. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001144>
- Pyeon, H.-M., Lee, Y.-S., Choi, Y.-L., 2019. Cloning, purification, and characterization of GH3 β -glucosidase, MtBgl85, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *PeerJ* 7, e7106. <https://doi.org/10.7717/peerj.7106>
- Quiñones, B., Dulla, G., Lindow, S.E., 2005. Exopolysaccharide Production, Motility, and Virulence in *Pseudomonas syringae*. *Society* 18, 682-693. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0682>
- Rader, B.A., Campagna, S.R., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., Guillemin, K., 2007. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 189, 6109-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00246-07>
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., Ekmann, K.S., Larsen, J.L., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M., Gram, L., 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 350-359. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00268>
- Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117-128.

<https://doi.org/10.1038/nrd3013>

- Rasmussen, B.B., Nielsen, K.F., MacHado, H., Melchiorson, J., Gram, L., Sonnenschein, E.C., 2014. Global and phylogenetic distribution of quorum sensing signals, acyl homoserine lactones, in the family of *Vibrionaceae*. *Mar. Drugs* 12, 5527-5546. <https://doi.org/10.3390/md12115527>
- Rehman, Z.U., Leiknes, T., 2018. Quorum-quenching bacteria isolated from red sea sediments reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 9, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01354>
- Ren, D., Zuo, R., Wood, T.K., 2005. Quorum-sensing antagonist (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 689-695. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1691-6>
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., Faure, D., 2008. A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ. Microbiol.* 10, 560-570. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01475.x>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19126-19131.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J., 2015. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32, 929-931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Riedel, C.U., Monk, I.R., Casey, P.G., Waidmann, M.S., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2009. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 71, 1177-1189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06589.x>
- Rodriguez-R, L.M., Konstantinidis, K.T., 2016. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr.* 4, e1900v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., 2020. Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Sci. Rep.* 10, 4121. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>
- Romanenko, L. a, Schumann, P., Rohde, M., Lysenko, A.M., Mikhailov, V. V, Stackebrandt, E., 2002. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1291-1297.
- Romanenko, L.A., Tanaka, N., Frolova, G.M., Mikhailov, V. V., 2009. *Psychrobacter fulvigenes* sp. nov., isolated from a marine crustacean from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1480-1486. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007195-0>
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Tanaka, N., Frolova, G.M., Slinkina, N.N., Mikhailov, V. V., 2008. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch. Microbiol.* 189, 337-344. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0324-8>
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., Ianora, A., 2017. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res.* 128, 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.002>

- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Cámara, M., Otero, A., 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol. Lett.* 280, 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x>
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A.B., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01266-12>
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A.B., Roca-Rivada, A., Cabello, A.M., Otero, A., 2011. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 205-217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01011.x>
- Romero, M., Mayer, C., Muras, A., Otero, A., 2015. Silencing Bacterial Communication Through Enzymatic Quorum-Sensing Inhibition, en: *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. Springer India, New Delhi, pp. 219-236. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8_19
- Romero, M., Muras, A., Mayer, C., Buján, N., Magariños, B., 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. <https://doi.org/10.3354/dao02697>
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I., 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C.-Y., Bentley, W.E., 2010. Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme. *ACS Chem. Biol.* 5, 223-32. <https://doi.org/10.1021/cb9002738>
- Rubio-Portillo, E., Yarza, P., Peñalver, C., Ramos-Esplá, A.A., Antón, J., 2014. New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp. communities. *ISME J.* 8, 1794-1807. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.33>
- Ruby, E.G., 1996. Lessons From A Cooperative, Bacterial-Animal Association: The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 591-624. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.591>
- Rustamova, N., Bobakulov, K., Begmatov, N., Turak, A., Yili, A., Aisa, H.A., 2019. Secondary metabolites produced by endophytic *Pantoea ananatis* derived from roots of *Baccharoides anthelmintica* and their effect on melanin synthesis in murine B16 cells. *Nat. Prod. Res.* 1-6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1597354>
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1-26. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D., Dow, J.M., 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 514-525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Ryu, D.-H., Lee, S.-W., Mikolaityte, V., Kim, Y.-W., Jeong, H.Y., Lee, S.J., Lee, C.-H., Lee, J.-K., 2020. Identification of a Second Type of AHL-lactonase from *Rhodococcus* sp. BH4, belonging to the α/β Hydrolase Superfamily. *J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.4014/jmb.1001.01006>

- Saeki, E.K., Kobayashi, R.K.T., Nakazato, G., 2020. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microb. Pathog.* 142, 104068. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104068>
- Safari, M., Amache, R., Esmailshirazifard, E., Keshavarz, T., 2014. Microbial metabolism of quorum-sensing molecules acyl-homoserine lactones, γ -heptalactone and other lactones. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3401-3412. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5518-9>
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 3.^a ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santhakumari, S., Nilofernisha, N.M., Ponraj, J.G., Pandian, S.K., Ravi, A.V., 2017. In vitro and in vivo exploration of palmitic acid from *Synechococcus elongatus* as an antibiofilm agent on the survival of *Artemia franciscana* against virulent vibrios. *J. Invertebr. Pathol.* 150, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.09.001>
- Saurav, K., Bar-Shalom, R., Haber, M., Burgsdorf, I., Oliviero, G., Costantino, V., Morgenstern, D., Steindler, L., 2016. In search of alternative antibiotic drugs: Quorum-quenching activity in sponges and their bacterial isolates. *Front. Microbiol.* 7, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00416>
- Saurav, K., Costantino, V., Venturi, V., Steindler, L., 2017. Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial N-acyl-homoserine lactone-based biosensors. *Mar. Drugs* 15, 53. <https://doi.org/10.3390/md15030053>
- Scapin, S.M.N., Souza, F.H.M., Zanphorlin, L.M., de Almeida, T.S., Sade, Y.B., Cardoso, A.M., Pinheiro, G.L., Murakami, M.T., 2017. Structure and function of a novel GH8 endoglucanase from the bacterial cellulose synthase complex of *Raoultella ornithinolytica*. *PLoS One* 12, e0176550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176550>
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01389-08>
- Schleheck, D., Barraud, N., Klebensberger, J., Webb, J.S., McDougald, D., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005513>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scoffone, V.C., Trespidi, G., Chiarelli, L.R., Barbieri, G., Buroni, S., 2019. Quorum sensing as antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20081838>
- SDS-PAGE Gel, 2015. . Cold Spring Harb. Protoc. 2015, pdb.rec087908. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec087908>
- See-Too, W.S., Ee, R., Lim, Y.L., Convey, P., Pearce, D.A., Yin, W.F., Chan, K.G., 2017. AidP, a novel N-acyl homoserine lactonase gene from Antarctic *Planococcus* sp. *Sci. Rep.* 7, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep42968>
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6036-6041. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
- Shepherd, R.W., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01723-08>
- Silverman, M., Martin, M., Engebrecht, J., 1989. Regulation of Luminescence in Marine Bacteria, en: *Genetics of Bacterial Diversity*. Academic Press, pp. 71-86. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-355575-5.50010-1>
- Singh, N., Romero, M., Travanut, A., Monteiro, P.F., Jordana-Lluch, E., Hardie, K.R., Williams, P., Alexander, M.R., Alexander, C., 2019. Dual bioresponsive antibiotic and quorum sensing inhibitor combination nanoparticles for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *in vitro* and *ex vivo*. *Biomater. Sci.* 7, 4099-4111. <https://doi.org/10.1039/C9BM00773C>
- Singh, P.K., Kushwaha, A., Hans, N., Gautam, A., Rani, R., 2019. Evaluation of the cytotoxicity and interaction of lead with lead resistant bacterium *Acinetobacter junii* Pb1. *Brazilian J. Microbiol.* 50, 223-230. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00041-1>
- Singh, V.K., Mishra, A., Jha, B., 2017. Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00337>
- Skindersoe, M.E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., de Nys, R., Givskov, M., 2008. Quorum Sensing Antagonism from Marine Organisms. *Mar. Biotechnol.* 10, 56-63. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9036-y>
- Smith, A.C., Rice, A., Sutton, B., Gabriliska, R., Wessel, A.K., Whiteley, M., Rumbaugh, K.P., 2017. Albumin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and alters polymicrobial interactions. *Infect. Immun.* 85, 1-12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00116-17>
- Song, Y., Cai, Z.H., Lao, Y.M., Jin, H., Ying, K.Z., Lin, G.H., Zhou, J., 2018. Antibiofilm activity substances derived from coral symbiotic bacterial extract inhibit biofouling by the model strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb. Biotechnol.* 11, 1090-1105. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13312>
- Sou, T., Kukavica-Ibrulj, I., Soukarieh, F., Halliday, N., Levesque, R.C., Williams, P., Stocks, M., Cámara, M., Friberg, L.E., Bergström, C.A.S., 2019. Model-Based Drug Development in Pulmonary Delivery: Pharmacokinetic Analysis of Novel Drug Candidates for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *J. Pharm. Sci.* 108, 630-640. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.017>
- Soukarieh, F., Oton, E.V., Dubern, J.F., Gomes, J., Halliday, N., De Pilar Crespo, M., Ramírez-Prada, J., Insuasty, B., Abonia, R., Quiroga, J., Heeb, S., Williams, P., Stocks, M.J., Cámara, M., 2018a. *In silico* and *in vitro*-guided identification of inhibitors of alkylquinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules* 23, 10385-10402. <https://doi.org/10.3390/molecules23020257>
- Soukarieh, F., Williams, P., Stocks, M.J., Cámara, M., 2018b. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *J. Med. Chem.* 61, 10385-10402. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00540>
- Sully, E.K., Malachowa, N., Elmore, B.O., Alexander, S.M., Femling, J.K., Gray, B.M., DeLeo, F.R., Otto, M., Cheung, A.L., Edwards, B.S., Sklar, L.A., Horswill, A.R., Hall, P.R., Gresham, H.D., 2014. Selective Chemical Inhibition of *agr* Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Promotes Host Defense with Minimal Impact

- on Resistance. PLoS Pathog. 10, e1004174. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004174>
- Sun, J.F., Wu, Y., Yang, B., Liu, Y., 2015. Chemical Constituents of Marine Sponge *Halichondria* sp. from South China Sea. Chem. Nat. Compd. 51, 975-977. <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1467-5>
- Sun, M.-L., Zhao, F., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhang, Y.-Z., Song, X.-Y., Sun, C.-Y., Yang, J., 2020. Promotion of Wound Healing and Prevention of Frostbite Injury in Rat Skin by Exopolysaccharide from the Arctic Marine Bacterium *Polaribacter* sp. SM1127. Mar. Drugs 18. <https://doi.org/10.3390/md18010048>
- Sun, S.-J., Liu, Y.C., Weng, C.H., Sun, S.W., Li, F., Li, H., Zhu, H., 2020. Cyclic dipeptides mediating quorum sensing and their biological effects in *Hypsizygus marmoreus*. Biomolecules 10, 298. <https://doi.org/10.3390/biom10020298>
- Sun, S., Dai, X., Sun, J., Bu, X., Weng, C., Li, H., Zhu, H., 2016. A diketopiperazine factor from *Rheinheimeria aquimaris* QSI02 exhibits anti-quorum sensing activity. Sci. Rep. 6, 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep39637>
- Sunder, A.V., Utari, P.D., Ramasamy, S., van Merkerk, R., Quax, W., Pundle, A., 2017. Penicillin V acylases from gram-negative bacteria degrade N-acylhomoserine lactones and attenuate virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 2383-2395. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8031-5>
- Tait, K., Hutchison, Z., Thompson, F.L., Munn, C.B., 2010. Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. Environ. Microbiol. Rep. 2, 145-150. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00122.x>
- Tan, C.H., Koh, K.S., Xie, C., Zhang, J., Tan, X.H., Lee, G.P., Zhou, Y., Ng, W.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2015. Community quorum sensing signalling and quenching: microbial granular biofilm assembly. Npj Biofilms Microbiomes 1, 15006.
- Tang, K., Su, Y., Brackman, G., Cui, F., Zhang, Y., Shi, X., Coenye, T., Zhang, X.H., 2015. MomL, a novel marine-derived N-Acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. Appl. Environ. Microbiol. 81, 774-782. <https://doi.org/10.1128/AEM.02805-14>
- Tannières, M., Beury-Cirou, A., Vigouroux, A., Mondy, S., Pellissier, F., Dessaux, Y., Faure, D., 2013. A Metagenomic Study Highlights Phylogenetic Proximity of Quorum-Quenching and Xenobiotic-Degrading Amidases of the AS-Family. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065473>
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., Ostell, J., 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res. 44, 6614-6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Teasdale, M.E., Donovan, K.A., Forscher-Dancause, S.R., Rowley, D.C., 2011. Gram-Positive Marine Bacteria as a Potential Resource for the Discovery of Quorum Sensing Inhibitors. Mar. Biotechnol. 13, 722-732. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9334-7>
- Teasdale, M.E., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F., Rowley, D.C., 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 75, 567-572. <https://doi.org/10.1128/AEM.00632-08>
- Tello, E., Castellanos, L., Duque, C., 2012. Disruption in Quorum-Sensing Systems

- and Bacterial Biofilm Inhibition by Cembranoid Diterpenes Isolated from the Octocoral *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* 75, 1637-1642.
- Ter Kuile, B.H., Kraupner, N., Brul, S., 2016. The risk of low concentrations of antibiotics in agriculture for resistance in human health care. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw210. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw210>
- Thompson, J.A., Oliveira, R.A., Djukovic, A., Ubeda, C., Xavier, K.B., 2015. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell Rep.* 10, 1861-71. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.049>
- Tiaden, A., Hilbi, H., 2012. α -hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors* 12, 2899-2919. <https://doi.org/10.3390/s120302899>
- Tinta, T., Kogovšek, T., Klun, K., Malej, A., Herndl, G.J., Turk, V., 2019. Jellyfish-associated microbiome in the marine environment: Exploring its biotechnological potential. *Mar. Drugs* 17, 1-33. <https://doi.org/10.3390/md17020094>
- Tommonaro, G., Abbamondi, G.R., Iodice, C., Tait, K., De Rosa, S., 2012. Diketopiperazines Produced by the Halophilic Archaeon, *Haloterrigena hispanica*, Activate AHL Bioreporters. *Microb. Ecol.* 63, 490-495. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9980-y>
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Haghkhah, M., Bossier, P., 2018. Identification of N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Bacteria Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.13891>
- Torres, M., Dessaux, Y., Llamas, I., 2019. Saline Environments as a Source of Potential Quorum Sensing Disruptors to Control Bacterial Infections: A Review. *Mar. Drugs* 17, 191. <https://doi.org/10.3390/md17030191>
- Torres, M., Reina, J.C., Fuentes-Monteverde, J.C., Fernandez, G., Rodriguez, J., Jiménez, C., Llamas, I., 2018. AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio spp.* reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS One* 13, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195176>
- 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. *Microbiol. Res.* 168, 547-554. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.011>
- Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A.A., 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. *Front. Microbiol.* 7, 646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00646>
- Torres, M., Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Quesada, E., Llamas, I., 2017. HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Sci. Rep.* 7, 943. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01176-7>
- Twigg, M.S., Tait, K., Williams, P., Atkinson, S., Cámara, M., 2014. Interference with the germination and growth of *Ulva* zoospores by quorum-sensing molecules from *Ulva*-associated epiphytic bacteria. *Environ. Microbiol.* 16, 445-453. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12203>
- Uroz, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27961-0>

- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y., 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26375-0>
- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger, P., 2009. Quorum sensing and quorum quenching: The Yin and Yang of bacterial communication. *ChemBioChem* 10, 205-216. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800521>
- Uroz, S., Oger, P.M., 2017. Screening for N-AHSL-based-signaling interfering enzymes, en: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp. 271-286. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2_18
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.T., Faure, D., Dessaux, Y., 2008. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1357-1366. <https://doi.org/10.1128/AEM.02014-07>
- Utari, P.D., Vogel, J., Quax, W.J., 2017. Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01123>
- Valiente, E., Bruhn, J.B., Nielsen, K.F., Larsen, J.L., Roig, F.J., Gram, L., Amaro, C., 2009. *Vibrio vulnificus* produces quorum sensing signals of the AHL-class. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 16-26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00691.x>
- Valliappan, K., Sun, W., Li, Z., 2014. Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7365-7377. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5954-6>
- Van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* 2, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Vázquez-Martínez, J., Buitemea-Cantúa, G. V, Gutierrez-Villagomez, J.M., García-González, J.P., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., 2020. Bioautography and GC-MS based identification of piperine and trichostachine as the active quorum quenching compounds in black pepper. *Heliyon* 6, e03137. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03137>
- Ventosa, A., 2006. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments, en: Logan, N.A., Lappin-Scott, H.M., Oyston, P.C.F. (Eds.), *Prokaryotic diversity*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-254. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754913.015>
- Venturi, V., Venuti, C., Devescovi, G., Lucchese, C., Friscina, A., Degrassi, G., Aguilar, C., Mazzucchi, U., 2004. The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.015>
- Vesty, E.F., Whitbread, A.L., Needs, S., Tanko, W., Jones, K., Halliday, N., Ghaderiardakani, F., Liu, X., Cámara, M., Coates, J.C., 2020. Cross-kingdom signalling regulates spore germination in the moss *Physcomitrella patens*. *Sci. Rep.* 10, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59467-5>
- von Bodman, S.B., Bauer, W.D., Coplin, D.L., 2003. Quorum Sensing In Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 455-482. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652>

- Wagner, S., Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R.W., Empting, M., Titz, A., 2016. Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Med. Chem.* 59, 5929-5969. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>
- Wang, J., Lin, J., Zhang, Y., Zhang, J., Feng, T., Li, H., Wang, X., Sun, Q., Zhang, X., Wang, Y., 2019. Activity improvement and vital amino acid identification on the marine-derived quorum quenching enzyme MomL by protein engineering. *Mar. Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/md17050300>
- Wang, T.N., Guan, Q.T., Pain, A., Kaksonen, A.H., Hong, P.Y., 2019. Discovering, characterizing, and applying acyl homoserine lactone-quenching enzymes to mitigate microbe-associated problems under saline conditions. *Front. Microbiol.* 10, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00823>
- Wang, W.Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., Ikeda, T., 2010. AiiM, a Novel Class of N-Acylhomoserine Lactonase from the Leaf-Associated Bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2524-2530. <https://doi.org/10.1128/AEM.02738-09>
- Wang, W.Z., Morohoshi, T., Someya, N., Ikeda, T., 2012. AiiC, a Novel N-Acylhomoserine Lactonase from the Potato Root-Associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) Group Bacterium *Chryseobacterium sp.* Strain strb126. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7985-7992. <https://doi.org/10.1128/AEM.02188-12>
- Wang, X., Huang, Y., Sheng, Y., Su, P., Qiu, Y., Ke, C., Feng, D., 2017. Antifouling activity towards mussel by small-molecule compounds from a strain of *Vibrio alginolyticus* bacterium associated with sea anemone *Haliplanella sp.* *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 460-470. <https://doi.org/10.4014/jmb.1607.07068>
- Weiland-Bräuer, N., Kisch, M.J., Pinnow, N., Liese, A., Schmitz, R.A., 2016. Highly effective inhibition of biofilm formation by the first metagenome-derived AI-2 quenching enzyme. *Front. Microbiol.* 7, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01098>
- Weng, L.-X., Yang, Y.-X., Zhang, Y.-Q., Wang, L.-H., 2014. A new synthetic ligand that activates QscR and blocks antibiotic-tolerant biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2565-2572. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5420-x>
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- WHO, 2017. Prioritization Of Pathogens To Guide Discovery, Research And Development Of New Antibiotics For Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis, WHO Press. Geneva.
- Winans, S.C., 2002. Bacterial Esperanto. *Nat. Struct. Biol.* 9, 83-84. <https://doi.org/10.1038/nsb0202-83>
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P., Stewart, G.S.A., 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N -acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 185-192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13044.x>
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P., 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum

- sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* 182, 6401-6411. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6401-6411.2000>
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W., 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-78. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>
- Wu, Gaobing, Zhang, X., Wei, L., Wu, Guojie, Kumar, A., Mao, T., Liu, Z., 2015. A cold-adapted, solvent and salt tolerant esterase from marine bacterium *Psychrobacter pacificensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.045>
- Wu, Y.-J., Cheng, C.-Y., Li, Y.-K., 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. <https://doi.org/10.1002/jccs.200900103>
- Yang, L., Rybtke, M.T., Jakobsen, T.H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2009. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2432-43. <https://doi.org/10.1128/AAC.01283-08>
- Yang, M., Yang, S.-X., Liu, Z.-M., Li, N.-N., Li, L., Mou, H.-J., 2019. Rational Design of Alginate Lyase from *Microbulbifer* sp. Q7 to Improve Thermal Stability. *Mar. Drugs* 17, 378. <https://doi.org/10.3390/md17060378>
- Yang, Q., Han, Y., Zhang, X.-H., 2011. Detection of quorum sensing signal molecules in the family *Vibrionaceae*. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1438-1448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04998.x>
- Yang, Q., Pande, G.S.J., Wang, Z., Lin, B., Rubin, R.A., Vora, G.J., Defoirdt, T., 2017. Indole signalling and (micro)algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environ. Microbiol.* 19, 1987-2004. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13714>
- Yaniv, K., Golberg, K., Kramarsky-Winter, E., Marks, R., Pushkarev, A., Bèjà, O., Kushmaro, A., 2017. Functional marine metagenomic screening for anti-quorum sensing and anti-biofilm activity. *Biofouling* 33, 1-13. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1253684>
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., Williams, P., 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, 5635-46. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5635-5646.2002>
- Ye, T., Zhou, T., Fan, X., Bhatt, P., Zhang, L., Chen, S., 2019. *Acinetobacter lactuca* Strain QL-1, a Novel Quorum Quenching Candidate Against Bacterial Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Front. Microbiol.* 10, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02867>
- Ye, X., Chai, W., Lian, X.-Y., Zhang, Z., 2017. Novel propanamide analogue and antiproliferative diketopiperazines from mangrove *Streptomyces* sp. Q24. *Nat. Prod. Res.* 31, 1390-1396. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1253079>
- Yoon, J.H., Lee, C.H., Oh, T.K., 2005. *Psychrobacter alimentarius* sp. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 733-736. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63208-0>

- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., Zhou, S., 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1137-1144. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1074-x>
- Zaman, S. Bin, Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., Hossain, N., 2017. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus* 9, e1403. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zang, T., Lee, B.W.K., Cannon, L.M., Ritter, K.A., Dai, S., Ren, D., Wood, T.K., Zhou, Z.S., 2009. A naturally occurring brominated furanone covalently modifies and inactivates LuxS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6200-6204. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2009.08.095>
- Zhang, H.-B., Wang, L.-H., Zhang, L.-H., 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4638-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.022056699>
- Zhang, M., Jiao, X.D., Hu, Y.H., Sun, L., 2009. Attenuation of *Edwardsiella tarda* virulence by small peptides that interfere with LuxS/autoinducer type 2 quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3882-3890. <https://doi.org/10.1128/AEM.02690-08>
- Zhang, Y., Ji, F., Wang, J., Pu, Z., Jiang, B., Bao, Y., 2018. Purification and characterization of a novel organic solvent-tolerant and cold-adapted lipase from *Psychrobacter sp.* ZY124. *Extremophiles* 22, 287-300. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-0997-8>
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., 2000. The Role of Chitinase Production by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3 in Biological Control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 90, 384-9. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.384>
- Zhao, J., Li, X., Hou, X., Quan, C., Chen, M., 2019. Widespread Existence of Quorum Sensing Inhibitors in Marine Bacteria: Potential Drugs to Combat Pathogens with Novel Strategies. *Mar. Drugs* 17, 275. <https://doi.org/10.3390/md17050275>
- Zhao, P., Li, G., Shen, Y., 2006. New Chemical Constituents from the Endophyte *Streptomyces* Species LR4612 Cultivated on *Maytenus hookeri*. *Chem. Biodivers.* 3, 337-342.
- Zhao, X., Yu, Z., Ding, T., 2020. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>
- Zhou, J.W., Luo, H.Z., Jiang, H., Jian, T.K., Chen, Z.Q., Jia, A.Q., 2018. Hordenine: A Novel Quorum Sensing Inhibitor and Antibiofilm Agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Agric. Food Chem.* 66, 1620-1628. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05035>
- Zhou, J.W., Ruan, L.Y., Chen, H.J., Luo, H.Z., Jiang, H., Wang, J.S., Jia, A.Q., 2019. Inhibition of Quorum Sensing and Virulence in *Serratia marcescens* by Hordenine. *J. Agric. Food Chem.* 67, 784-795. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05922>
- Zhou, L., Zhang, L.-H., Cámara, M., He, Y.-W., 2017. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends Microbiol.* 25, 293-303. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.11.013>

Anexo

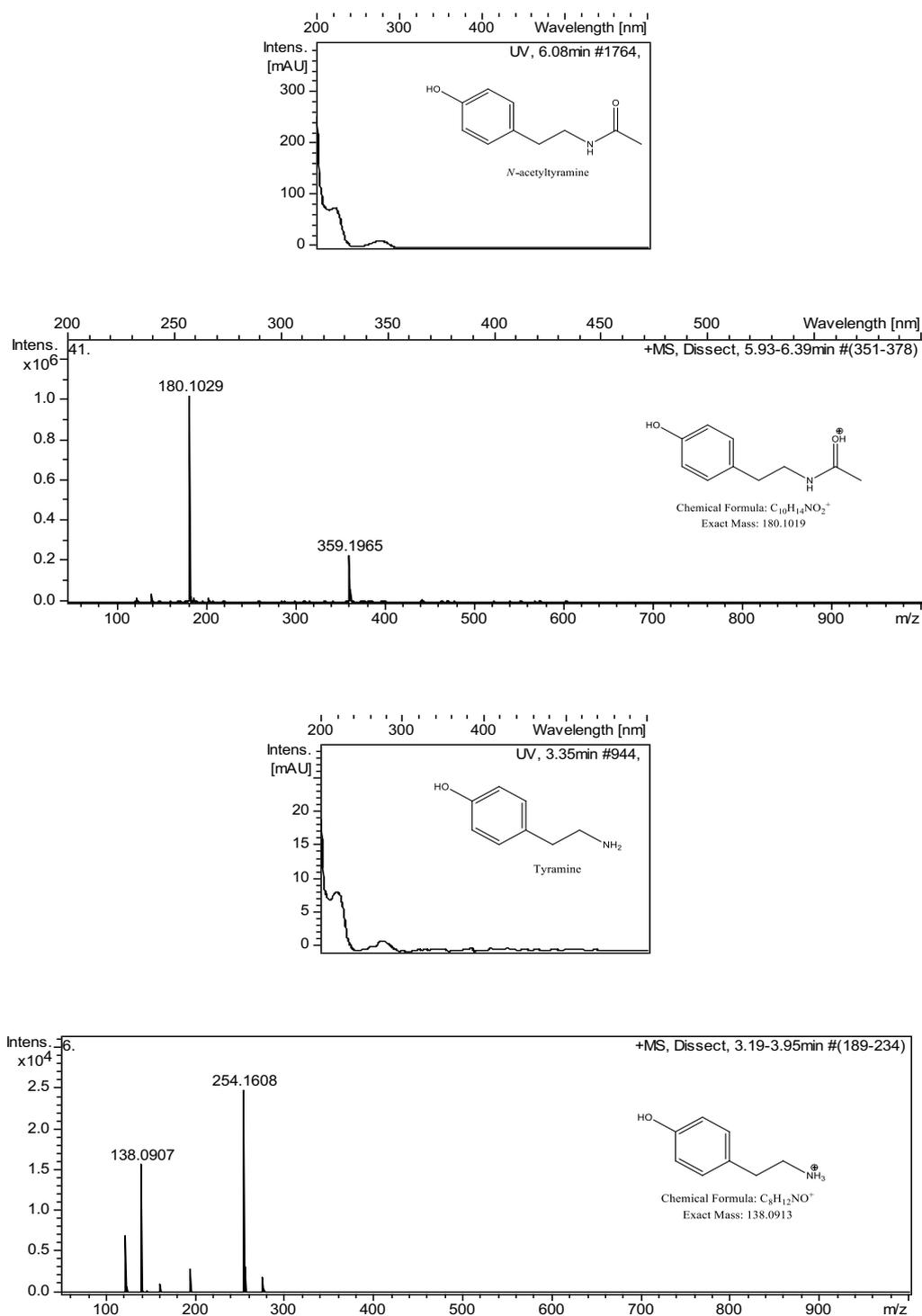


Figura Suplementaria 1. Espectros UV-Vis (DAD) y HRMS de *N*-acetiltiramina (dos espectros superiores) y tiramina (dos espectros inferiores) detectados después del análisis LC-DAD-HRMS de las tres fracciones de HPLC semipreparativa que demostraron actividad QSI.

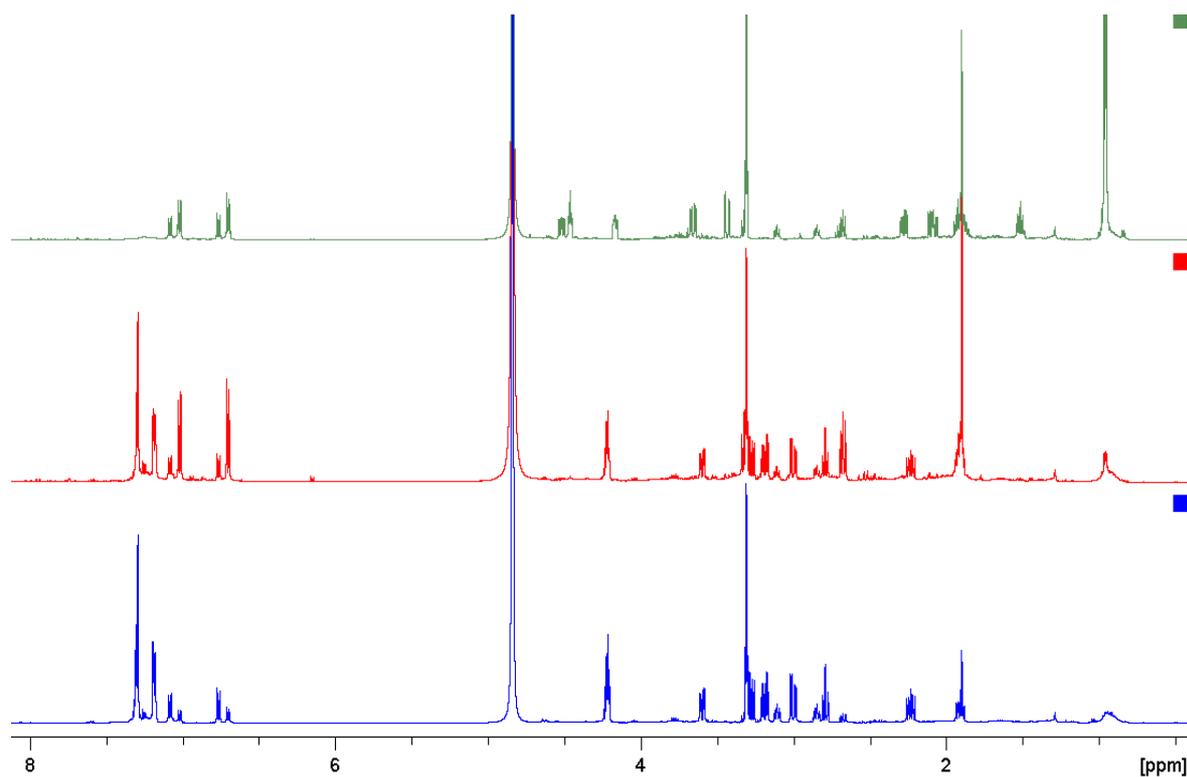


Figura Suplementaria 2. Espectro de RMN ¹H de las fracciones de HPLC 12 (verde), 13 (rojo) y 14 (azul), (500 MHz, CD₃OD).

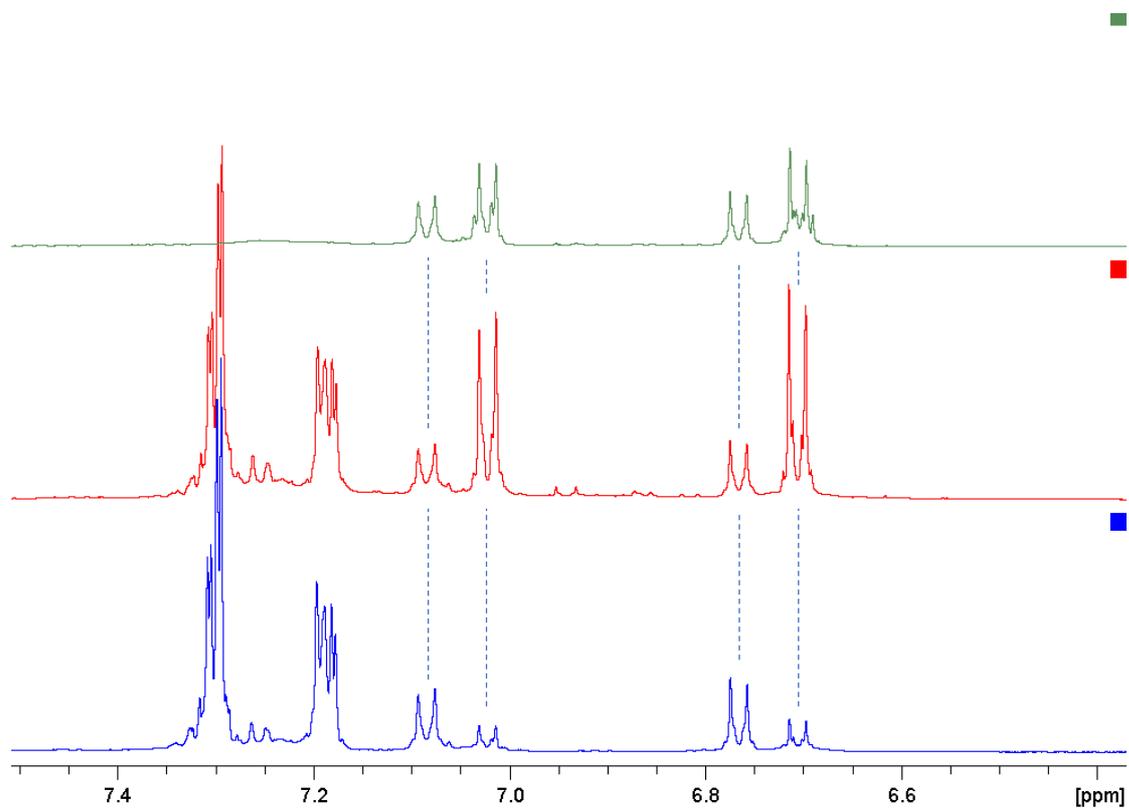


Figura Suplementaria 3. Expansión de la Figura Suplementaria 2, indicando las señales comunes aromáticas encontradas en los tres espectros.

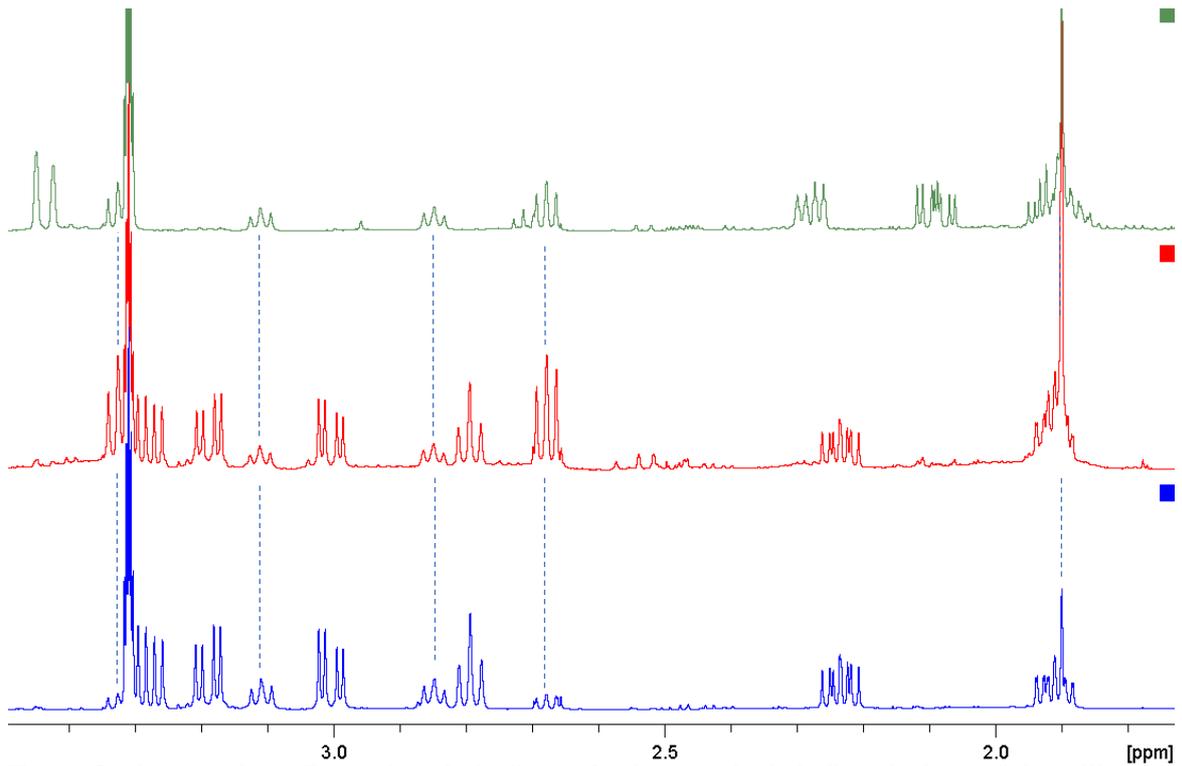


Figura Suplementaria 4. Expansión de la figura Suplementaria 2, indicando las señales alifáticas comunes encontradas en los tres espectros.

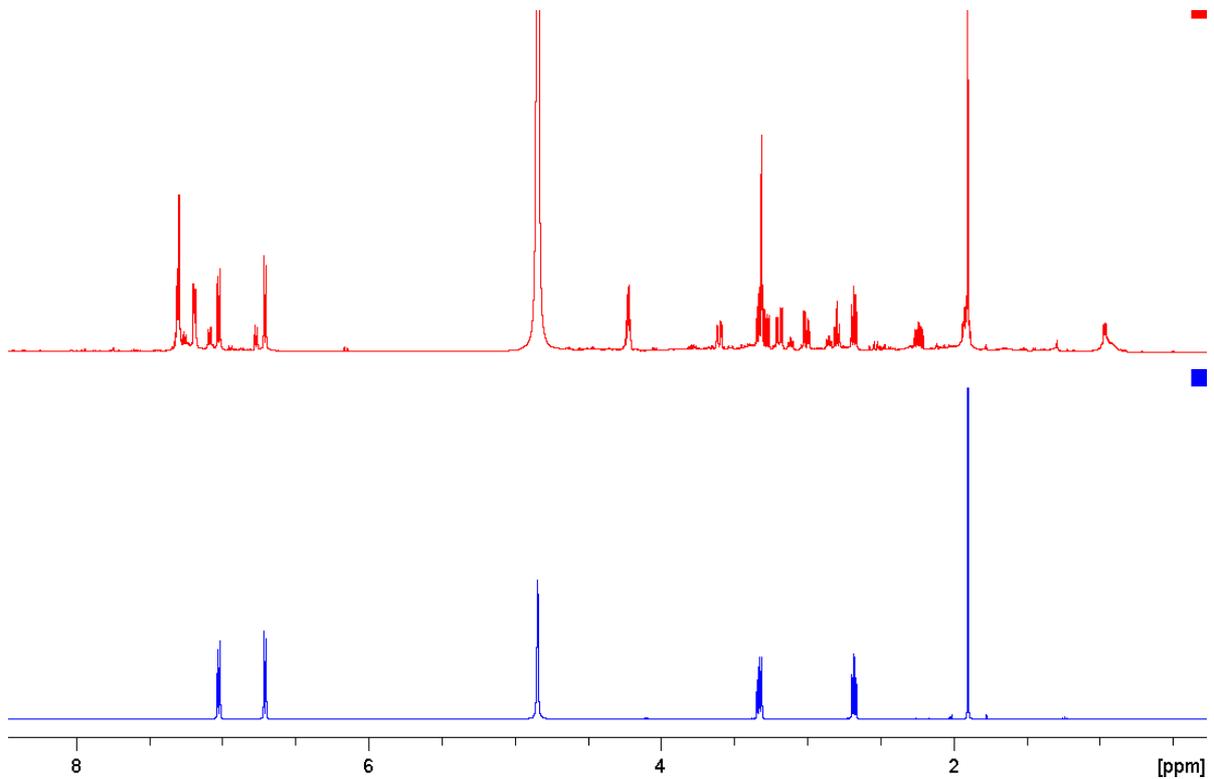


Figura Suplementaria 5. Espectro de RMN 1H de la fracción 13 (rojo) y del estándar de *N*-acetiltiramina (azul) (500 MHz, CD₃OD).

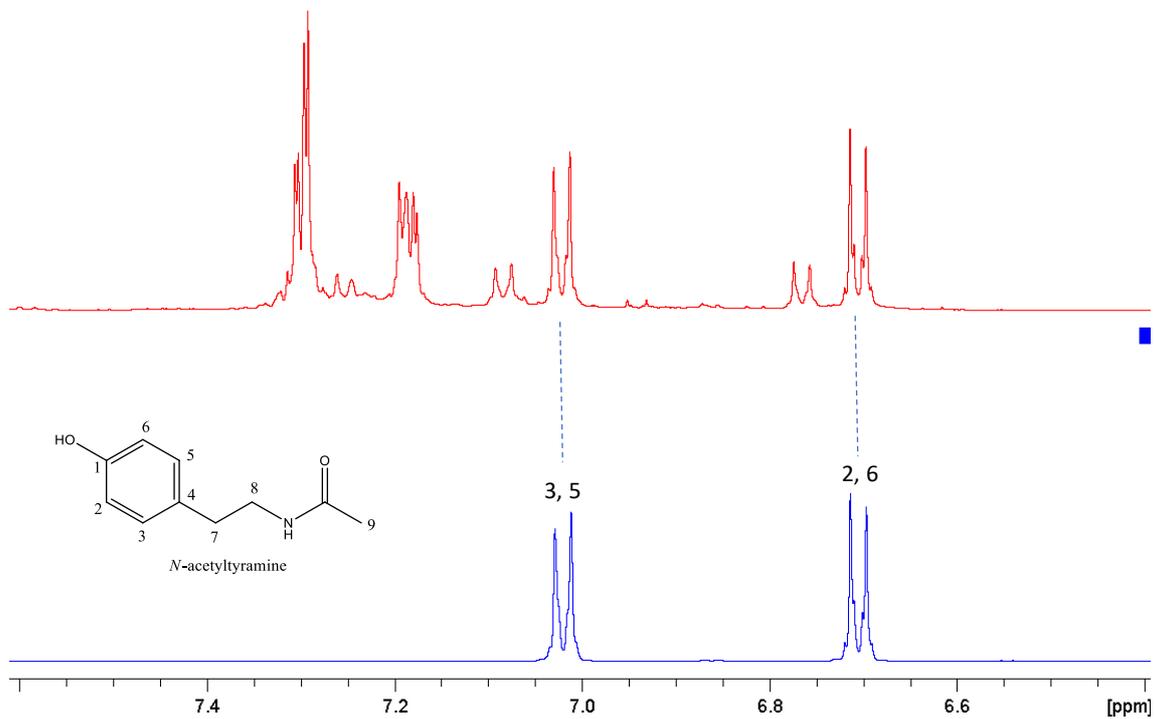


Figura Suplementaria 6. Expansión del espectro de la figura suplementaria 5, indicando la identificación de las señales aromáticas de *N*-acetiltiramina.

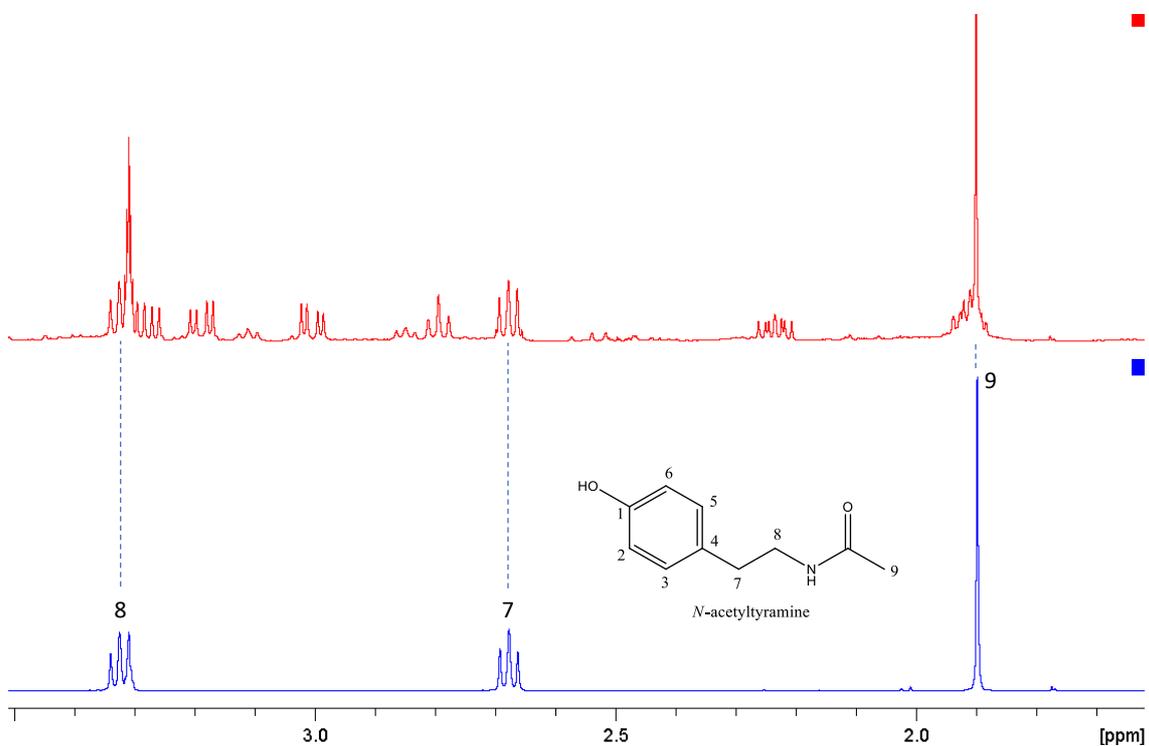


Figura Suplementaria 7. Otra expansión de la figura suplementaria 5, indicando la identificación de señales alifáticas de *N*-acetiltiramina.

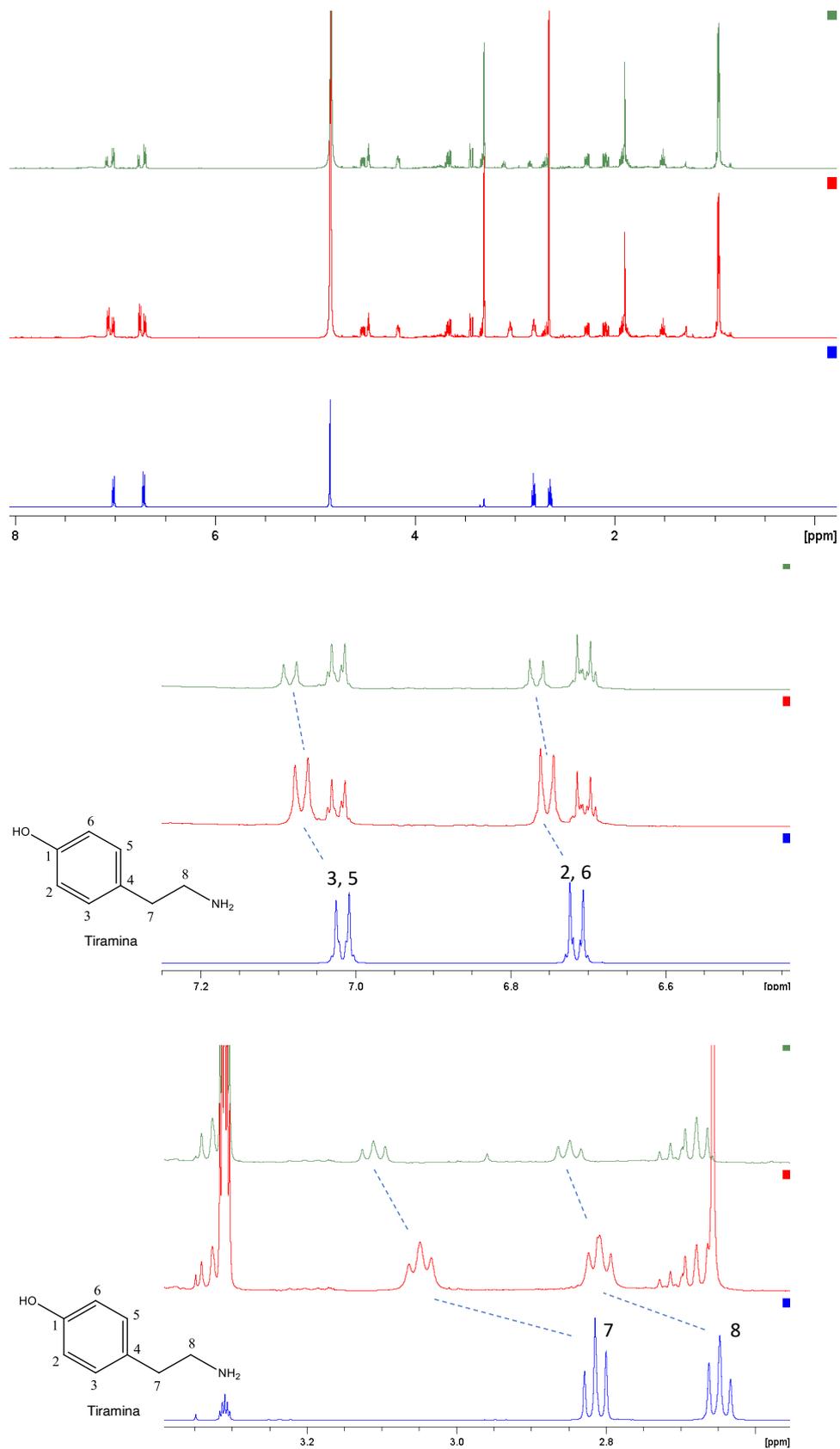


Figura Suplementaria 8. Espectro de RMN 1H de la fracción de HPLC activa número 12 (verde), la misma fracción inyectada junto con tiramina pura (rojo) y el estándar de tiramina (azul) (500 MHz, CD₃OD). Las expansiones indican la identificación de las señales aromáticas (la primera) y alifáticas (la segunda) de la tiramina.

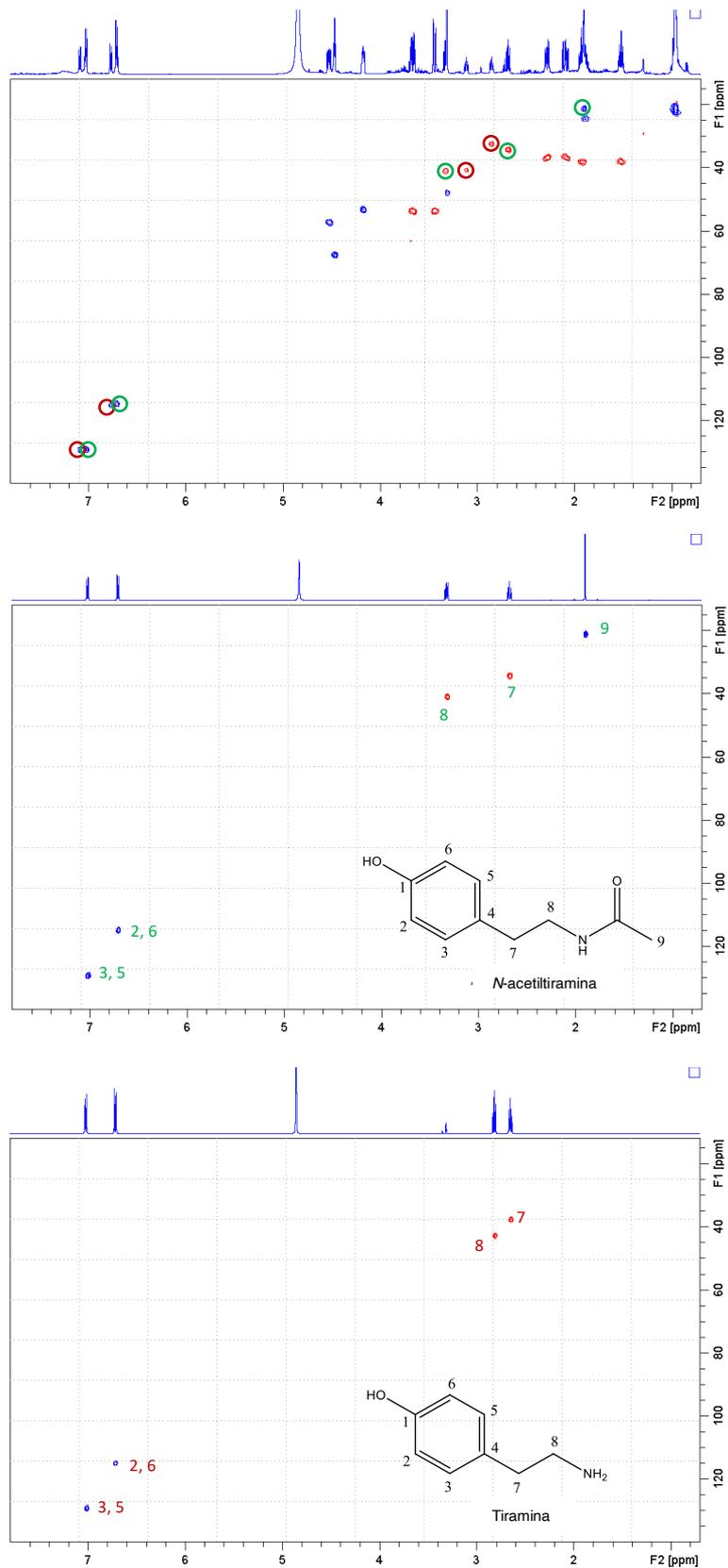


Figura Suplementaria 9. Espectros HSQC de la fracción activa 12 de HPLC (arriba), *N*-acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo). Las señales de estas dos moléculas están señaladas en el espectro superior, mientras que las no marcadas corresponden a ciclo (L-Leu-L-trans-4-hidroxiprolina).

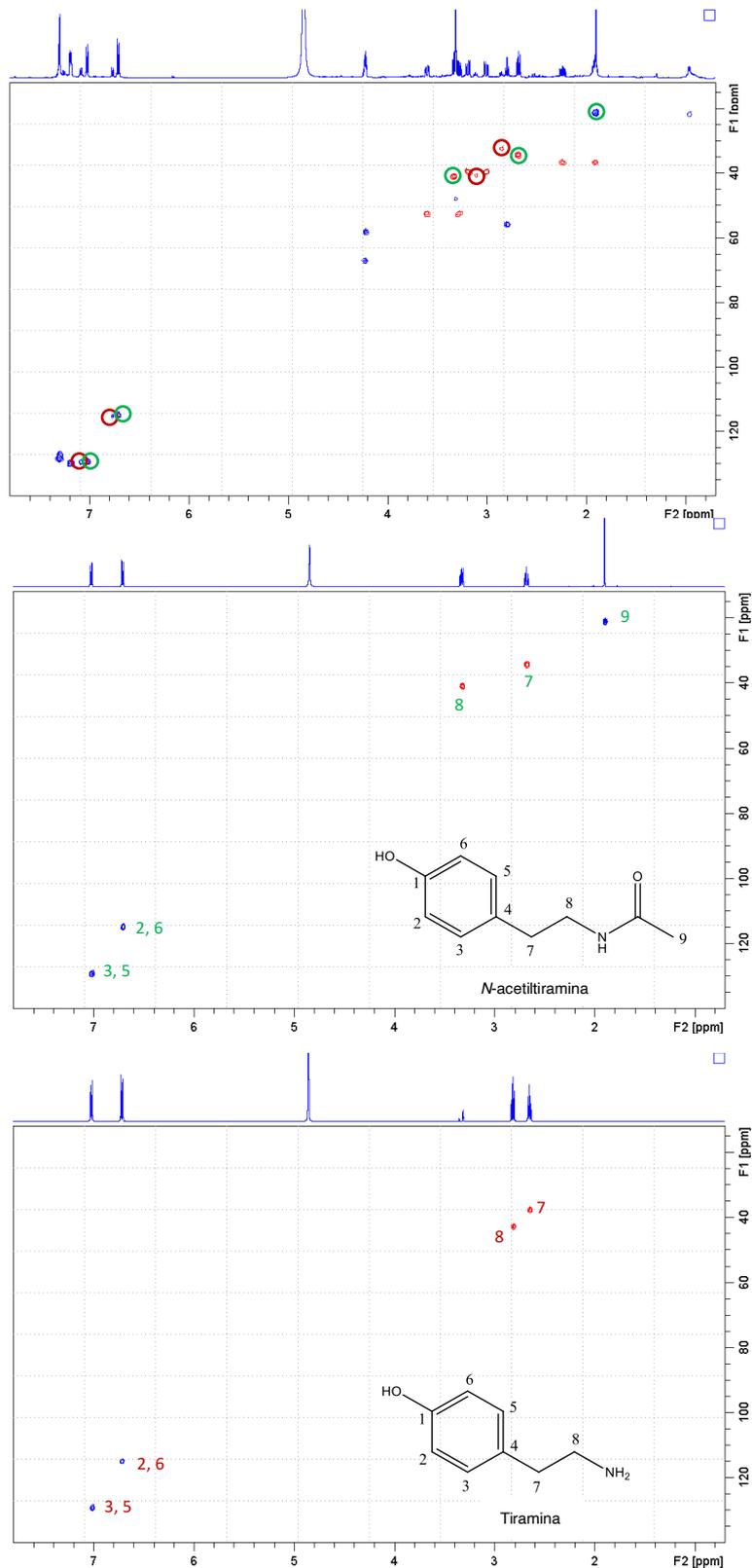


Figura Suplementaria 10. Espectros HSQC de la fracción activa 13 de HPLC (arriba), N-acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo). Las señales de estas dos moléculas están señaladas en el espectro superior, mientras que las no marcadas corresponden a ciclo(D-Phe-L-trans-4-hidroxiprolina).

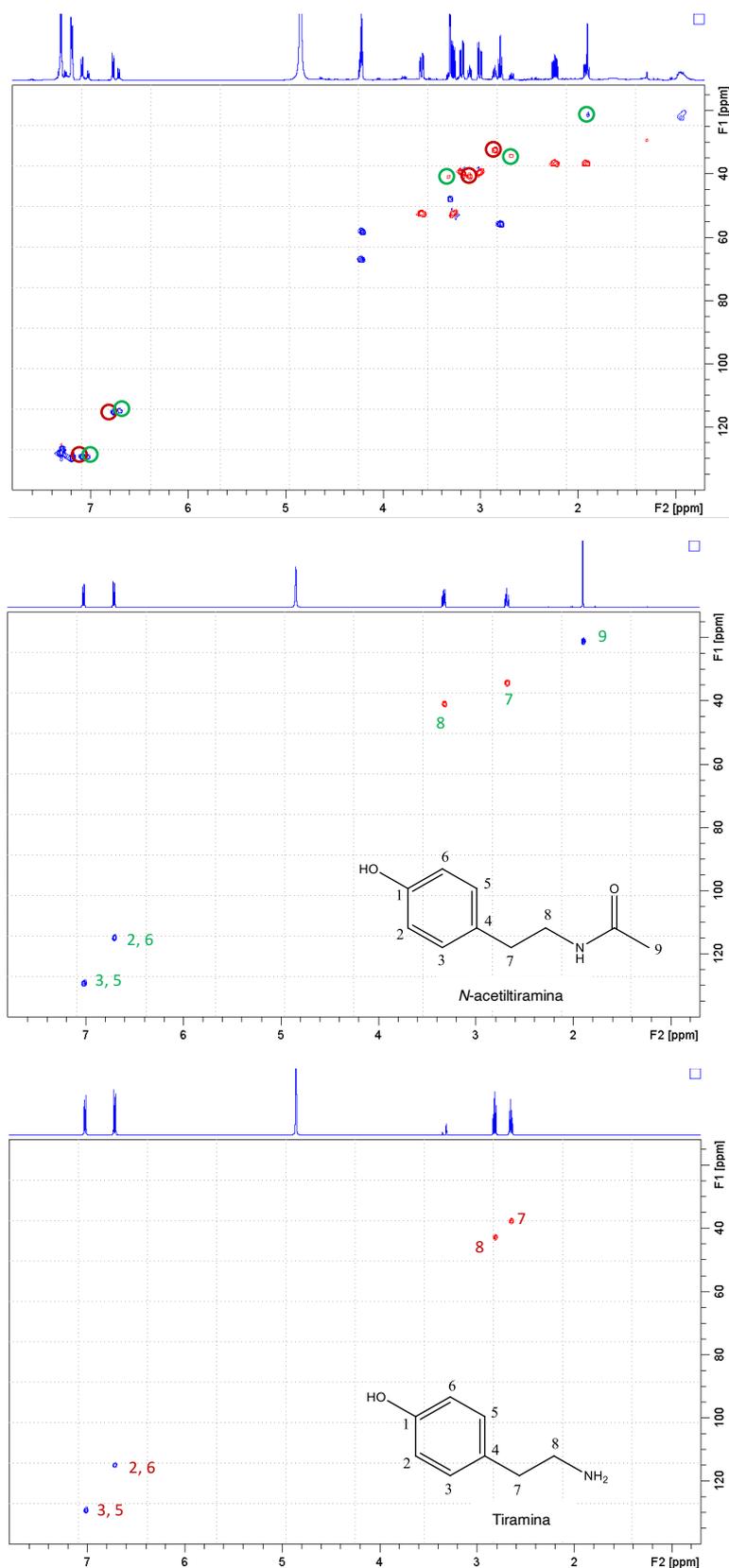


Figura Suplementaria 11. Espectros HSQC de la fracción activa 14 de HPLC (arriba), *N*-acetiltiramina (centro) y tiramina (abajo). Las señales de estas dos moléculas están señaladas en el espectro superior, mientras que las no marcadas corresponden a ciclo(D-Phe-L-trans-4-hidroxiprolina).

Tabla Suplementaria 1. Asignación de RMN (carbonos protonados) de tiramina y *N*-acetiltiramina observados en las 3 fracciones activas de HPLC (500 MHz, CD3OD).

Posición	Tiramina		<i>N</i> -acetiltiramina	
	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)
2, 6	115.3	6.77, d (8.4)	114.9	6.71, d (8.4)
3, 5	129.3	7.08, d (8.4)	129.3	7.02, d (8.4)
7	32.4	2.85, t (7.3)	34.3	2.68, t (7.4)
8	40.7	3.11, t (7.4)	41.0	3.33, t (7.4)
9	-	-	21.1	1.90, s

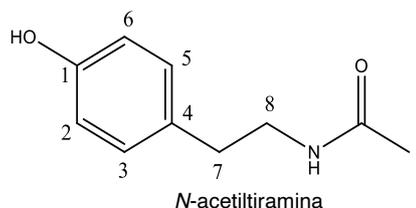
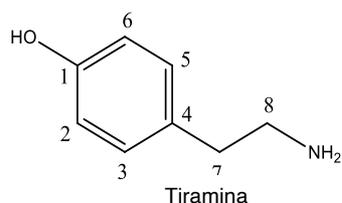


Tabla Suplementaria 2. Asignación de RMN (carbonos protonados) de los estándares de tiramina y *N*-acetiltiramina (500 MHz, CD3OD).

Posición	Tiramina		<i>N</i> -acetiltiramina	
	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)
2, 6	115.0	6.71, d (8.4)	114.9	6.71, d (8.4)
3, 5	129.3	7.01, d (8.4)	129.3	7.02, d (8.4)
7	37.7	2.65, t (7.2)	34.3	2.68, t (7.4)
8	42.9	2.81, t (7.2)	41.0	3.33, t (7.4)
9	-	-	21.1	1.90, s