



**Intercepción de señales de comunicación
bacteriana tipo *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs)
en bacterias aisladas del medio marino**

Memoria para optar
al Grado de Doctor en Biología que presenta
Manuel Romero Bernárdez

Santiago de Compostela, Mayo de 2010

Fdo: Manuel Romero Bernárdez



Ana María Otero Casal, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Biología, de la Universidad de Santiago de Compostela.

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada “Intercepción de señales de comunicación bacteriana tipo *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino”, que presenta D. Manuel Romero Bernárdez para optar al Grado de Doctor en Biología, fue realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, y autoriza su presentación.

Y para que así conste, firma la presente en Santiago de Compostela, Mayo 2010

Fdo: Dra. Ana Maria Otero Casal

A mis padres y a mi hermana

El trabajo contenido en la presente memoria ha sido parcialmente financiado por el proyecto titulado “Interceptación de Quorum: Una nueva aproximación al tratamiento de las infecciones bacterianas en acuicultura”, 2006-2009, de la Dirección Xeral de I+D, Xunta de Galicia.

Manuel Romero Bernárdez ha sido becario predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), en el período 2005-2009 y becario de investigación de la Diputación de A Coruña, en el período 2009-2010.

Se agradece al Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, el uso de infraestructura necesaria para la recogida de muestras de agua de mar oceánica.

AGRADECIMIENTOS

En estos momentos si echo la vista atrás se me ocurren un montón de personas que me han ayudado en todos estos años tanto a nivel profesional como personal por eso me gustaría dar las gracias:

A mi directora Ana María Otero Casal, por haberme dado la oportunidad de iniciar con ella el estudio de la comunicación bacteriana que tanto nos apasiona. Agradecerle por haberme guiado y orientado todo este tiempo de manera tan constructiva poniéndome los pies en la tierra algunas veces y animándome en otras en las que no estaba tan convencido. Su modo de ver la investigación y su rigor científico han sido y serán un ejemplo a seguir para mí.

A Jaime Fábregas Casal, por abrirme las puertas de su laboratorio en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia donde inicié mi investigación. Además de darme una visión más amplia de la ciencia y las posibles aplicaciones de los resultados de mi investigación.

A Miguel Cámara y Alicia Muro Pastor por acogerme en mis dos estancias en sus laboratorios de Nottingham y Sevilla donde he pasado momentos muy especiales y felices en un ambiente estupendo para trabajar.

A Ana Belén por sus aportaciones e importantes consejos como experta en bioinformática, a pesar de la época complicada en la que fueron solicitados por su avanzado embarazo.

A mis padres M^a Carmen y Alfredo, a mi hermana Paula y a mi abuela Genoveva, por ser las personas más importantes y cercanas que me han apoyado siempre, sin ellos nada de esto sería posible (aunque yo no contara demasiado...). También gracias a toda mi familia por estar tan unidos y siempre ahí.

A Sophie que me ha dado mucha ilusión y energía haciendo que este trabajo adquiriera otro significado. Tú me has dado ese fuerte impulso que necesitaba.

A mis amigos y compañeros: Pedro, Javi, Julio, Chus, Rubén, Mario, Rafa, Samuel, Mónica, Steve, Stephan, Ana Maseda, Benito, José Ángel, Paula, Martinha, Fito, Arturo y Ana María; por su compañía, consejos, paciencia y ayuda durante mi tesis.

Finalmente gracias a toda la gente que he conocido y que no he nombrado, especialmente a quien está a punto de leer los detalles de esta memoria, espero que mi trabajo contribuya de alguna manera al tuyo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Comunicación bacteriana dependiente de densidad celular o quorum sensing.....	3
1.1 Definición de quorum sensing.....	3
1.2 Señales de quorum sensing.....	5
2. Quorum sensing mediado por AHLs.....	9
2.1 El sistema LuxI/LuxR de quorum sensing.....	9
2.2 Sistemas de detección de AHLs.....	12
2.3 Quorum sensing y biopelículas.....	14
3. Interceptación de quorum sensing: quorum quenching.....	16
3.1 Estrategias de quorum quenching.....	16
3.2 Degradación enzimática de AHLs: Acilasas y lactonasas.....	19
3.3 Antagonistas de receptor de AHL.....	24
3.4 Aplicaciones prácticas de quorum quenching.....	28
4. Quorum sensing y quorum quenching en el medio marino.....	29
 OBJETIVOS/OBJECTIVES	 33
 MATERIALES Y MÉTODOS	 37
1. Quorum quenching en el medio marino.....	39
1.1 Metodología de cuantificación de bacterias cultivables y aislamiento.....	39
1.2 Detección de actividad quorum quenching.....	40
1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS.....	42
1.4 Identificación de aislados.....	43
2. Análisis de secuencias de quorum quenching en colecciones de metagenomas.....	44
3. Análisis de secuencias de quorum quenching en genomas secuenciados.....	45
4. Quorum quenching en <i>Tenacibaculum</i>	45
4.1 Especificidad de la actividad quorum quenching.....	45
4.2 Cinética de degradación de AHLs.....	46
4.3 Localización de la actividad degradadora de AHLs.....	46
4.4 PCR para lactonasas y acilasas.....	47
4.5 Clonación de genes de quorum quenching de <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J.....	48
4.6 Análisis de patogenicidad de <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J.....	49
4.7 Degradación de AHLs en el género <i>Tenacibaculum</i>	50
5. Señales de quorum sensing en <i>Tenacibaculum</i>	51
5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	51
5.2 Toma de muestras y extracción de AHLs.....	52
5.3 Detección e identificación de AHLs.....	53
5.3.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....	53

5.3.2 Luminómetro	54
5.3.3 HPLC-MS	54
5.4 Detección de AHLs <i>in vivo</i>	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
Capítulo 1. Quorum quenching en muestras marinas con elevada densidad bacteriana y en metagenomas marinos	59
1.1 Resultados	59
1.1.1 Aislamiento bacteriano	59
1.1.2 Detección de actividad quorum quenching	61
1.1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS	65
1.1.4 Identificación de aislados	68
1.1.5 Genes de quorum quenching en colecciones de metagenomas marinos ...	71
1.2 Discusión	74
Capítulo 2. Quorum quenching en agua de mar de estuario y mar abierto	87
2.1 Resultados	87
2.1.1 Aislamiento bacteriano	87
2.1.2 Detección de actividad quorum quenching	89
2.1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS	90
2.1.4 Identificación de aislados	94
2.2 Discusión	95
Capítulo 3. Caracterización de <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J, una cepa marina con elevada actividad degradadora de AHLs	103
3.1 Resultados	103
3.1.1 Especificidad de la actividad quorum quenching	103
3.1.2 Cinética de degradación de AHLs	105
3.1.3 Localización celular de la actividad degradadora de AHLs en <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J	106
3.1.4 PCR para lactonasas y acilasas	108
3.1.5 Clonación de genes de quorum quenching de <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J	109
3.1.6 Análisis de patogenicidad de <i>Tenacibaculum discolor</i> 20J	110
3.1.7 Actividad quorum quenching en el género <i>Tenacibaculum</i>	110
3.1.8 Detección e identificación de AHLs en el género <i>Tenacibaculum</i> y efecto de adición de C4-HSL en <i>Tenacibaculum maritimum</i> NCIMB 2154 ^T	112
3.1.9 Detección de AHLs <i>in vivo</i>	120
3.2 Discusión	120
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	129
RESUMEN/SUMMARY	135
BIBLIOGRAFÍA	157

ANEXOS/ANNEXES	189
Anexo 1. Secuencias de genes de ARNr 16S.....	191
Anexo 2. Publicaciones y patentes derivadas	203
2.1 High abundance of bacteria with quorum quenching activity in dense marine coastal microbial communities (Submitted in ISME Journal).	203
2.2 Acyl homoserine lactone production and degradation by the fish pathogen <i>Tenacibaculum maritimum</i> , a member of the <i>Cytophaga-Flavobacterium-</i> <i>Bacteroides</i> (CFB) group. FEMS Lett. 304: 131-139.	237
2.3 Solicitud de patente internacional WO2010012852A1	249
2.4 Solicitud de patente nacional P201030892.....	295
Anexo 3. Otras publicaciones relacionadas.....	343
3.1 Quorum quenching activity in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Lett. 280: 73-80.	343
3.2 Quorum sensing <i>N</i> -acylhomoserine lactone signals affect survival and nitrogen fixation in the cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 (Submitted in FEMS Microbiology Letters).	353

Abreviaturas

AHL	<i>N</i> -acilhomoserín lactona
AI	Autoinductor
AIP	Péptido autoinductor
AM	Agar marino
CCE	Extracto celular crudo
CDP	Dipéptido cíclico
CFB	Citofaga-Flavobacterium-Bacteroides
CM	Caldo marino
DSF	Factor señal difusible
FAS	Agua de mar filtrada y autoclavada
FAS CAS	Medio FAS suplementado con casaminoácidos
FAS POL	Medio FAS suplementado con polisacáridos
FISH	Hibridación de fluorescencia in situ
FMM	Medio <i>Flexibacter maritimum</i>
GBL	γ -butirolactona
GOS	“Global ocean sampling”: colección de metagenomas marinos de océano
HSL	Homoserín lactona
LB	Medio Luria-Bertani
MRM	Monitorización de múltiples reacciones
Ntm	Hidrolasas <i>N</i> -terminales
PAME	Metil-éster del ácido 3-hidroxi palmítico
PON	Paroxonasa
PQS	Señal quinolona de <i>Pseudomonas</i>
PTE	Dominio fosfotriesterasa
QQ	Quorum quenching
QS	Quorum sensing
QSYS	Biosensor de QQ “quorum sensing inhibitor selector”
SAM	<i>S</i> -adenosilmetionina
TLC	Cromatografía en capa fina
TSA-I	Agar de triptona y soja con 1% de NaCl
UFC	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

1. Comunicación bacteriana dependiente de densidad celular o quorum sensing

1.1 Definición de quorum sensing

Las bacterias han sido consideradas durante años, salvo raras excepciones como las Mixobacterias, como organismos no diferenciados y no cooperativos, descartándose cualquier posibilidad de que existiesen mecanismos de comunicación intercelular en organismos unicelulares. Sin embargo, se sabe que las bacterias han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten detectar y responder a las condiciones ambientales, que incluyen estímulos clásicos como los cambios de temperatura, la disponibilidad de nutrientes, presión, oxígeno y pH.

Sólo recientemente se ha descubierto que las bacterias también producen y responden a señales extracelulares producidas por otras bacterias. Estos mecanismos de comunicación intercelular permiten a las bacterias desarrollar comportamientos cooperativos. La detección de quorum o “quorum sensing” (QS) (Fuqua et al., 1994) describe la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante la regulación de la expresión genética, siendo así capaz de desarrollar un comportamiento social coordinado. Este proceso desdibuja la línea entre procariotas y eucariotas, ya que permite a las bacterias comportarse como un organismo multicelular. Las bacterias comunican su presencia a las demás usando pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores (AIs) o feromonas. Específicamente, liberan, detectan y responden a la acumulación en el medio de esas moléculas (Figura 1). La detección de AIs permite a la bacteria distinguir entre una alta o baja densidad de población. A medida que crece la población bacteriana se incrementa el nivel extracelular de la molécula señal, hasta que se alcanza una concentración umbral que equivale a un censo mínimo o quórum que desencadena una variación de la expresión génica en respuesta a cambios en el número de células. Este proceso, que permite a la población bacteriana coordinar la expresión génica de toda la comunidad, fue descrito por primera vez en la bacteria marina simbiote bioluminiscente *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977; Nealson y Hastings, 1979). Esta bacteria sólo emite luz en cultivo cuando se alcanza una densidad celular mínima o quórum.

Las células de *V. fischeri* detectan la densidad celular mediante la producción de una pequeña molécula de la familia de las *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs), que

difunde libremente a través de la membrana y se acumula en el medio de cultivo. Una vez alcanzada la concentración umbral de autoinductor comienza la generación de luz. En la naturaleza esta concentración umbral sólo se puede alcanzar en el ambiente cerrado del órgano luminoso del huésped simbiote. De esta forma *V. fischeri* evita el gasto energético de la emisión de luz a menos que la concentración de bacterias sea la suficiente como para reportar un beneficio al huésped. En su momento este fenómeno se consideró anómalo y, en general, no se creía posible que las bacterias utilizaran sistemas de comunicación intercelular, sólo desarrollados por eucariotas. Casi 10 años más tarde se descubrió que un mecanismo similar, mediado por distintas moléculas señal estaba implicado en la regulación genética de procesos tan diversos como la producción de antibióticos, la liberación de factores de virulencia, la transferencia conjugacional de plásmidos, lo que inició una serie innumerable de descubrimientos que nos han brindado una nueva visión del mundo microbiano. Hoy en día sabemos que los sistemas de QS intervienen además en el control de muchas otras funciones fisiológicas bacterianas, entre las que se encuentra el crecimiento en “enjambre” o “anillos” (“swarming”), formación de endosporas, maduración de biopelículas, etc. (Swift et al., 2001, Williams et al., 2007) (Tabla 1).

Se han propuesto explicaciones alternativas que cuestionan que los procesos de QS constituyan un sistema de comunicación bacteriano, como la hipótesis de “difusión sensing/eficiencia sensing” (Redfield, 2002; Boyer y Wisniewski-Dyé, 2009). Estas hipótesis explican la producción de moléculas de QS como un medio que las bacterias poseen para percibir el grado de difusión y mezcla de metabolitos en el medio que las rodea, lo que les permitiría determinar los beneficios de secretar moléculas que implican mayor gasto energético. De este modo evitarían un despilfarro de recursos, por ejemplo, produciendo y liberando enzimas extracelulares como proteasas; factores de virulencia o formación de biopelículas, si el medio que las rodea las diluyera inmediatamente.

Aunque el término QS fue acuñado en un principio para describir los fenómenos de respuesta a densidad celular mediados por AHLs en bacterias Gram-negativas, este término se ha extendido a sistemas que utilizan moléculas señal distintas a las AHLs. Se han descubierto un gran número de moléculas distintas que se agrupan en varias familias.

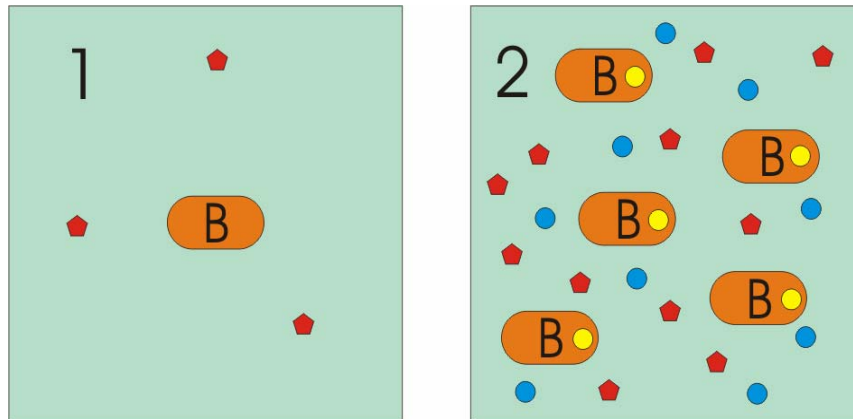


Figura 1. Modelo de la detección de quorum (“quorum sensing”, QS). Con bajas densidades celulares (1) la concentración del autoinductor (pentágonos) en el medio es muy baja, no activando los sistemas dependientes de quórum. Cuando se alcanza una elevada densidad celular (2), la concentración de autoinductor alcanza el nivel umbral de detección, iniciándose la expresión de genes cuyos productos (círculos) pueden actuar en el interior o en el exterior de la bacteria (B). En un modelo alternativo, la detección de quórum resulta en la represión de la expresión génica.

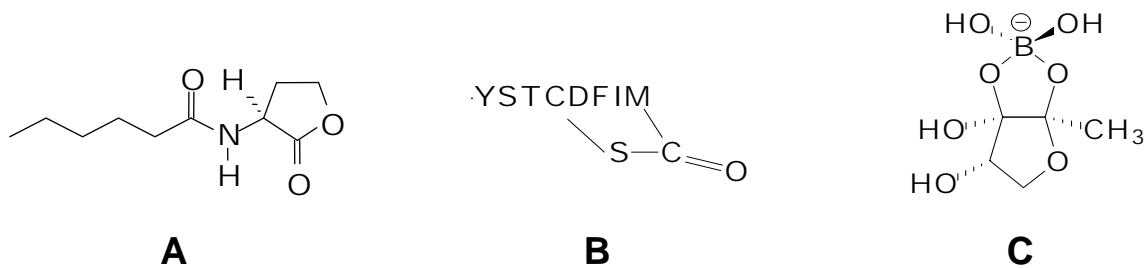


Figura 2. Principales tipos de señales de quorum en bacterias. (A) Las bacterias Gram-negativas usan moléculas de la familia de las *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs), que difieren en la cadena lateral. Se muestra la *N*-oxohexanoil-L-homoserín lactona (OC6-HSL) de *Vibrio fischeri*. (B) Las bacterias Gram-positivas utilizan péptidos cortos, que en algunos casos presentan modificaciones. Se muestra uno de los autoinductores de *Staphylococcus aureus*, que presenta un puente tiolactona entre el aminoácido terminal y una cisteína interna. (C) El diéster furanosil borato o AI-2 es utilizado tanto por Gram-positivas como por Gram-negativas.

1.2 Señales de quorum sensing

Existen tres tipos principales de señales de QS (Figura 2):

1. Las bacterias Gram-negativas producen generalmente AHLs basadas en un anillo lactona (HSL) al que se une, mediante enlace amida, un ácido graso que

constituye la cadena lateral. Poseen una elevada diversidad conformacional, difiriendo en la longitud de cadena lateral, que normalmente contiene entre 4 y 18 carbonos, saturada o insaturada y con o sin sustituciones oxo- o hidroxil- en el tercer carbono (Whitehead et al., 2001). Las AHLs se identificaron por primera vez en bacterias bioluminiscentes marinas, donde tienen un papel fundamental en el control de la emisión de luz en simbioses, como *V. fischeri* (Figura 3), que constituye el paradigma de los circuitos de control genético por QS en Gram-negativas. Cada sistema detector puede ser activado solamente por su AI correspondiente, aunque algunos presentan un pequeño grado de inespecificidad. Se ha especulado con que las AHLs fueran producidas exclusivamente por un número relativamente bajo de especies pertenecientes a α -, β - y γ -Proteobacterias (Whitehead et al., 2001; Fuqua y Greenberg, 2002; Williams et al., 2007), pero recientemente ha sido descrita la presencia de estas señales en otros phyla como en la cianobacteria colonial *Gloeothoece* (Sharif et al., 2008) y en miembros de Citofaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), también conocidos como Bacteroidetes (Huang et al., 2008; Romero et al., 2010, Anexo 2.2), lo que refuerza la importancia del papel de los sistemas de QS en las poblaciones naturales.

2. En bacterias Gram-positivas la coordinación intercelular se realiza mediante la acción de moléculas señal de naturaleza peptídica. Se trata de péptidos de bajo peso molecular, que sufren modificaciones post-traduccionales y son conocidos como péptidos autoinductores (AIPs). Su tamaño varía entre 5 y 34 residuos aminoácidos y generalmente poseen una arquitectura compleja no usual (Figura 2). Se conocen tres familias diferentes de AIPs: (i) los oligopéptidos lantibióticos, como la Nisina de lactococos, caracterizados por la presencia de tioéteres macrocíclicos y aminoácidos deshidrogenados (Quadri, 2002); (ii) péptidos de tiolactona, como el AIP-1 de estafilococos (Chan et al., 2004) y (iii) los péptidos de triptófano isoprenilado, en los que ComX y sus variantes de *Bacillus subtilis* y otros *Bacillus* son los únicos miembros conocidos (Okada et al., 2005). Estas señales se exportan activamente al medio y la feromona peptídica secretada es reconocida por el dominio sensor de una proteína sensora de membrana, componente de un par típico de transductores de señal de dos componentes. Estos sistemas reguladores de dos componentes, que consisten en una proteína sensora de membrana y una proteína reguladora de respuesta utilizan la fosforilación como medio para transmitir la señal que culmina en la activación de una

proteína que modula la transcripción de los genes diana, controlando procesos como la secreción de factores de virulencia, esporulación y competencia (Kleerebezem et al., 1997; Lazazzera et al., 1997).

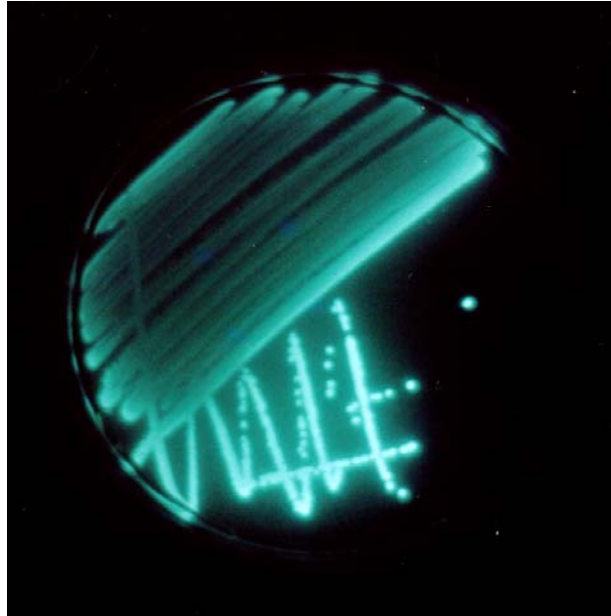


Figura 3. Bacteria bioluminiscente marina *V. fischeri*, paradigma de control de expresión genética por quorum mediado por AHL.

3. Un tercer tipo de autoinductor denominado AI-2, cuya estructura es un diéster furanosil borato (Figura 2), combina ambos tipos de comunicación. Este autoinductor se identificó por primera vez en otro vibrio marino bioluminiscente, *V. harveyi*. Mientras que las AHLs y los autoinductores peptídicos son altamente específicos y se utilizan para la comunicación intercelular dentro de la misma especie, AI-2 se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, lo que indica que podría actuar como lenguaje químico interespecífico más universal, ya que en muchos casos ambos tipos de sistemas de detección conviven (Miller y Bassler, 2001; Federle y Bassler, 2003). En la actualidad se conocen dos tipos de señal AI-2 identificadas en *V. harveyi* y *Salmonella typhimurium*. En el primero el AI-2 es un (2S,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato (Chen et al., 2002), mientras que en *S. typhimurium* se trata de un (2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (Miller et al., 2004). La proteína sintetizadora del AI-2 es LuxS (Xavier y Bassler, 2003) y la búsqueda en

bases de datos muestra que este gen está muy extendido y presente en aproximadamente 60 especies, incluyendo miembros de Proteobacteria, Spiroquetas, Firmicutes y Actinobacteria, así como géneros pertenecientes a Deinococcus, Bacteroidetes y bacterias verdes del sulfuro (Williams et al., 2007). En algunas de estas bacterias los sistemas de QS mediados por AI-2 controlan importantes funciones, incluyendo factores de virulencia y formación de biopelículas (revisado por: Zhang y Dong, 2004; Bassler y Losick, 2006; Dong et al., 2007; Williams et al., 2007).

Además del sistema universal AI-2, existen otros sistemas de comunicación intercelular que indican que los sistemas de QS de Gram-positivos y Gram-negativos no son completamente estancos. Las γ -butirolactonas (GBLs) que controlan la esporulación y producción de antibióticos en *Streptomyces* (Ohnishi et al., 1999) representan una ligazón estructural entre las moléculas implicadas en QS en bacterias Gram-positivas y las AHLs de Gram-negativas, ya que ambas están formadas por un anillo lactona polar y una cadena corta lateral derivada de un ácido graso, aunque el mecanismo por el que actúan es completamente distinto. Por otro lado, una Proteobacteria, *Xanthomonas campestris*, también utiliza las GBLs como señal (Winans y Bassler, 2002). Aparte de estos tipos principales de señales de QS se han descrito otros modelos de comunicación intercelular relacionados con la detección de la densidad poblacional. Entre las múltiples señales que intervienen en el caso de uno de los fenómenos cooperativos más peculiares y complejos, la formación de cuerpos fructíferos en mixobacterias (Dowrkin y Kaiser, 1985), aquella involucrada en la detección de quórum consiste en una mezcla compleja de aminoácidos y péptidos. En cianobacterias filamentosas, el patrón de diferenciación de los heterocistos, las células especializadas en la fijación de nitrógeno, está controlado por un pentapéptido que difunde a lo largo del filamento y permite estimar el número de células intercalares (Yoon y Golden, 1998). En *Pseudomonas aeruginosa*, en la que se ha descrito la red más compleja de señales de QS, además de las AHLs intervienen otras señales como los dipéptidos cíclicos (CDPs) o diketopiperacinas y una quinolona (PQS) (Pesci e Iglewski, 1999; Swift et al., 2001; Williams y Cámara, 2009). En otros casos, como el del fitopatógeno *Ralstonia solanaceum* (anteriormente *Pseudomonas solanaceum*) la expresión de factores de virulencia responde a la concentración de una molécula señal volátil: el metil-éster del ácido 3-hidroxipalmítico (PAME) (Flavier et al., 1997). En otro fitopatógeno Gram-

negativo, *Xanthomonas campestris*, se ha descrito un tipo de AI denominado DSF (Factor Señal Difusible) de estructura similar a los ácidos grasos, que está involucrado en la expresión de factores de virulencia, incluidas proteasas (Barber et al., 1997). Esta especie sintetiza además una segunda señal de estructura similar a la GBL de *Streptomyces*. Ambas señales coordinan la patogenicidad y producción de polisacáridos en esta bacteria, en la que no se han encontrado moléculas del tipo AHL. En muchos casos no funciona uno sólo de estos sistemas, sino que varios sistemas de detección funcionan simultáneamente controlando genes distintos o funcionando de forma sincronizada o en cascada (Bassler, 1999; Winans y Bassler, 2002). Además, muchas especies patógenas y simbióticas transmiten señales químicas que inducen un cambio de comportamiento en las células del huésped (Losik y Kaiser, 1997). Aunque este tipo de sistemas de censo intercelular ha sido descrito inicialmente para procariontes, se empiezan a descubrir sistemas de señales similares en eucariotas. Procesos como el desarrollo de micelio aéreo en *Candida albicans* (Atkinson y Williams, 2009), el crecimiento del ciliado *Tetrahymena thermophila* (Christensen et al., 1998) y la inducción de la reproducción sexual (mixis) en rotífero (*Brachionus plicatilis*) (Kubanek y Snell, 2008) están controlados por sistemas de QS.

2. Quorum sensing mediado por AHLs

2.1 El sistema LuxI/LuxR de quorum sensing

El sistema de QS más estudiado es sin duda el que implica señales del tipo AHL, cuyo paradigma es el de control de la producción de bioluminiscencia de la bacteria marina *V. fischeri*. Su sistema de QS está compuesto por dos proteínas, el generador de señal LuxI encargado de la síntesis de la AHL, y LuxR un activador de transcripción dependiente de densidad celular, receptor de la AHL. Fue el primer sistema de QS mediado por AHL descrito en su totalidad, lo que lo convirtió en el paradigma de los sistemas descubiertos posteriormente en bacterias Gram-negativas (Tabla 1). Aunque las proteínas que la constituyen presentan baja homología (menor del 35%), existe una familia de proteínas generadoras de señal conocida como **familia LuxI**, responsable de la síntesis de la AHL, que es específica para cada especie y difieren en su cadena lateral.

La recepción de la señal AHL es realizada por las proteínas **LuxR**, se trata de proteínas reguladoras que se unen a AHLs específicas cuando éstas han alcanzado una concentración crítica, siendo los complejos LuxR-AHL los responsables de activar la transcripción de los genes bajo control de QS. En el caso de *V. fischeri*, los genes controlados por este sistema de QS son los responsables de la luminiscencia y se organizan en el operón, *luxICDABEG* con una región reguladora de 219 bp que presenta un sitio de unión a LuxR, denominado *lux box* (Stevens y Greenberg, 1997). El gen *luxI* codifica una proteína de 193 aminoácidos responsable de la síntesis del autoinductor, *N*-oxohexanoil-L-homoserín lactona (OC6-HSL) a partir de *S*-adenosil metionina (SAM) y proteínas portadoras de ácidos grasos. Los otros genes del operón *lux* están implicados en la producción de luz.

A bajas densidades celulares el nivel de transcripción del operón *luxICDABEG* es bajo, lo que resulta en una producción baja del AHL, vía LuxI. Debido a que los genes que codifican la luciferasa son contiguos a *luxI*, la cantidad de luz producida es inapreciable. La AHL difunde libremente a través de la membrana, por lo que su concentración es la misma en el medio y en el interior celular. A medida que aumenta el número de células de *V. fischeri*, el AI se acumula hasta alcanzar el nivel umbral, que es suficiente para que sea detectado por la proteína receptora LuxR. La interacción entre la AHL y LuxR desenmascara el dominio de unión a ADN de LuxR, lo que le permite unirse al promotor del operón *luxICDABEG* y activar su transcripción. Esta acción resulta en un incremento exponencial tanto de AHL como de la emisión de luz (Figura 4).

El sistema se vuelve más complejo si consideramos que *V. fischeri* produce 3 AI químicamente distintos. OC6-HSL y *N*-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL) son sintetizados vía LuxI. Un tercer autoinductor, *N*-octanoil-L-homoserín lactona (C8-HSL), es dependiente de un nuevo gen, denominado *ainS*, que pertenece a una segunda familia de sintetisas de AHL que no presentan homología con las enzimas del tipo LuxI, aunque al parecer catalizan exactamente la misma reacción (Gilson et al., 1995). *AinS* pertenece a la **familia LuxM**, al igual que *luxLM* de *V. harveyi* y *vanM* de *V. anguillarum* (Bassler, 2002). En *Pseudomonas fluorescens* se ha identificado un tercer tipo de proteína sintetizadora de AHL. Esta proteína, representante de la **familia HdtS**, dirige la síntesis de sustancias antifúngicas en esta especie (Laue et al., 2000).

Organismo	Homólogo de LuxI/LuxR	AHL	Función controlada
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	OC6-HSL	Bioluminiscencia
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanI/VanR VanM/VanN	OC10-HSL, C6-HSL y OC6-HSL	Metaloproteasa, pigmento, formación de biopelícula
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	AhyI/AhyR	C4-HSL	Formación de biopelícula, exoproteasas
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AsaI/AsaR	C4-HSL	Exoproteasa
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	OC8-HSL	Transferencia conjugacional de plásmidos
<i>Agrobacterium vitiae</i>	AvsI/AvsR	C14:1-HSL y OC16:1- HSL	Virulencia
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CepI/CepR y CciI/CciR	C6 y C8-HSL	Proteasas y sideróforos
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Múltiples	Múltiples	Virulencia, exoproteasas
<i>Burkholderia mallei</i>	Múltiples	C8 y C10-HSL	Virulencia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI/CviR	C6-HSL	Pigmentos, antibióticos, exoproteasas y enzimas quitinolíticos
<i>Enterobacter agglomerans</i>	EagI/EagR	OC6-HSL	Desconocida
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpI/ExpR y CarI/CarR	OC6-HSL	Exoenzimas, Antibióticos carbapenemas, Virulencia
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ExpI/ExpR	OC6-HSL	Pectinasa
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaI/EsaR	OC6-HSL	Polisacáridos capsulares, virulencia
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PhzI/PhzR y CsaI/CsaR	C6-HSL	Antibióticos fenacinas, proteasas, morfología de colonia, agregación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR y RhII/RhIR	OC12-HSL y C4-HSL	Exoproteasas, formación de biopelículas
<i>Pseudomonas putida</i>	PpuI/PpuR	OC10 y OC12-HSL	Formación de biopelícula
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	PhzI/PhzR	C6-HSL	Fenacina-1-carboxamida
<i>Pseudomonas syringae</i>	AhII/AhIR	OC6-HSL	Exopolisacáridos, movilidad, Virulencia
<i>Ralstonia solanaceum</i>	RhII/RhIR y SolI/SolR	C4, C6 y C8-HSL	Proteasa alcalina, rhamnolípidos, factor σ de fase estacionaria
<i>Rhizobium etli</i>	RaiI/RaiR	Múltiples	Desconocida
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Múltiples	Múltiples	Nodulación y fase estacionaria
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerI/CerR	7-cis-N-C14-HSL	Agregación celular
<i>Serratia</i> spp. ATCC39006	SmaI/SmaR	C4-HSL	Exoenzimas, Antibiótico, Pigmento
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrI/SwrR	C4-HSL	Exoproteasas, Swarming, Biopelícula, Biosurfactante
<i>Serratia marcescens</i>	SpnI/SpnR	C6-HSL y OC6-HSL	Biosurfactante, pigmento, nucleasa, frecuencia de transposición
<i>Serratia proteamaculans</i>	SprI/SprR	OC6-HSL	Exoenzimas
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Múltiples	Múltiples	Nodulación/simbiosis
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YenI/YenR y YenR2	Múltiples	Movilidad, Swarming
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YpsI/YpsR y YtbI/YtbR	C6-HSL, OC6-HSL y C8-HSL	Agregación, Movilidad

Tabla 1. Algunas de las bacterias en las que se han encontrado homólogos del sistema LuxI/LuxR, se indican el tipo de AHLs que producen y funciones controladas por QS.

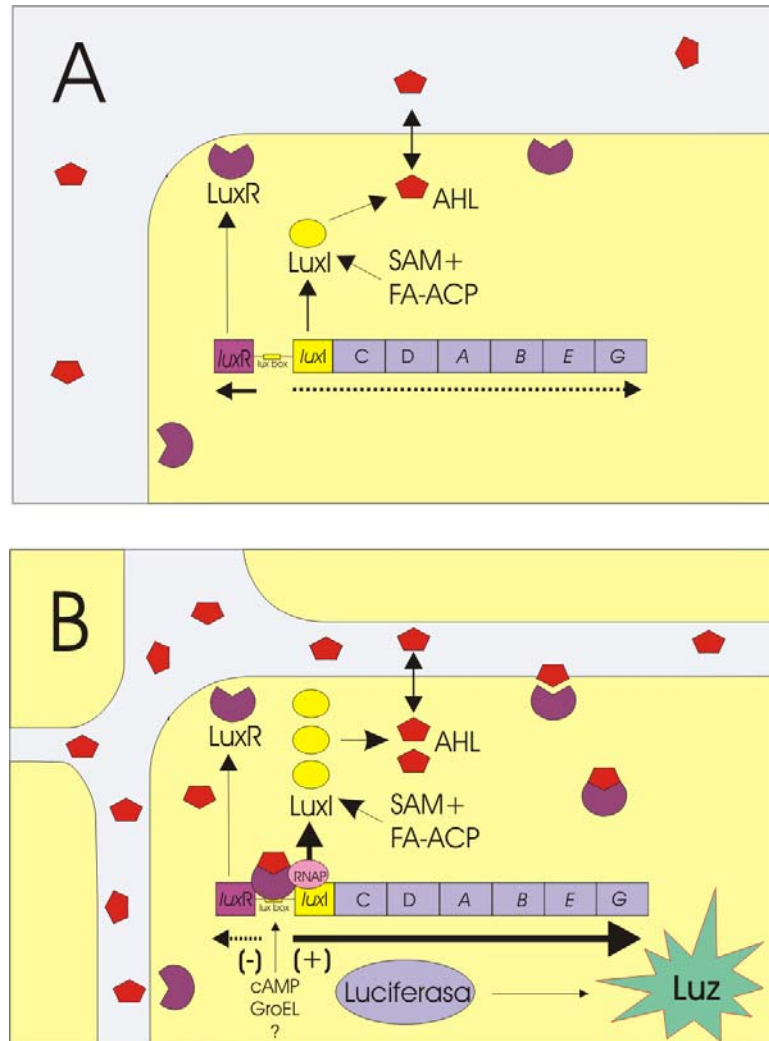


Figura 4. Detección de quorum mediante la producción de AHLs en *V. fischeri* para el control de la bioluminiscencia. En condiciones de baja densidad celular (A) *luxR* se transcribe normalmente pero la transcripción de *luxICDABEG* es baja, lo que resulta en una baja producción de AHL (pentágonos) y en la ausencia de bioluminiscencia. En condiciones de elevada densidad celular (B), se eleva la concentración de AHL, que alcanza la concentración umbral y se une a su receptor LuxR, activándose la transcripción de *luxICDABEG*. Se produce como resultado un incremento de la producción de AHL vía LuxI (autoinducción) y la luciferasa sintetizada genera bioluminiscencia. Simultáneamente se produce un efecto negativo sobre la transcripción de *luxR*. Las áreas amarillas representan células bacterianas.

2.2 Sistemas de detección de AHLs

La importancia de las señales de QS en procesos infecciosos y su interés biotecnológico aumentó la importancia de disponer de sistemas sensores para la detección de tales moléculas. Esto permitió el descubrimiento de señales de QS en otras

bacterias. En estos estudios se usaron cepas biosensoras que permiten detectar de forma sencilla la producción de autoinductores por otros organismos. Un ejemplo sería una cepa de *E. coli* transformada con el gen *luxR* de *V. fischeri* acoplado al promotor y operón *lux*, pero del que se elimina el gen *luxI* y por lo tanto no hay producción de AHL. Esta cepa no produce luz a menos que se le proporcione una AHL exógena (Cámara et al., 1998). Además de genes chivatos *lux* también se usan *lacZ* (Swift et al., 1999; Winans et al., 1999) y *gfp* (Steidle et al., 2001). Otro sistema de detección consiste en la utilización de *Chromobacterium violaceum* como cepa biosensora, ya que este sistema es menos específico que el sistema LuxR/LuxI y sirve para detectar de forma sencilla un amplio rango de AHLs. En esta bacteria la producción del pigmento púrpura violaceína, insoluble en agua, está regulada por un sistema de QS. En un mutante múltiple albino (CV026) la producción del pigmento puede ser inducida por la adición de AHL con cadena lateral de entre 4 y 8 átomos de carbono (McClellan et al., 1997; Cámara et al., 1998) (Figura 5). También se pueden detectar AHLs con cadenas de mayor longitud por inducción de la producción de violaceína con el biosensor *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi et al., 2008a).

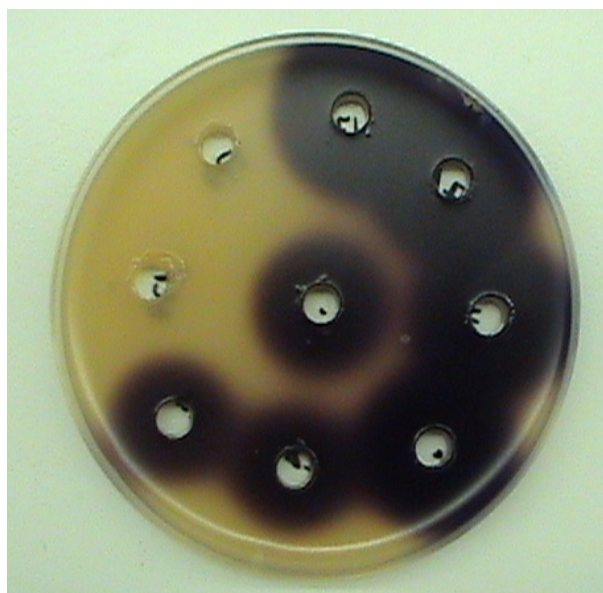


Figura 5. Bioensayo de inducción de la producción de violaceína por presencia de AHLs en *Chromobacterium violaceum* CV026.

Debido a la especificidad de estos sistemas es aconsejable la utilización simultánea de varias de estas cepas biosensoras para detectar un amplio rango de tamaños de AHL. También es recomendable el uso de cromatografía en capa fina (TLC) para separar y evitar problemas por interferencia con sustancias inhibitoras que puedan encontrarse en el medio de cultivo y que interfieran con el biosensor. Además, la aplicación de cromatografía-líquida combinada con espectrometría de masas (HPLC-MS) permite la confirmación e identificación de las señales.

2.3 Quorum sensing y biopelículas

De entre los procesos controlados por QS, uno de los de mayor impacto económico y clínico es la formación de biopelículas. Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan las biopelículas con distintos procesos infecciosos en humanos (Wilson, 2001; Costerton et al., 1999). Los mecanismos por los que la biopelícula produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias de la biopelícula pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, las células de la biopelícula se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos (Donlan y Costerton, 2002). Las biopelículas producen una gran cantidad de polisacáridos extracelulares, responsables de su apariencia viscosa, y se caracterizan por una gran resistencia a agentes antibióticos. Esta resistencia puede deberse a que la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas las bacterias proporciona una barrera frente a la penetración de biocidas. Otra posibilidad es que la mayoría de las células de la biopelícula crecen muy lentamente, en un estado de privación de nutrientes, por lo que no son susceptibles al efecto de los agentes antimicrobianos. Un tercer aspecto podría estar relacionado con que las células en la biopelícula adoptasen un fenotipo distinto, por ejemplo, mediante la expresión de bombas secretoras de fármacos (Donlan y Costerton, 2002).

Además de su importancia clínica, es común la contaminación biológica de superficies por biopelículas, pudiendo desarrollarse sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, lo que conduce a la degradación del material, liberación

de productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de calor en procesos acuáticos. Las biopelículas son también la primera causa de la contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biopelículas en los sistemas antiincendios. El establecimiento de bacterias adheridas a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos conlleva serios problemas higiénicos e incluso casos de toxiinfecciones alimentarias, así como numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar (Carpentier y Cerf, 1993). En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biopelículas en estructuras sumergidas tales como jaulas, redes y contenedores; o equipamiento tales como cañerías, bombas, filtros y tanques colectores, y para especies de cultivo, como mejillones, vieiras, ostras, etc. Esta colonización que sirve de base para el crecimiento de organismos superiores se conoce como biofouling (Railkin, 2004) y afecta a todos los sectores de la acuicultura europea resultando en sustanciales pérdidas económicas.

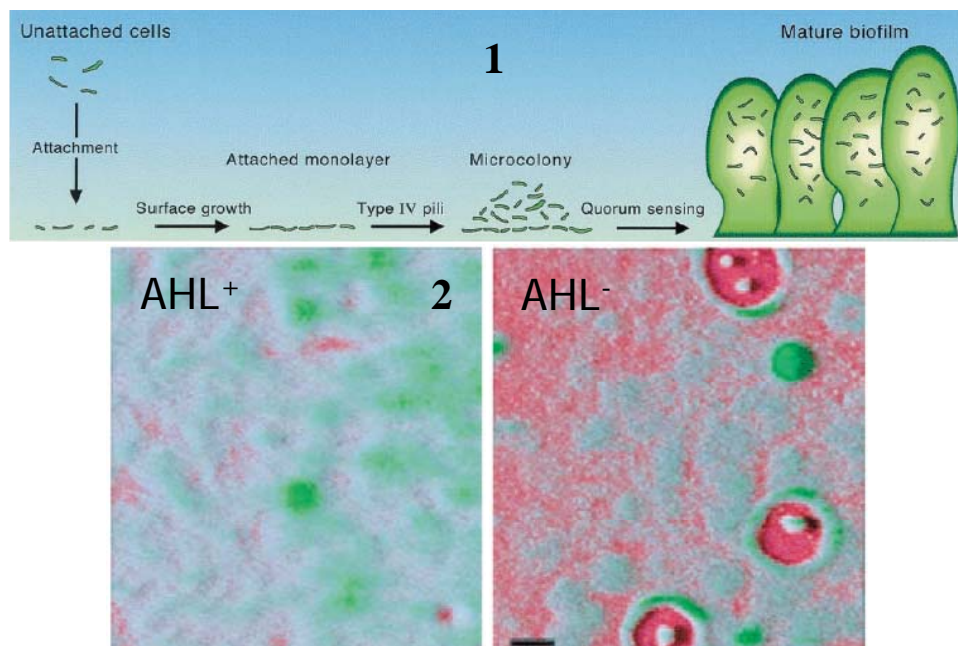


Figura 6. 1) Diagrama de maduración de una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. Las células bacterianas se fijan a la superficie donde proliferan formando microcolonias. Las microcolonias de alta densidad desarrollan biopelículas maduras mediante un mecanismo dependiente de señal *N*-oxododecanoil-L-homoserín lactona (OC12-HSL). 2) Reducción en el desarrollo de biopelícula por un mutante de *P. aeruginosa* incapaz de producir AHL (derecha) respecto a cepa salvaje (izquierda). Tomado de Parsek y Greenberg (2000).

Con frecuencia el QS y la formación de biopelículas están estrechamente relacionados (Nadell et al., 2008). Así, muchas especies, incluido el patógeno *P. aeruginosa*, activan la producción de polisacáridos extracelulares únicamente cuando la población alcanza una alta densidad (Davies et al., 1998; Sakuragi y Kolter, 2007) (Figura 6). Este mecanismo evita el coste de producción de exopolisacárido en fase planctónica (Xavier y Foster, 2007). Se han cuantificado altas concentraciones de AHLs en biopelículas: Charlton et al. (2000) encontraron 4,5 veces más cantidad de señal *N*-oxododecanoil-L-homoserín lactona (OC12-HSL) de *P. aeruginosa* en biopelículas de la bacteria que en medio líquido. En otro estudio, Huang et al. (2007) describen la presencia de muy altas concentraciones de *N*-dodecanoil-L-homoserín lactona (C12-HSL) (3,36 mM) en una biopelícula, indicando que las AHLs se acumulan dentro de estas estructuras y podrían ser más estables dentro de las biopelículas. Al controlar la formación de biopelículas y otros factores de virulencia, la interceptación de los procesos de QS se ha convertido en una estrategia biotecnológica cuya exploración presenta un elevado interés.

3. Interceptación de quorum sensing: quorum quenching

3.1 Estrategias de quorum quenching

Aunque la síntesis de quimioterápicos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en el siglo pasado una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de algunas bacterias patógenas es un grave problema mundial, que obliga a la industria farmacéutica a desarrollar nuevas generaciones de antibióticos más potentes, y que puede originar cepas multirresistentes en las que el tratamiento es más largo y con frecuencia ineficaz. Debido a que la comunicación bacteriana juega un papel crítico en la regulación de numerosas funciones fisiológicas microbianas, incluyendo las relacionadas con la patogenicidad en plantas y animales, existe un enorme interés en el diseño e implementación de estrategias de inactivación de los sistemas de QS, también denominadas “quorum quenching” (QQ, Zhang, 2003), que puedan funcionar como

nuevas fórmulas de lucha antimicrobiana (Dong y Zhang 2005; Dong et al., 2007). Mientras que los agentes antimicrobianos tradicionales resultan en la muerte celular del patógeno, la utilización de sistemas que interfieran con la comunicación bacteriana adopta una estrategia menos agresiva y que no estaba disponible hasta el momento: atenuar la virulencia del patógeno de modo que no sea capaz de adaptarse al ambiente del huésped y pueda ser eliminado por las defensas innatas de éste. La identificación de sistemas que inactiven el sistema de QS sería importante en el caso de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*, cuyo éxito depende de la organización de un “ataque” coordinado que supere las defensas del huésped (Finch et al., 1998; de Kievit e Iglewski, 2000; Zhang, 2003; Hentzer y Givskov, 2003).

Aunque la inactivación de otros sistemas de QS es igualmente interesante, hasta el momento los sistemas de QQ mejor conocidos se refieren a la inactivación de las señales tipo AHL en Gram-negativas. Existen varios tipos de estrategias de QQ posibles, que incluyen a) la inhibición de la generación de señal AHL, b) el bloqueo de la diseminación de la señal y c) antagonizar la recepción de la AHL.

a) Aunque la inhibición de LuxI y por tanto el bloqueo de la generación del AI, sería el método más eficaz de interceptación de la comunicación bacteriana, existen en la actualidad escasos estudios que hayan explorado esta posibilidad. Así, se han construido mutantes en *lasI* (homólogo de *luxI*) en *P. aeruginosa* que resultaron casi totalmente deficientes en cuanto a producción de factores de virulencia (Shih y Huang, 2002). También se ha observado que varios análogos de SAM como la *S*-adenosilhomocisteína, *S*-adenosilcisteína o sinefungin son potentes inhibidores de la síntesis de AHL en *P. aeruginosa* (Parsek et al., 1999). Aunque el SAM es intermediario en otras muchas rutas metabólicas de procariotas y eucariotas, debido a que la reacción de síntesis de AHL mediada por LuxI parece ser única, existe la esperanza de que estos análogos de SAM podrían ser utilizados de forma específica como inhibidores de QS mediado por AHLs, sin afectar a las enzimas eucariotas que usan SAM como sustrato. También se ha descrito un efecto inhibitorio sobre la síntesis de AHLs por antibióticos del grupo de los macrólidos cuando se suministraron en concentraciones no letales (Tateda et al., 2001; Pechere, 2001). Aunque el efecto de estos antibióticos se ha identificado como inhibidor de la síntesis proteica a nivel del ribosoma, todavía no está claro el mecanismo de inhibición de estos compuestos sobre

la producción de señales AHL (Pechere, 2001). Debido a que en la actualidad están descritas las estructuras cristalográficas de varias proteínas tipo LuxI, éstas podrían ser utilizadas como guía para el diseño de inhibidores sintéticos (Pappas et al., 2004).

b) La comunicación bacteriana puede ser bloqueada por una disminución de la concentración de AHL activa en el medio. Así, las AHLs se degradan de modo espontáneo por hidrólisis alcalina a pHs elevados (Yates et al., 2002), aunque esta disminución de la concentración de AHL puede también deberse a mecanismos enzimáticos. Algunas bacterias han sido descritas como capaces de degradar señales AHL (Dong y Zhang 2005), por lo que las bacterias responsables podrían ser utilizadas en el bloqueo de comunicación bacteriana y sus enzimas tienen gran interés para su uso en aplicaciones biotecnológicas. Debido a que el término QQ se utilizó por primera vez para describir este mecanismo, algunos autores restringen su uso a esta aplicación.

c) El bloqueo de la transducción de la señal de QS se puede lograr por la presencia de un antagonista de la AHL capaz de competir o interferir con la unión de la señal a su receptor LuxR. Los antagonistas competitivos serían lo suficientemente similares, estructuralmente, a las AHLs para permitir su unión al receptor pero no activarían la transducción de señal posterior, mientras que los antagonistas no competitivos mostrarían baja o ninguna similitud estructural con las AHLs, ya que se unirían a sitios distintos del receptor LuxR. Se ha observado que los antagonistas pueden acelerar la degradación de LuxR por la célula cuando se unen a esta (Manefield y Turner, 2002). En la actualidad existe bastante conocimiento sobre la relación estructura-función de las señales AHL, lo que permitirá realizar una búsqueda efectiva de potentes antagonistas de QS. Así, en el caso de la cadena acil de las AHLs, se ha visto que una reducción o aumento del tamaño de la cadena de la señal de *Erwinia carotovora* en únicamente una unidad metil reducía la actividad de la señal en un 90% y 50% respectivamente (Chhabra et al., 1993).

Una de las primeras estrategias de antagonismo de las señales de QS tipo AHL descritas es la utilización de AHLs homólogas que bloquean el receptor. Debido a la elevada especificidad de muchos generadores de respuesta dependientes de AHL, la presencia de AHLs con cadena larga (más de 10 carbonos) puede resultar en el bloqueo de la respuesta, por lo que han sido propuestas como antagonistas de la señal mediada por AHLs en algunos patógenos. Sin embargo, el potencial de la utilización de

moléculas de AHLs de cadena larga como agentes antimicrobianos, funcionando como antagonistas en procesos de infección, es limitado ya que algunas AHLs poseen potentes efectos moduladores sobre el sistema inmune. Así, se ha descrito que la OC12-HSL de *P. aeruginosa* puede alterar la respuesta inmune del huésped haciéndola menos efectiva (Rice et al., 1999) y además su presencia activa la producción de interleucina-8, a través de la transcripción del factor nuclear NF- κ B en las células epiteliales del sistema respiratorio (Zimmermann et al., 2006), activando la respuesta inflamatoria y por lo tanto actuando como un factor de virulencia por si mismo (Pesci e Iglewski, 1999; Smith e Iglewski, 2003). También se han descrito efectos apoptóticos sobre líneas celulares de la señal OC12-HSL (Tateda et al., 2003; Horikawa et al., 2006; Shiner et al., 2006). Debido a estas observaciones la utilización de AHLs como agentes antimicrobianos está fuertemente limitada.

3.2 Degradación enzimática de AHLs: Acilasas y lactonasas

Tal y como era de esperar, en la naturaleza se han desarrollado por parte de eucariotas sistemas de lucha para impedir la invasión o colonización bacteriana mediante la interceptación de los procesos mediados por QS y también las propias poblaciones bacterianas han desarrollado estrategias de competencia para luchar con otras bacterias mediante la inactivación de sus sistemas de QS (Tabla 2). Una de estas estrategias incluye la degradación enzimática de las señales AHL. La estructura química de las AHLs implica que su degradación enzimática podría ocurrir mediante cuatro reacciones diferentes (Figura 7A). Dos de ellas implicarían la rotura del anillo HSL y estarían mediadas por enzimas tipo lactonasa o descarboxilasa. Las otras dos separarían el ácido graso del anillo HSL mediante la acción de una acilasa (amidasa) o una deaminasa (Dong y Zhang, 2005). Únicamente dos de las cuatro tipos de enzimas mencionadas han sido identificadas hasta la fecha: lactonasas y acilasas.

Se ha descrito la inactivación enzimática de las moléculas señal en numerosas bacterias (Dong y Zhang 2005), como las especies del género *Bacillus*, que son capaces de degradar las AHLs mediante la acción de un gen específico, *aiiA* (AutoInducer Inactivator), que codifica una enzima lactonasa que inactiva la AHL al hidrolizar el anillo HSL (Figura 7B). De esta forma las lactonasas interceptan las señales

inactivándolas y resultando en una posible ventaja a la hora de colonizar nuevos ambientes (Park et al., 2008). Se ha probado que plantas modificadas genéticamente con el gen de la lactonasa de *Bacillus* presentan una mayor resistencia al ataque de patógenos cuya virulencia depende de la utilización de AHLs como señal, como *E. carotovora* (Dong et al., 2001; Zhang, 2003) (Tabla 2). También se ha descrito la presencia de una lactonasa en *Arthrobacter* sp. codificada por el gen *ahlD* (Park et al., 2003). Debido a que las AHLs son utilizadas exclusivamente por Gram-negativas, no es extraño que estas bacterias Gram-positivas hayan desarrollado un sistema para inactivar estas señales. Sin embargo, este tipo de enzimas también han sido identificadas en *Agrobacterium tumefaciens*, que utilizaría las lactonasas BlcC (anteriormente AttM) y AiiB (Zhang et al., 2002; Carlier et al., 2003) para inactivar su propio sistema de QS (Zhang, 2003) aunque BlcC parece estar involucrada en el metabolismo de GBLs (Carlier et al., 2004; Khan y Farrand, 2008), o en *Klebsiella pneumoniae* que produce la lactonasa AhlK (Park et al., 2003).

El segundo tipo de enzimas inactivadoras de QS se encontró en otra bacteria Gram-negativa aislada del suelo, *Variovorax paradoxus*. Esta bacteria puede utilizar las AHLs como única fuente de energía y nitrógeno (Leadbetter y Greenberg, 2000). En este caso se trata de una acilasa que rompe el enlace amida entre la HSL y el ácido graso (Figura 7B), que es utilizado como fuente de energía, aunque el gen responsable todavía no ha sido clonado. Una enzima similar, denominado AiiD, que libera la cadena lateral del HSL, ha sido clonada de otra Proteobacteria formadora de biopelículas, *Ralstonia* sp. (Lin et al., 2003; Taga y Bassler, 2003). *P. aeruginosa* PAOI también produce dos acilasas: PvdQ y QuiP con las que podría regular su sistema de QS (Sio et al., 2006; Huang et al., 2006). Las acilasas AhlM de *Streptomyces* sp. (Park et al., 2005), AiiC de *Anabaena* sp. PCC7120 (Romero et al., 2008), AaC de *Shewanella* sp. (Morohoshi et al., 2008b) y *Comamonas* sp. (gen no identificado) (Uroz et al., 2003) completan la lista de enzimas de tipo acilasa que se conocen hasta la actualidad (Tabla 2). En *Acinetobacter* sp., *Bosea* sp., *Ochrobactrum* sp., *Sphingomonas* sp., *Delftia acidovorans*, *Marinobacterium* sp. y *Glaciecola* sp. también ha sido descrita actividad QQ de tipo enzimático pero el tipo de actividad acilasa o lactonasa no ha sido descrito hasta la actualidad (Kang et al., 2004; D'Angelo-Picard et al., 2005; Jafra et al., 2006; Tait et al., 2009) (Tabla 2).

Especie	Actividad QQ	Gen	Autores	Grupo
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Lactonasa Lactonasa	<i>bleC</i> <i>aiiB</i>	Zhang et al., 2002 Carlier et al., 2003	α-Proteobacteria
<i>Bosea</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	D'Angelo-Picard et al., 2005	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	Jafra et al., 2006	
<i>Sphingomonas</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	D'Angelo-Picard et al., 2005	
<i>Sphingopyxis</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	D'Angelo-Picard et al., 2005	
<i>Variovorax paradoxus</i>	Acilasa	(n.d.)	Leadbetter y Greenberg, 2000	β-Proteobacteria
<i>Ralstonia</i> sp.	Acilasa	<i>aiiD</i>	Lin et al., 2003	
<i>Comamonas</i> sp.	Acilasa	(n.d.)	Uroz et al., 2003	
<i>Delftia acidovorans</i>	(n.d.)	(n.d.)	Jafra et al., 2006	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acilasa Acilasa	<i>pvdQ</i> <i>quiP</i>	Huang et al., 2003; 2006	γ-Proteobacteria
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lactonasa	<i>ahIK</i>	Park et al., 2003	
<i>Shewanella</i> sp.	Acilasa Lactonasa	<i>aaC</i> (n.d.)	Morohoshi et al., 2008b Tait et al., 2009	
<i>Acinetobacter</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	Kang et al., 2004	
<i>Marinobacterium</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	Tait et al., 2009	
<i>Glaciecola</i> sp.	(n.d.)	(n.d.)	Tait et al., 2009	
<i>Bacillus</i> sp.	Lactonasa	<i>aiiA</i>	Dong et al., 2000; 2002	
<i>Bacillus megaterium</i>	Oxidasa	<i>P450B</i> <i>M-3</i>	Chowdhary et al., 2007	Firmicutes
<i>Halobacillus salinus</i>	Antagonistas (fenetilamidas)	(n.d.)	Teasdale et al., 2009	Actinobacteria
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Lactonasa/Acilasa/Oxid orreductasa	<i>qsdA</i>	Uroz et al., 2005; 2008; Park et al., 2006	
<i>Streptomyces</i> sp.	Acilasa	<i>ahIM</i>	Park et al., 2005	
<i>Arthrobacter</i> sp.	Lactonasa	<i>ahID</i>	Park et al., 2003	
<i>Anabaena</i> PCC7120	Acilasa	<i>aiiC</i>	Romero et al., 2008	
Riñón	Acilasa	(n.d.)	Xu et al., 2003	Mamífero
Epitelio respiratorio	(n.d.)	PON2	Stoltz et al., 2007	
<i>Luffariella variabilis</i>	Antagonistas (Manoalidos)	(n.d.)	Skindersoe et al., 2008	Esponja
<i>Flustra foliacea</i>	Antagonistas (Alcaloides)	(n.d.)	Peters et al., 2003	Briozoo
<i>Scorzonera sandrasica</i>	Antagonistas (n.d.)	(n.d.)	Bosgelmez-Tinaz et al., 2007	Plantas
<i>Medicago truncatula</i>	Antagonistas (n.d.)	(n.d.)	Gao et al., 2003	
<i>Pisum sativum</i>	Antagonistas (n.d.)	(n.d.)	Teplitski et al., 2000	
<i>Lotus corniculatus</i>	(n.d.)	(n.d.)	Delalande et al., 2005	
<i>Laminaria digitata</i>	Haloperoxidasa	(n.d.)	Borchardt et al., 2001	Algas
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	Antagonistas (floridósido, betonicina y ácido isetiónico)	(n.d.)	Kim et al., 2007	
<i>Delisea pulchra</i>	Antagonistas (furanonas)	(n.d.)	Givskov et al., 1996	
<i>Penicillium</i> spp.	Antagonistas (ácido penicílico y patulín)	(n.d.)	Rasmussen et al., 2005	Hongo

Tabla 2. Listado de bacterias y organismos eucariotas en los que se ha descrito actividad QQ sobre señales del tipo AHL tanto enzimática (sombreado en gris) como mediante antagonistas. No determinado (n.d.).

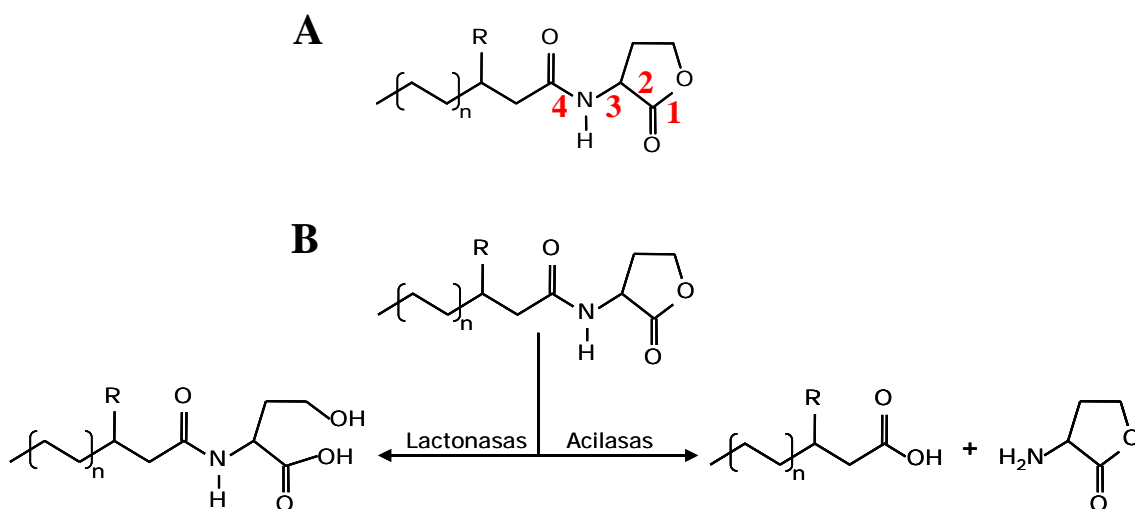


Figura 7. A) Cuatro posibles modos de degradación enzimática de AHLs. Los números en rojo indican la posición de corte de las enzimas: 1) Lactonasa; 2) Descarboxilasa; 3) Deaminasa y 4) Acilasa. B) Modo de acción de los dos tipos principales de enzimas de QQ conocidos. Las lactonasas hidrolizan el anillo HSL de la AHL mientras que las acilasas rompen el enlace amida entre el anillo HSL y el ácido graso.

De modo interesante, las especies bacterianas en las que se ha descubierto actividad enzimática degradadora de señales de tipo AHL pertenecen a cuatro phyla diferentes del reino *Bacteria* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>): Actinobacteria (*Arthrobacter* sp.), Firmicutes (*Bacillus*), Proteobacteria (*A. tumefaciens*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Ralsonia* sp. y *V. paradoxus*) y Cianobacteria (*Anabaena* sp.). Esta amplia distribución sugiere que los genes codificadores de enzimas degradadoras podrían estar conservados en muchos organismos procariontes. La diversidad taxonómica de estas especies bacterianas se refleja también en las secuencias de los genes de las enzimas degradadoras que producen. Así las acilasas de *Ralstonia* sp. y *P. aeruginosa* presentan baja homología, con aproximadamente un 39% de identidad a nivel peptídico (Huang et al., 2003; Lin et al., 2003). Del mismo modo, en las lactonasas también se observa una importante variación en las secuencias aminoacídicas. Las lactonasas se pueden agrupar en dos grupos, uno representado por la lactonasa AiiA que contiene las secuencias de las especies de *Bacillus*, que comparten un 90% de identidad en sus secuencias peptídicas (Dong et al., 2002; Lee et al., 2002; Ulrich, 2004). El otro es el grupo de BlcC que incluye las lactonasas de *A. tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Arthrobacter* sp., y que comparten entre un 30 y un 58% de identidad. Sorprendentemente las lactonasas de ambos clúster comparten menos del

25% de homología, como en el caso de AiiA y BlcC (Zhang et al., 2002), aunque todas presentan un dominio altamente conservado: HXDH~H~D, se trata del dominio de unión a Zn característico de las metalo- β -lactamasas, que se ha comprobado esencial para la actividad AHL-lactonasa (Dong et al., 2002; Wang et al., 2004). Recientemente se ha descubierto en *Rhodococcus erythropolis* la lactonasa QsdA (Uroz et al., 2008), que no presenta homología con la familia de metalo- β -lactamasas a la que pertenecen las anteriores, sino que presenta el dominio fosfotriesterasa (PTE) de unión a Zn.

Además de actividades enzimáticas tipo lactonasa y acilasa se han descrito dos actividades oxidasa-reductasa en bacterias capaces de modificar la cadena acil de las AHLs. Aunque estas actividades no suponen la degradación de la señal, las modificaciones en el ácido graso de la AHL podrían afectar la especificidad y por tanto el reconocimiento de la molécula por el receptor. La primera actividad oxidasa-reductasa fue descrita en *Rhodococcus erythropolis* W2. Esta bacteria reduce la AHLs oxo-sustituidas en el tercer carbono a sus formas hidroxiladas, siendo inactiva frente a las AHLs no sustituidas o con sustituciones hidroxiladas (Uroz et al., 2005). La segunda actividad fue descrita en *Bacillus megaterium* y es la monooxigenasa P450, anteriormente descubierta como oxidadora de ácidos grasos y aminoácidos unidos a ácido graso. Esta enzima oxida AHLs de cadena larga en las posiciones ω -1, ω -2 y ω -3, siendo más activa sobre AHLs oxo-sustituidas (Chowdhary et al., 2007).

Además de bacterias, se ha encontrado que plantas como *Lotus corniculatus* (Delalande et al., 2005) y las células de mamíferos también pueden interferir con las señales AHL (Chun et al., 2004). Aunque Chun et al. (2004) no identificaron las enzimas responsables de la inactivación de las AHL por células de epitelio respiratorio humano, observaron que aquéllas se encontraban asociadas a las células. En estudios posteriores se identificaron como los candidatos más probables a las proteínas citoplásmicas de la familia de las paroxonasas (PONs): PON1, PON2 y PON3 (Draganov et al., 2005; Khersonsky y Tawfik, 2005). Estas enzimas están involucradas en mecanismos de detoxificación de muchos organofosforados y actúan como lactonasas. De las tres PONs descritas, la más activa frente a AHL parece ser PON2 debido a que se ha observado que lisados de células de epitelio respiratorio de ratones mutantes en esta enzima no degradaban OC12-HSL, y su sobreexpresión aumentó la actividad

Introducción

degradadora. Además, mutantes en PON1 y PON3 podían degradar OC12-HSL (Stoltz et al., 2007).

Un mecanismo adicional para la inactivación de AHLs se basa en la producción, por las enzimas haloperoxidasas de HOBr que reacciona específicamente con AHLs con sustituciones oxo- en el tercer carbono de su cadena lateral, inactivándolas. Este proceso ha sido descrito para el alga parda *Laminaria digitata* (Borchardt et al., 2001).

3.3 Antagonistas de receptor de AHL

El fenómeno mejor conocido de interceptación no enzimática de QS mediado por AHL es un sistema desarrollado por un organismo eucariota. El alga roja *Delisea pulchra* se caracteriza por un bajísimo nivel de colonización superficial, tanto por bacterias como por eucariotas, especialmente en la parte apical del talo. Una de las principales razones para explicar este comportamiento es que esta alga produce furanonas halogenadas, cuya estructura es muy próxima a las de las AHLs (Figura 8).

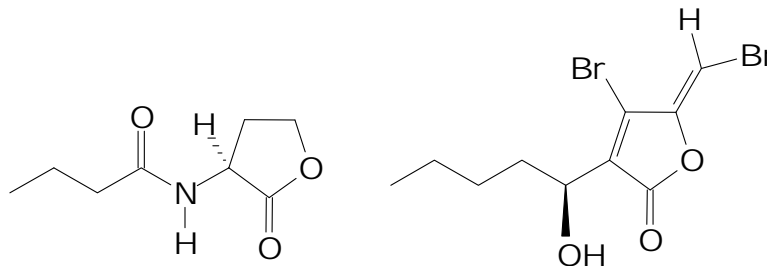


Figura 8. Estructura de una *N*-acilhomoserín lactona (izquierda) y de una de las furanonas (derecha) producidas por el alga roja *Delisea pulchra*. El alga produce hasta 30 compuestos próximos que se diferencian en los sustituyentes de la cadena lateral, pudiendo aparecer otro átomo de Bromo en el anillo lactona y grupos H, OH o OAc en la cadena lateral. Las furanonas desplazan a las AHLs de su receptor específico del tipo LuxR, bloqueando la expresión de numerosos caracteres esenciales para la colonización y la virulencia.

La concentración de las furanonas es mayor en la parte apical del talo, presentando una correlación directa con el nivel de colonización bacteriana. Se han identificado más de 30 furanonas distintas producidas por el alga, que se diferencian en los sustituyentes laterales. La producción de estas sustancias inhibitorias del crecimiento

microbiano por *D. pulchra* era conocida desde hace 30 años, pero su mecanismo de acción se ha elucidado una vez descritos los fenómenos de QS que controlan la formación de biopelículas. El primer fenómeno sorprendente era que la flora bacteriana que colonizaba la superficie de *D. pulchra* estaba compuesta principalmente por bacterias Gram-positivas, lo que es poco común en los sistemas marinos, en los que predominan las bacterias Gram-negativas. Este hecho concuerda con el descubrimiento de que las furanonas producidas por *D. pulchra* inactivan el sistema de señal de las bacterias Gram-negativas mediado por AHLs, impidiendo así el desarrollo de caracteres necesarios para la colonización, como el crecimiento en swarming, la producción de exoproteasas o la maduración de biopelículas que dependen en muchos casos de QS (Givskov et al., 1996). La similitud estructural entre las AHLs y las furanonas hacía pensar que el modo de acción de éstas consistía en competir por el sitio de unión con la proteína receptora tipo LuxR, bloqueando la expresión del fenotipo dependiente de QS. En varios estudios se realizaron diversos experimentos que demostraron que en efecto las furanonas antagonizan la señal de QS bloqueando los receptores de AHL. Para ello no sólo demostraron que las furanonas inhiben la luminiscencia de cepas biosensoras de *Vibrio* de forma específica y no a través de interferencias con los niveles energéticos de la célula o mediante mecanismos no específicos de regulación, sino que además inhibían la movilidad en enjambre y la producción de exoproteasas en *Serratia* e interferían con el sistema LasI/LasR de *Pseudomonas*, crucial para el desarrollo de biopelículas y por lo tanto para la colonización de superficies (Manefield et al., 1999; Rice et al., 1999; Kjelleberg y Steinberg, 2002). Las furanonas funcionarían como antagonistas de la señal de QS desplazando las AHLs por unión a su receptor de la familia LuxR. Esta unión a furanona afecta a la vida media de la proteína ya que las proteínas del tipo LuxR poseen una vida media muy corta, que se ve alargada en presencia de su correspondiente AHL, que al unirse a ella la estabilizaría y protegería contra la acción proteolítica (Zhang, 2003; McLean et al., 2004). Al contrario, la unión inestable con la furanona favorecería la proteólisis. Esta actividad antagonista de QS mediado por AHLs impide la colonización de la superficie del alga. La concentración de furanonas producida en la naturaleza por *D. pulchra* es similar a la necesaria para antagonizar los sistemas de QS *in vitro*, como demuestra el halo de inhibición producido

directamente por el talo de *D. pulchra* en un bioensayo de inhibición de producción de violaceína con la cepa biosensora *C. violaceum* (Figura 9).



Figura 9. El alga roja *D. pulchra* produce un “halo de silencio” que se puede observar por la inhibición de la producción dependiente de AHL del pigmento violaceína por la bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026. La foto ha sido reproducida a partir de la aparecida en la portada de la revista Microbiology (Manefield et al., 1999) con permiso de los autores.

Además de *D. pulchra*, se han identificado antagonistas de AHLs en otros eucariotas (Tabla 2) incluyendo otra alga roja: *Ahnfeltiopsis flabelliformes*. Esta alga produce tres inhibidores de QS que no guardan relación estructural con AHLs y que presentaron actividad antagonista sobre C8-HSL en bioensayo con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Kim et al., 2007). También se han descrito dos alcaloides aislados del briozoo marino *Flustra foliacea*, en el que existen algunas zonas superficiales con muy baja colonización microbiana, que inhiben la comunicación intercelular mediante AHLs, aunque se desconoce el mecanismo de acción y su estructura tampoco recuerda a la de las AHLs (Peters et al., 2003). En la esponja marina *Luffareilla variabilis* también se han identificado inhibidores de QS del tipo Manoalidos (Skindersoe et al., 2008). Algunos exudados de plantas terrestres como *Pisum sativum*,

Medicago truncatula y *Scorzonera sandrasica* también inhiben fuertemente la producción, dependiente de AHL, del pigmento violaceína en la cepa biosensora *C. violaceum* (Teplitski et al., 2000; Gao et al., 2003; Bosgelmez-Tinaz et al., 2007), aunque se desconoce la naturaleza del inhibidor y su posible mecanismo de acción, que podría ser inespecífico (Zhang, 2003). Estos mecanismos sí se conocen en el ajo, que produce al menos tres compuestos capaces de interferir con el receptor LasR de *P. aeruginosa*, haciendo las biopelículas de esta bacteria susceptibles a antibióticos y detergentes (Persson et al., 2005). En varias especies del hongo *Penicillium* existen metabolitos también capaces de reducir la resistencia de biopelículas de *P. aeruginosa* al antibiótico tobramicina (Rasmussen et al., 2005). El único aislado bacteriano descrito con actividad inhibidora de QS mediado por AHLs es *Halobacillus salinus*. Esta bacteria marina produce dos fenetilamidas que mostraron actividad antagonista sobre varios biosensores de AHLs (Teasdale et al., 2009).

Además de la obtención de inhibidores de QS a partir de búsquedas aleatorias en extractos de diferentes organismos, existen numerosos estudios basados en el diseño de antagonistas del receptor LuxR mediante la modificación estructural de AHLs. Estas modificaciones se han realizado sobre la cadena lateral de las AHLs, el anillo HSL o sobre ambos (Ni et al., 2009). Muchas de las AHLs modificadas mantuvieron actividad activadora (agonistas) de su receptor pero otras presentaron actividad antagonista, sin embargo los antagonistas resultaron específicos para el receptor cuya AHL fue modificada. Otra importante estrategia para la obtención artificial de antagonistas se basa en la modificación estructural de furanonas halogenadas naturales, que en algunos casos demostraron efectos terapéuticos favorables, por ejemplo en infecciones de pulmón de ratón con *P. aeruginosa* (Wu et al., 2004) o en infecciones de trucha con el patógeno *Vibrio anguillarum* (Rasch et al., 2004).

El creciente número de mecanismos de inactivación descubiertos y la diversidad taxonómica de especies con capacidad QQ en la naturaleza (Tabla 2) de nuevo da idea de la importancia de los procesos de QS en el ambiente y la ventaja competitiva que estos comportamientos coordinados suponen para las especies bacterianas que los utilizan.

3.4 Aplicaciones prácticas de quorum quenching

La aplicación biotecnológica de la interceptación de comunicación bacteriana mediado por AHLs como un nuevo y prometedor método para control de bacterias patógenas (Dong y Zhang, 2005; Dong et al., 2007), ha captado la atención de numerosos investigadores, debido a que muchos patógenos de plantas, animales y humanos emplean mecanismos de QS basados en señales AHL para la regulación de la síntesis de factores de virulencia o la formación de biopelículas (Williams et al., 2007). Se han llevado a cabo varios estudios de aplicación de QQ con bacterias patógenas de plantas. En el caso de *E. carotovora*, se han realizado estudios de infección de plantas transgénicas de tabaco que expresaban la sintetasa de la señal *N*-oxo-octanoil-L-homoserín lactona (OC8-HSL) de esta bacteria. Como las poblaciones bacterianas usan las moléculas señal para percibir la densidad celular y coordinar su expresión génica, un incremento artificial de los niveles externos de OC8-HSL provocaría una interpretación errónea del tamaño de la población, desencadenando la expresión de factores de virulencia mucho antes de que la población bacteriana sea lo suficientemente grande para producir una infección, lo que permitiría a la planta activar sus defensas y evitar la invasión. Se probó la efectividad de esta estrategia en plantas de tabaco (Mäe et al., 2001). Sin embargo, Toth et al. (2004), en contradicción con el estudio anterior, encontraron que la producción de AHLs por plantas transgénicas de patata hace a las plantas más susceptibles y sensibles a las infecciones. Cuando se realizó expresión heteróloga del gen *aiiA* en *E. carotovora* se observó una reducción significativa en la síntesis de exoenzimas por la bacteria y una disminución en el desarrollo de síntomas de infección por *E. carotovora* en plantas (Dong et al., 2000). Los mismos resultados se obtuvieron con los importantes patógenos de plantas *Burkholderia thailandensis* y *E. amylovora* (Ulrich, 2004; Molina et al., 2005). Otra estrategia utilizada fue la expresión por plantas transgénicas de la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp., lográndose en este caso obtener plantas de tabaco y patata con resistencia a *E. carotovora* (Dong et al., 2001). Estas estrategias requieren la modificación genética de organismos superiores, lo que limita su aplicación biotecnológica debido a las limitaciones legales sobre el cultivo de plantas transgénicas. En otro estudio con *P. aeruginosa*, la adición de la acilasa AhIM

purificada a los medios de cultivo también supuso una reducción significativa en la producción de factores de virulencia por el patógeno (Park et al., 2005).

Estudios de aplicación de estrategias de QQ también se han mostrado eficaces en patógenos del medio acuático. Como ejemplos podemos citar el uso de consorcios bacterianos con actividad degradadora de AHLs para la protección de *Artemia* sp. contra cepas patógenas de *Vibrio harveyi* (Cam et al., 2009), la utilización de furanonas naturales para la inhibición de patogenicidad de aislados de *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* sobre *Artemia* (Defoirdt et al., 2006). Tinh et al. (2007) lograron, también con furanonas, neutralizar el efecto negativo de *V. harveyi* sobre rotífero, pero desafortunadamente las furanonas resultaron tóxicas tanto para las artemias como para el rotífero. El uso de la furanona sintética C-30, en concentraciones no tóxicas, inhibió significativamente la patogenicidad de *V. anguillarum* en trucha arcoiris (Rasch et al., 2004).

Los ejemplos anteriores demuestran que las enzimas degradadoras de AHLs junto con los inhibidores de QS podrían ser utilizados con éxito para interferencia con la comunicación bacteriana y el control de infecciones bacterianas. Además, este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *P. aeruginosa*. El interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas radica en que al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno, sino a la expresión de los factores de virulencia, no deberían ejercer presión selectiva, evitando la aparición de resistencias.

4. Quorum sensing y quorum quenching en el medio marino

A pesar de que los procesos de QS y QQ fueron descubiertos originalmente en el medio marino (Nealson et al., 1970; Givskov et al., 1996) se ha prestado poca atención en los últimos años a la importancia ecológica de estos mecanismos en mar. Las bajas densidades encontradas en las poblaciones bacterianas de alta mar y la baja estabilidad de las AHLs en este medio, han llevado a sugerir que los procesos de QS mediados por AHLs podrían reducirse a microhábitats específicos como las biopelículas, “nieve marina” y nichos eucariotas (Cicirelli et al., 2008; Hmelo y Van Mooy, 2009). Así, la

búsqueda de homólogos de *luxI* y *luxR* en las secuencias de metagenomas marinos disponibles dio como resultado un número muy bajo de candidatos, estando estos metagenomas principalmente representados por genomas de bacterias planctónicas debido a la desviación generada por el sistema de filtración de agua de mar usado (Case et al., 2008). Por el contrario, se había obtenido un porcentaje alto de cepas productoras de AHLs en muestras procedentes de biopelículas de la zona intermareal (Huang et al., 2008; Tait et al., 2009), esponjas (Mohamed et al., 2008) y, aunque con menor frecuencia, también en nieve marina y aislados microalgales (Gram et al., 2002).

Existen otras evidencias que demuestran que el QS mediado por AHL es frecuente en el medio marino, detectándose actividad AHL en cerca de un 60% de las α -Proteobacteria aisladas de diferentes muestras marinas, incluyendo especies planctónicas y bacterias asociadas a algas (Wagner-Dobler et al., 2005). Las señales AHL parecen también tener un papel importante en las interacciones entre eucariotas y procariotas en el hábitat marino, como demuestra la necesidad de presencia de AHLs para la selección de superficies con biopelículas bacterianas para la fijación permanente de zoosporas del alga verde *Ulva* (Tait et al., 2005; 2009), para la liberación de esporas del alga roja *Acrochaetium* sp. (Weinberger et al., 2007) y para el asentamiento inicial de larvas en el poliqueto *Hydroides elegans* (Huang et al., 2007). Además, la producción de AHLs es habitual en bacterias patógenas de peces incluyendo: *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* o *Edwardsiella tarda* (Freeman y Bassler, 1999; Swift et al., 1999; Croxatto et al., 2002; Buch et al., 2003; Kim et al., 2003; Bruhn et al., 2005; Morohoshi et al., 2004) (Tabla 3). Debido a que estas señales controlan la expresión de importantes factores de virulencia en estos patógenos, la posibilidad del uso de procesos de interceptación de QS se ha propuesto como alternativa a la utilización de antibióticos para el control de infecciones en acuicultura (Defoirdt et al., 2004) y la viabilidad de esta aproximación ya ha sido demostrada en diferentes trabajos (Rasch et al. 2004; Tinh et al., 2008).

La información disponible acerca de la existencia de procesos de QQ en el medio marino es todavía escasa, aunque algunas evidencias indirectas indican que estos fenómenos podrían ser frecuentes. Así, se sabe que las AHLs se degradan más rápidamente en agua de mar natural que en agua de mar artificial y estas observaciones

se han relacionado con la presencia actividad QQ debida a enzimas en el agua (Hmelo y Van Mooy, 2009). Otra evidencia es que cuando se añaden AHLs a los medios de cultivo se incrementa la eficiencia de cultivo de poblaciones bacterianas marinas (Bruns et al., 2002).

Especie	Señal	Genes	Factores regulados	Autores
<i>Vibrio harveyi</i>	OHC4-HSL y AI-2	<i>luxLM/luxN</i>	Producción de sideróforos, toxinas, sistema de secreción III, luminiscencia	Bassler et al., 1993
<i>Vibrio anguillarum</i>	OC10-HSL, C6-HSL y OC6-HSL	<i>vanI/vanR</i> <i>vanM/vanN</i>	Metaloproteasa, pigmento, biopelícula	Milton et al., 1997; 2001
<i>Vibrio vulnificus</i>	C4-HSL y AI-2	?	Proteasa, hemolisina	Valiente et al., 2009
<i>Vibrio salmonicida</i>	C6-HSL y OC6-HSL	?	Desconocidos	Bruhn et al., 2005
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4 y C6-HSL	<i>ahyI/ahyR</i>	Proteasas y metaloproteasas	Swift et al., 1997
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4 y C6-HSL	<i>asaI/asaR</i>	Exoproteasa, biopelícula	Swift et al., 1997
<i>Edwardsiella tarda</i>	C6 y C7-HSL	<i>edwI/edwR</i>	Desconocidos	Morohoshi et al., 2004
<i>Yersinia ruckeri</i>	C8-HSL y OC8-HSL	?	Desconocidos	Bruhn et al., 2005

Tabla 3. Listado de bacterias patógenas marinas en las que se ha descrito la producción de señales de quorum y las funciones controladas por QS.

Mientras que existe un número considerable de estudios que describen la presencia de actividad QQ en muestras de suelo, incluyendo búsquedas de genes homólogos a los codificadores de enzimas de QQ en metagenomas de suelo (Williamson et al., 2005; Riaz et al., 2008; Schipper et al., 2009), que han permitido el aislamiento de varias cepas bacterianas capaces de degradar AHLs y el establecimiento de la prevalencia de los procesos de QQ en estas muestras (Leadbetter y Greenberg, 2000; Park et al., 2003; Uroz et al., 2003; Wang y Leadbetter, 2005), no hay estudios sobre actividad QQ de AHLs en bacterias marinas que nos permitan evaluar la importancia ecológica de estos procesos en el medio marino, ni el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas específicas basadas en cepas marinas con actividad QQ. Sólo recientemente Tinh et al. (2007) han aplicado con éxito cultivos de enriquecimiento para demostrar la capacidad de consorcios bacterianos procedentes de intestino de camarón de acuicultura para degradar AHLs, aunque la muestra no sea estrictamente de origen marino ni las bacterias identificadas ni el tipo de actividad

Introducción

enzimática sobre AHLs caracterizada. También recientemente *Halobacillus salinus* ha sido descrito como productor de metabolitos secundarios antagonistas de AHLs (Teasdale et al., 2009) y una *Shewanella* sp. aislada de biopelícula marina como degradadora de AHLs (Tait et al., 2009). Es por lo tanto necesario la realización de un estudio que nos permita evaluar el potencial del medio marino como fuente de aislados con actividad QQ.

OBJETIVOS/OBJECTIVES

Los principales objetivos de este trabajo fueron:

1) Estudiar la existencia y estimar la frecuencia de bacterias cultivables capaces de interferir con sistemas de quorum sensing mediados por AHLs en diferentes hábitats marinos:

a) Comunidades bacterianas densas de origen costero expuestas a una elevada carga orgánica: el sedimento de un tanque de cultivo de peces, una biopelícula de tanque reservorio de agua de mar filtrada y el alga *Fucus vesiculosus*.

b) Muestras agua de mar de estuario y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad.

2) Caracterización de los aislados obtenidos con alta actividad QQ contra AHLs para evaluar su potencial uso biotecnológico.

The main objectives of this work were:

1) The study of the presence and estimation of the frequency of cultivable bacteria capable of interfering with AHL quorum sensing systems in different marine environments:

a) Bacterial communities obtained from sites with high organic load: the sediment from a fish culture tank, a biofilm from a filtered seawater reservoir tank and the marine algae *Fucus vesiculosus*.

b) Marine water samples from estuary and ocean at 0 and 10 meter depth.

2) Characterization of the obtained isolates with high QQ activity against AHLs in order to evaluate its biotechnological potential.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Quorum quenching en el medio marino

1.1 Metodología de cuantificación de bacterias cultivables y aislamiento

Para la detección de bacterias marinas con actividad QQ sobre AHLs se procedió al aislamiento, con material esterilizado, de cepas procedentes de muestras de diferentes medios marinos. Las muestras fueron seleccionadas en función de su carga orgánica y bacteriana:

- Una muestra de sedimento de tanque de cultivo de peces con circuito cerrado de agua de mar en la Universidad de Santiago (Junio 2007).
- En Illa de Arousa (N 42°.33'.45" W 8°.53'.08") se obtuvo una muestra procedente de biopelícula sumergida de pared de un tanque exterior de cemento (25.000 L), que sirve como reservorio de agua de mar filtrada para una estación de acuicultura y en el que el agua era renovada de forma constante (Junio 2007).
- En el mismo lugar se tomó una muestra de alga *Fucus vesiculosus* de rocas de la zona intermareal. Un gramo del alga escurrida se troceó y resuspendió en 10 mL de agua de mar esterilizada (Junio 2007).
- También en Illa de Arousa se tomó una muestra de agua de mar de estuario (Enero 2010).
- En alta mar, entre las rías de Vigo y Pontevedra (N 42°.17'.07" W 8°.53'.27") se tomaron muestras de agua a 0 y 10 metros de profundidad (Enero 2010).

Los medios sólidos empleados para el aislamiento incluyeron medios con alta concentración de nutrientes como: agar de triptona y soja con 1% NaCl (TSA-I) y agar marino (AM, Difco), adecuados para bacterias eutróficas, y también medios con baja concentración de nutrientes como: agar marino en dilución 1/100 (AM 1/100), agua de mar filtrada y autoclavada (FAS, Schut et al., 1993) suplementada con 1 g/L de casaminoácidos (FAS CAS) y medio FAS suplementado con 0,5 g/L de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL) (Bruns et al., 2002). Se prepararon 3 diluciones en órdenes de 10 (1/10, 1/100 y 1/1000) en agua de mar esterilizada para cada una de las muestras y se sembraron en placas con los medios de cultivo citados. Las placas fueron incubadas a 15 y 22°C durante 15 días. Para la estima de la densidad bacteriana se seleccionaron las placas que contenían entre 30-300 colonias. Se aislaron un total de

630 colonias en función de su diferente morfología y coloración para el análisis de actividad QQ. Puesto que todas las cepas obtenidas fueron capaces de crecer en AM a 22°C, se seleccionaron estas condiciones de cultivo, como método de cultivo estándar y para manipulación en laboratorio.

1.2 Detección de actividad quorum quenching

Para detectar la presencia de actividad QQ las cepas aisladas se cultivaron en presencia de AHLs y se cuantificó mediante biosensores la concentración de AHL tras 24 horas de exposición. Las cepas se probaron en dos tipos de ensayo: en medio líquido y sólido. Las AHLs utilizadas para el ensayo líquido fueron *N*-butanoil-L-homoserín lactona (C4-HSL) y C12-HSL. Para cuantificar las AHLs se utilizaron dos biosensores de *E. coli* JM109 transformados cada uno con un plásmido portador del operón *lux*, para la detección de C4-HSL (pSB536) y para la detección de C12-HSL (pSB1075), y se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con el antibiótico adecuado (Swift et al., 1997; Winson et al., 1998). Cada aislado marino se inoculó en tubos con 1 mL de caldo marino (CM) y se incubaron a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas de incubación el cultivo se dividió en dos tubos, que se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. Los correspondientes pellets se resuspendieron en CM fresco con 50 µM de C4 ó C12-HSL y se incubaron durante otras 24 horas a 22°C y 200 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm, 5 min. y se pipetearon 10 µL de sobrenadante de cada cultivo en placas microtiter negras Fluoro Nunc F96 MicroWell™. La interceptación de AHLs se midió con la adición de 90 µL de una dilución 1/100 de cultivos de 12 horas a 37°C y 200 rpm de las correspondientes cepas biosensoras basadas en *lux*, *E. coli* JM109 pSB536 ó pSB1075, usando un luminómetro (Ultra Evolution Xfluor4beta E 4.51e) tras 4 horas de incubación a 37°C de las placas microtiter. Se dispusieron diferentes placas para cada AHL y biosensor. Como controles se usaron pocillos con 10 µL de CM con y sin C4 ó C12-HSL 50 µM. Los biosensores *E. coli* JM09 pSB536 y pSB1075 fueron proporcionados por el Prof. Miguel Cámara del Centre for Biomolecular Sciences de la Universidad de Nottingham (Reino Unido).

Para el ensayo sólido se utilizó el biosensor de AHLs *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997). Este biosensor es incapaz de producir su

pigmento púrpura característico (violaceína) al tener mutado su gen productor de señal C6-HSL, de manera que únicamente produce la violaceína en respuesta a AHLs añadidas exógenamente. Las cepas marinas aisladas se inocularon en tubos con 1 mL de CM a 22°C y 200 rpm, y tras 24 horas se añadieron 40 µL de una disolución stock de C6-HSL obteniéndose una concentración final de 2 µg/mL (10 µM) en los tubos, que se incubaron 24 horas más. Para la detección de interceptación de actividad C6-HSL se tomaron 50 µL de los sobrenadantes y se añadieron, en duplicado, a pocillos practicados en placas de LB cubiertas con 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de 12 horas de *C. violaceum* CV026 en LB blando (8% de agar) y se añadieron otros 50 µL de agua destilada estéril. Se utilizó CM suplementado con C6-HSL en concentración 10 µM como control en todas las placas, además de un control negativo sin actividad QQ con la bacteria marina *V. anguillarum* con C6-HSL en la misma concentración para cada tanda de ensayos. Las placas así preparadas se incubaron 24 horas a 30°C para posterior observación de la producción de violaceína. Las cepas positivas para interceptación de C6-HSL fueron posteriormente ensayadas, con la misma metodología, para *N*-decanoil-L-homoserín lactona (C10-HSL) utilizando el biosensor *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi et al., 2008a) capaz de detectar AHLs de cadena larga.

Para detectar la posible producción de AHLs se usó el biosensor *C. violaceum* CV026 en medio sólido como se describió anteriormente, con sobrenadantes de cultivos en 1 mL en CM de los aislados marinos. Para la detección de AHLs de cadena larga se llevó a cabo un bioensayo de inhibición añadiendo C6-HSL en concentración 10 µM al LB blando. El biosensor *C. violaceum* CV026 fue proporcionado por el Prof. Miguel Cámara del Centre for Biomolecular Sciences de la Universidad de Nottingham (Reino Unido), el biosensor *C. violaceum* VIR07 fue proporcionado por el Dr. Tomohiro Morohoshi del Department of Applied Chemistry de la Universidad de Utsunomiya (Japón).

Para detectar degradación de AHLs con sustituciones en su cadena lateral se realizó un bioensayo en medio sólido similar al anterior con el biosensor *E. coli* JM109 pSB1075 para OC12-HSL. La OC12-HSL se añadió en concentración 2 µg/mL (10 µM) a cultivos de 24 horas de las cepas marinas que se incubaron 24 horas más a 22°C y 200 rpm. Posteriormente se determinó la interceptación de actividad AHL en placas de LB cubiertas con 5 mL de LB blando inoculado con 50 µL de cultivo de 12 horas de *E. coli*

JM109 pSB1075 a 37°C y 200 rpm. Las placas se incubaron 3 horas a 37°C y se examinó la producción de luz por el biosensor debido a la presencia de OC12-HSL mediante cámara fotográfica de alta sensibilidad.

Se llevaron a cabo análisis estadísticos del efecto de la temperatura, medio de cultivo utilizado y el origen de las muestras sobre el número de cepas QQ activas detectadas, mediante tests de Fisher y Chi cuadrado de Pearson, para un nivel de significación $\alpha=0,05$, con el programa SPSS statistics V17.0 (SPSS, inc.).

1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS

Se comprobó, mediante HPLC-MS, si las cepas activas contra AHLs presentaban actividad degradadora de señales. Para ello se utilizaron las señales C4 y C12-HSL, que se añadieron a una concentración de 50 μM a cultivos de 24 horas en 1 mL de CM de las cepas seleccionadas y se incubaron 24 horas más a 22°C y 200 rpm. Se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos por centrifugación (10.000 rpm, 5 min). 500 μL fueron acidificados a pH 2 con HCl 1 M e incubados 24 horas a 25°C para permitir la recircularización del anillo lactona en el supuesto de que la actividad degradadora se deba a la acción de una lactonasa. Ambos sobrenadantes (acidificado y sin acidificar) se extrajeron tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo. El solvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno y el extracto se resuspendió en 200 μL de acetonitrilo para posterior análisis y cuantificación por HPLC-MS. Como controles se utilizaron CM fresco y CM enriquecido con la misma cantidad de C4 ó C12-HSL, procesados y extraídos orgánicamente de la misma forma.

El análisis se llevó a cabo con un HPLC 1100 series (Agilent EEUU) equipado con una precolumna C8 (2,1x12,5 mm, 5 μm de tamaño de partícula) y una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm (con 5 μm de tamaño de partícula), mantenidas a 45°C. Se estableció una fase móvil con 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). La tasa de flujo fue de 0,22 mL/min. Las condiciones de elución: 0 min 35% de B, gradiente lineal hasta 60% de B durante 10 min, un gradiente lineal de 60 al 95% de B durante 5 min y luego 5 min a 95% de B y un minuto para volver a las condiciones iniciales que se mantuvieron durante 9 min. Alícuotas de 20 μL de cada muestra se diluyeron en acetonitrilo con 0,1% de ácido

fórmico antes de su inyección en la columna. El espectrómetro de masas (MS) utilizado fue un API 4000 triplecuadrupolo (Applied Biosystem, CA, EEUU) equipado con una fuente TurboIon utilizada en modo electrospray de iones positivos y monitorización de múltiples reacciones (MRM). Las señales MRM se utilizaron para obtener información de cuantificación relativa por comparación con una curva de calibración construida por abundancia de iones moleculares obtenidos a partir de AHLs sintéticas estándar (Milton et al., 2001).

1.4 Identificación de aislados

La identificación de cepas marinas con actividad QQ se llevó a cabo mediante amplificación y secuenciación parcial de genes de ARN ribosómico 16S. Para la extracción de ADN genómico de las bacterias se utilizó el kit Puregene Tissue Core y la amplificación de ARNr 16S se realizó con los cebadores universales: ANT1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y S (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT) (Martinez-Murcia y Rodriguez-Valera, 1994). Las reacciones de PCR se realizaron en condiciones estándar: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, hibridación a 50°C durante 30 seg, extensión a 72°C durante 2 min. Precedidos de 2 minutos de desnaturalización a 94°C y seguidos de 7 min de extensión a 72°C. Los productos de PCR se secuenciaron parcialmente y fueron revisados y corregidos con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.0.9.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las secuencias se compararon con las secuencias de genes de ARNr 16S disponibles en el GenBank usando la herramienta BLAST de NCBI (Altschul et al., 1997) y las del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Las secuencias de genes de ARNr 16S fueron alineadas con sus más próximas en las bases de datos usando MUSCLE (Edgar, 2004). Para eliminar gaps y posiciones de alineamiento ambiguo se usó Gblocks (Castresana, 2000). Se construyó un árbol filogenético por el método del vecino más próximo (“neighbour-joining”) basado en ARNr 16S con el software MEGA4 (Zmasek y Eddy, 2001; Tamura et al., 2007).

2. Análisis de secuencias de quorum quenching en colecciones de metagenomas

Con el objetivo de detectar posibles genes de QQ, se realizó una búsqueda en metagenomas de diferentes hábitats marinos disponibles en las bases de datos mediante BLASTX de secuencias homólogas a las ya conocidas para enzimas de QQ. Como modelos marinos se utilizaron: las secuencias de metagenomas de microorganismos de superficie de agua de océano (Global Ocean Sampling GOS, 16,96 Gpb) (Venter et al., 2004; Rusch et al., 2007), de muestras de 10, 70, 130, 200, 500, 770 y 4000 m (64,2 Mpb) de columna de agua del Pacífico norte (DeLong et al., 2006) y de biomasa procedente de 25, 75, 125 y 500 m de profundidad (48,3 Mpb) (Shi et al., 2009), una muestra de 3000 m de profundidad del mar Mediterráneo (7,5 Mpb) (Martin-Cuadrado et al., 2007) y de las secuencias de biomasa obtenida a partir de esqueletos de ballena hundidos (75 Mpb) (Tringe et al., 2005). Las secuencias de metagenomas se compararon con las secuencias de lactonasas y acilasas conocidas y las secuencias obtenidas con mayor homología se seleccionaron para ser “filtradas” por longitud de alineamiento y porcentaje de similitud con los genes de QQ. Debido a los diferentes tamaños de bases de datos y para que los resultados para cada colección fueran comparables, el número de secuencias fue normalizado dividiéndolo entre las megabases secuenciadas en cada colección.

Para una primera búsqueda, se estableció el nivel de corte en 50% de similitud para la selección de secuencias consideradas como genes QQ, en el 70% del tamaño de la secuencia ambiental. Debido a la baja homología que los genes de QQ presentan entre si se utilizaron también los niveles del 30% de similitud en el 70% de la secuencia (Park et al., 2003). También se tuvieron en cuenta las situaciones en las que se obtuvo una buena similitud pero el tamaño de la secuencia ambiental era mucho mayor que el de la acilasa o lactonasa. En el caso de las lactonasas, en las secuencias positivas se comprobó la presencia de los dominios característicos de estas enzimas. Así, se extrajeron las secuencias lactonasa positivas y se examinó la presencia del dominio β -lactamasa (Dong et al., 2000) o el dominio de la familia fosfotriesterasa (PTE) presente en QsdA de *Rhodococcus erythropolis* (Uroz et al., 2008). Esto se hizo con el programa hmmpfam del paquete HMMER (Eddy, 2008). Los modelos de dominios de proteína se obtuvieron de la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Para comparar la de

abundancia de secuencias de enzimas de QQ en medio marino con medio terrestre, se utilizó también la colección metagenómica de un suelo de granja de Minnesota (EEUU) (16,7 Gpb) (Tringe et al., 2005).

3. Análisis de secuencias de quorum quenching en genomas secuenciados

Se realizó una búsqueda mediante BLASTP de secuencias homólogas a las lactonasas y acilasas conocidas hasta la fecha y disponibles en las bases de datos “nr” (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>). Como resultado se obtuvieron los números de acceso correspondientes a diferentes homólogos de las lactonasas y acilasas. Estos se clasificaron por porcentaje de similitud superior o igual a 50 ó 30% para un 70% de cobertura de las secuencias. Con el número de acceso de las proteínas fue posible realizar una clasificación taxonómica de los microorganismos a los que correspondían y obtener su secuencia de ARNr 16S (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez>). Las secuencias se alinearon mediante el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y se construyó un árbol filogenético por método del vecino más próximo (“neighbour-joining”) con el software MEGA4 (Tamura et al., 2007) utilizado con sus valores por defecto.

4. Quorum quenching en *Tenacibaculum*

4.1 Especificidad de la actividad quorum quenching

Por ser considerada la cepa más interesante de las obtenidas con actividad QQ, se seleccionó *Tenacibaculum discolor* 20J para determinar el tipo de actividad QQ que presentaba y su especificidad contra todo el rango de tamaños de cadena lateral de AHLs del que se disponía en el laboratorio. Para ello la cepa fue inoculada en 20 mL de CM e incubada a 22°C y 200 rpm, tras 24h se tomaron muestras de 500 µL para su centrifugación (10.000 rpm, 5 min). Los pellets se resuspendieron en 500 µL de CM, con diferentes AHLs a una concentración de 50 µM. Las señales utilizadas fueron: C4, C6, C8, C10, C12 y *N*-tetradecanoil-L-homoserín lactona (C14-HSL). Tras otras 24 horas de incubación a 22°C y 200 rpm, los sobrenadantes de estos cultivos (10.000 rpm, 5 min) se extrajeron tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo y se

evaporaron bajo flujo de nitrógeno. El extracto seco obtenido se resuspendió en 200 μ L de acetonitrilo y se procedió a la cuantificación de las AHLs por HPLC-MS. De la misma forma se extrajeron muestras control con 500 μ L de CM y CM + AHL 50 μ M.

Para detectar actividad enzimática degradadora de AHLs tipo lactonasa en *T. discolor* 20J se llevaron a cabo dos tipos de ensayos. Duplicados de los sobrenadantes anteriormente descritos de C4 y C12-HSL se acidificaron hasta pH 2 con HCl 1M y se incubaron 24 horas más en las mismas condiciones para la posterior extracción de AHLs y cuantificación por HPLC-MS. También se realizó un bioensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 para la señal C6-HSL 20 μ M y con *C. violaceum* VIR07 para C10 y C12-HSL 20 μ M, con y sin acidificación hasta pH 2. En este caso tras la degradación de las señales por cultivos de *T. discolor* 20J se realizaron extracciones orgánicas de los sobrenadantes y sobrenadantes acidificados de los cultivos y los extractos secos se resuspendieron en agua para posterior ensayo en pocillo con los biosensores de *C. violaceum* correspondientes

4.2 Cinética de degradación de AHLs

Se incubaron a 22°C y 200 rpm 60 mL de CM inoculados con *T. discolor* 20J. Tras 24 horas, el cultivo fue dividido y centrifugado (10.000 rpm, 5 min), y el pellet se lavó dos veces con 10 mL de PBS pH 6,5. En las dos suspensiones celulares así obtenidas se añadió C4 ó C12-HSL a una concentración final de 30 μ M. Las mezclas de reacción se incubaron a 22°C y 200 rpm durante 24 horas, tomándose muestras de 500 μ L a diferentes tiempos desde el tiempo 0 h. Estas muestras se extrajeron, y las concentraciones de C4 ó C12-HSL restantes en cada muestra se determinaron por HPLC-MS con la metodología descrita.

4.3 Localización de la actividad degradadora de AHLs

Para determinar la localización de la actividad degradadora de AHLs, se obtuvieron el sobrenadante y extracto celular crudo (CCE) de cultivos de 24 horas de *Tenacibaculum discolor* 20J en 15 mL de CM. Los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm para separar la biomasa del medio de cultivo. El sobrenadante se

filtró a través de un filtro de 0,22 μm y se almacenó a 4°C, previo uso. El pellet se lavó con 15 mL de PBS pH 6,5, se resuspendió en otros 5 mL del mismo tampón, se sonicó mediante pulsos de 30 seg, durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. El CCE así obtenido se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y se almacenó a 4°C (Uroz et al., 2005). Con el sobrenadante y el CCE de *T. discolor* 20J se realizaron dos ensayos:

- Un ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 y VIR07 como se describió anteriormente. Se incubaron 500 μL de sobrenadante y de CCE durante 24 horas con C6 ó C10-HSL 20 μM a 22°C y 200 rpm. Los controles se incubaron de la misma forma, con 500 μL de CM o PBS + AHL 20 μM .
- Cuantificación por HPLC-MS de extractos obtenidos de 500 μL de sobrenadante y de CCE incubados 24 horas con C4 ó C12-HSL 50 μM a 22°C y 200 rpm con o sin acidificación hasta pH 2 con HCl 1M (24 horas más a 22°C y 200 rpm). Las concentraciones de las AHLs tras este ensayo fueron cuantificadas por HPLC-MS como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con la degradación del cultivo completo (bacteria viva) incubado en las mismas condiciones y con controles de CM fresco con C4 ó C12-HSL 50 μM .

4.4 PCR para lactonasas y acilasas

Para determinar si los genes responsables de actividad QQ sobre AHLs en *T. discolor* 20J codificaban lactonasas o acilasas se realizaron PCRs con cebadores degenerados diseñados para las secuencias más conservadas de estas enzimas. Las secuencias de cebadores para lactonasas fueron: 5'-GAGGATCCCA YCTICAYKYNGAYCA y 5'-ATGAATTCGGIGTRTGNCCNGGNGT (Park et al., 2003). Para acilasas: 5'- GSIAAYCCNCAYYTYCCNTGG y 5'-TCIGCNGCDATIGTRTTNACCCANGG (Park et al., 2005). Las reacciones de PCR se realizaron en las condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 seg, hibridación a 50 ó 55°C durante 45 seg, extensión a 72°C durante 45 seg. Precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 95°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C.

4.5 Clonación de genes de quorum quenching de *Tenacibaculum discolor* 20J

Se llevó a cabo un intento de clonación de los genes de QQ responsables de las actividades degradadoras de AHLs presentes en *T. discolor* 20J. Mediante la construcción de una librería genética en plásmido y su expresión en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAOI en la que sólo los clones capaces de eliminar la actividad AHL pueden sobrevivir. Para ello se realizó una extracción de ADN de *T. discolor* 20J con Genomic DNA purification kit (Promega). El ADN genómico (20 µg) se incubó a 37°C durante 10 min en diluciones seriadas con la enzima de restricción Sau3A1 (Promega), obteniéndose una digestión parcial de ADN. El resultado de la digestión de ADN se cromatografió en gel de agarosa (1%), de donde se extrajeron bandas correspondientes a fragmentos de ADN de tamaño entre 2 y 4 kb con GeneClean III kit (Qbiogene). Los fragmentos de ADN se ligaron luego en el plásmido pME6000 (portador de un gen de resistencia a tetraciclina) (Maurhofer et al., 1998), digerido con BamHI y defosforilado con fosfatasa alcalina (Promega) para evitar su recircularización. Se transformó *P. aeruginosa* PAOI portadora del plásmido pMH655 (con gen de resistencia a gentamicina) (Rasmussen et al., 2005) con la librería genética así obtenida. La transformación se realizó de la siguiente forma: 1,5 mL de un cultivo de 12 h de *P. aeruginosa* PAOI pMH655 a 42°C en 5 mL de LB + gentamicina 20 µg/mL, se centrifugó 5 min a 10.000 rpm. El pellet obtenido se lavó dos veces con un 1 mL de MOPS 1 mM / Glicerol 10% a pH 7,2 (4°C) y se resuspendió con el volumen de enrase del pellet. La suspensión celular así obtenida se electroporó con 2 µL de librería. El plásmido pMH655 presenta una fusión del promotor de *lasB* y el gen *sacB* codificador de la levanosacarasa de *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1983). Se trata de un biosensor de QQ denominado “quorum sensing inhibitor selector” (QSIG) (Rasmussen et al., 2005), el gen *lasB* codifica la elastasa B de *P. aeruginosa*, gen involucrado en su patogenicidad cuya expresión esta controlada por QS basado en AHL de esta bacteria. La levanosacarasa SacB secretada por *Bacillus subtilis* cataliza una hidroxilación de la sacarosa propiciando la formación del polímero bactericida levano (Gay et al., 1983). Como resultado, en presencia de AHLs y sacarosa se producirá la expresión de *sacB* y la producción de levano, provocando la muerte de la bacteria. Sólo aquellos clones portadores de un gen de QQ prodrán sobrevivir.

El medio utilizado para la detección de clones con actividad QQ se preparó de la siguiente forma: LB sólido (15% de agar), sacarosa 60 mg/mL, citrato sódico 40 mM, OC12-HSL 200 nM, C4-HSL 200 nM, Gentamicina 80 µg/mL y Tetraciclina 125 µg/mL. Las placas selectivas se inocularon con 100 µL de suspensión bacteriana transformada y se incubaron a 37°C. Tras 24 horas se observó crecimiento. El número de clones analizados por cada transformación se determinó mediante placas control sin sacarosa donde se contaron el número de colonias obtenidas. Para conocer el número mínimo de clones que se debían analizar para asegurar, con un 99% de probabilidad, que se ha analizado el gen o genes responsables de la actividad QQ en *T. discolor* 20J se utilizó la fórmula: $N = \ln(1 - P)/\ln(1 - f)$. Donde P es la probabilidad asignada (0,99), f es la proporción del genoma representada en un único clon y N es el número de recombinantes a analizar para obtener P. Se consideró que la bacteria analizada tendría aproximadamente 7000 genes, con lo que el valor de $f = 1/7000$ y para $P = 0,99$ implicó el análisis de 32000 recombinantes.

Para comprobar la validez de la metodología utilizada se realizó una transformación del mismo biosensor QSI5 *P. aeruginosa* PAOI pMH655 con el plásmido pME6000 portador del gen *aiiA* codificador de lactonasa de *Bacillus* sp. El biosensor de QQ *P. aeruginosa* PAOI pMH655 fue proporcionado por el Prof. Michael Givskov del Department of International Health, Immunology and Microbiology de la Universidad de Copenhague (Dinamarca).

4.6 Análisis de patogenicidad de *Tenacibaculum discolor* 20J

Con el objetivo de determinar si la cepa 20J de *T. discolor* aislada en este trabajo podría tener aplicaciones biotecnológicas para acuicultura se comprobó si ésta era patógena de peces. Para ello se realizó una infección experimental de juveniles de rodaballo (25 gramos de peso medio) mantenidos en un flujo constante de agua de mar a 15°C con niveles de oxígeno superiores a 8 mg/L y 32 ‰ de salinidad. Para los ensayos de patogenicidad los peces fueron aclimatados a las condiciones anteriores durante 5 días y luego fueron infectados mediante inoculación intraperitoneal de 100 µL de una suspensión bacteriana de *T. discolor* 20J en solución salina (10^9 células por mililitro).

Se estableció un grupo control inoculado con 100 µL de solución salina. Se examinó la mortalidad durante 21 días.

4.7 Degradación de AHLs en el género *Tenacibaculum*

Para comprobar si la actividad degradadora de AHLs detectada en *T. discolor* 20J era común en el género *Tenacibaculum*, se realizaron también ensayos con los biosensores *C. violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) y VIR07 (Morohoshi et al., 2008a) para diferentes especies (Tabla 4). Veinte microlitros de soluciones stock de C6 ó C10-HSL se añadieron a cultivos de 24 horas de las diferentes especies del género *Tenacibaculum* en CM, con una concentración final de 10 µM, e incubadas 24 horas a 22°C. Además, en la cepa tipo *T. maritimum* NCIMB 2154^T se añadió la misma cantidad de AHLs al sobrenadante filtrado (0,22 µm) de un cultivo de 24 horas en CM. La degradación de AHL se determinó por la producción de violaceína en ensayo en placas de LB con pocillos, como ha sido descrito anteriormente.

Cepas	Aislamiento	Origen
<i>T. discolor</i> 20J	Sedimento de tanque de cultivo	Este trabajo
<i>T. discolor</i> DSM 18842	<i>Solea senegalensis</i> , España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. discolor</i> LC073.2.2	<i>Solea senegalensis</i> , España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. discolor</i> R016.8.1	<i>Psetta maxima</i> , España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. gallaicum</i> R006.0.1	<i>Psetta maxima</i> , España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. gallaicum</i> A37.1	Agua de tanque de cultivo, España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. litoreum</i> JCM13039	Sedimento de zona intermareal, Corea	Japanese Collection Riken BCR (Hirosawa, Japón)
<i>T. maritimum</i> NCBI 2154 ^T	<i>Pargus major</i> , Japón	The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, UK)
<i>T. soleae</i> LL0412.1.7	<i>Solea senegalensis</i> , España	Dra. Ysabel Santos
<i>T. soleae</i> 567/06.1	<i>Dicentrarchus labrax</i> , España	Dra. Ysabel Santos

Tabla 4. Cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* ensayadas para degradación de AHLs.

Para evaluar el tipo de actividad degradadora de AHLs presente en *T. maritimum* NCIMB 2154^T se establecieron dos matraces con 15 mL de CM suplementado con C10-

HSL en concentración 10 μ M. Uno de los matraces fue inoculado con 1 mL de un cultivo de 48 horas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T e incubado a 22°C en agitación suave (110 rpm), mientras que el otro se mantuvo en las mismas condiciones como control. Tras 24 horas, 500 μ L de sobrenadante normal y acidificado (pH 2) se extrajeron tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo, se evaporaron y resuspendieron en 200 μ L de acetonitrilo para análisis por HPLC-MS. Se extrajeron también 500 μ L de CM + C10-HSL y la concentración de C10-HSL obtenida se utilizó para calcular el porcentaje de degradación.

5. Señales de quorum sensing en *Tenacibaculum*

5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Además de las bacterias del género *Tenacibaculum* de las que ya se disponía en el laboratorio y que habían sido utilizadas para comprobar la actividad QQ en el género (Tabla 4), para la detección de AHLs se analizaron también 8 nuevas cepas patógenas de *Tenacibaculum maritimum*: NCIMB 2153 y 2158, obtenidas de The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, UK) y 6 cepas aisladas en el departamento de Microbiología de la Universidad de Santiago procedentes de peces enfermos de estaciones de acuicultura de España y Portugal. Estas cepas pertenecen al los principales serotipos y líneas clonales de esta bacteria (Avendaño-Herrera et al., 2004; 2006) y fueron confirmadas como *T. maritimum* por análisis PCR (Toyama et al., 1996) (Tabla 5). Para el análisis de producción de AHLs las cepas se cultivaron rutinariamente a 22°C en medio *Flexibacter maritimum* (FMM) sólido y caldo (Pazos et al., 1996) o en AM/CM, con agitación suave a 110 rpm en caso de medio líquido. También se analizó la producción de AHLs en *Flavobacterium psychrophilum* PT4.1, que se creció rutinariamente en agar “Anacker and Ordal” en las mismas condiciones (Toranzo y Barja, 1993).

Se utilizaron tres biosensores basados en *lux* de *E. coli* JM109 (Swift et al., 1997; Winson et al., 1998) para la detección de AHLs en sobrenadantes y extractos de las diferentes especies del género *Tenacibaculum*. Las tres cepas biosensoras permiten la detección de todo el rango de tamaños de AHL debido a que presentan receptores con

distinta especificidad para las señales AHL. *E. coli* JM109 pSB401, con el gen codificador del receptor de AHL *luxR* (*V. fischeri*), se utilizó para detección de AHLs de tamaño intermedio; *E. coli* JM109 pSB536, con *ahyR* de *Aeromonas hydrophila*, para AHLs cortas y *E. coli* JM109 pSB1075, con *lasR* de *Pseudomonas aeruginosa*, para AHLs de cadena larga. Los tres biosensores se cultivaron a 37°C en LB suplementado con el antibiótico adecuado (Swift et al., 1997; Winson et al., 1998).

Cepas	Aislamiento	Serotipo ^(*)
NCIMB 2154 ^T	<i>Pargus major</i> , Japón	O1/O2 (O2)
NCIMB 2158	<i>Solea solea</i> , UK	O2
NCIMB 2153	<i>Acanthopagrus schlegeli</i> , Japón	O1/O2 (O1)
ACR104.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	O2
PC424.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España	O2
PC503.1	<i>Solea senegalensis</i> , España	O1
PC538.1	<i>Sparus aurata</i> , España	O1
LgH35-O3	<i>Solea senegalensis</i> , España	O3
ACC6.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Portugal	O3

Tabla 5. Cepas de *Tenacibaculum maritimum* utilizadas para la detección de señales AHL. ^(*) Serotipos según el esquema de tipado de Avendaño-Herrera et al. 2006.

5.2 Toma de muestras y extracción de AHLs

Se tomaron muestras de 40 mL de sobrenadantes de cultivos de las diferentes cepas de *Tenacibaculum* en FMM a 24 y 48 horas después de su inoculación. Se filtraron (0,22 µm) y reservaron 10 mL a -20°C y el resto se acidificaron a pH 2 con HCl 1M y se incubaron 24 horas a 25°C a 200 rpm. Posteriormente se realizó una doble extracción orgánica de AHLs con el mismo volumen de diclorometano y se evaporó en rotavapor a 40°C hasta obtener el extracto seco que se resuspendió en 1 mL de acetonitrilo. Los extractos así obtenidos se mantuvieron a -20°C para posteriores análisis.

Para estudiar el efecto del medio de cultivo en la producción de AHL, se seleccionó la cepa tipo de *T. maritimum* (NCIMB 2154^T). Se cultivó la bacteria en

FMM o CM y se tomaron muestras de 40 mL a diferentes tiempos tras inoculación: 12, 24, 48 y 75 horas. Las AHLs se extrajeron como se explicó anteriormente para posterior análisis con biosensores en luminómetro y HPLC-MS. Con el objetivo de reproducir la metodología utilizada por otros autores que no pudieron detectar la presencia de AHLs en el patógeno perteneciente al grupo de los Bacteroidetes *Flavobacterium psychrophilum*, también se realizaron extracciones de AHLs de medio sólido FMM y AM de *T. maritimum* NCIMB 2154^T y *Flavobacterium psychrophilum* PT4.1 cultivado en Anacker y Ordal agar. Para ello se transfirieron cortes de agar con colonias a tubos de cristal donde se homogeneizaron con disruptor con 3 mL de acetato de etilo (tres veces). Se separó el solvente por centrifugación a 3.000 rpm y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. Se reconstituyó el extracto seco obtenido con 1 mL de acetonitrilo para su posterior análisis (Bruhn et al., 2005).

Para determinar si se producían cambios en el modo de crecimiento en biopelícula de *T. maritimum* NCIMB 2154^T se añadió la señal C4-HSL en concentraciones: 1; 2,5; 5 y 10 µg/mL a cultivos de la bacteria en 15 mL de FMM o CM. La tinción de biopelícula se realizó con 500 µL de solución cristal violeta-oxalato (Panreac).

5.3 Detección e identificación de AHLs

5.3.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Dos microlitros de cada extracto orgánico de sobrenadantes de cultivo se cargaron sobre placas de TLC de gel de sílica C18 de fase reversa. Las muestras se cromatografiaron con metanol/agua (60/40% v/v) como fase móvil (Shaw et al., 1997). También se cargaron 2 µL de AHL sintética procedentes de stock con 10 µg/mL (50 µM) de concentración como controles. Las AHLs utilizadas fueron C4-HSL para *E. coli* JM109 pSB536, C8-HSL para *E. coli* JM109 pSB401 y C12-HSL para *E. coli* JM109 pSB1075. Las placas de TLC se secaron a temperatura ambiente y cubrieron con 3 mL de LB blando (8% de agar) inoculado con 30 µL de un cultivo de 12 horas de cada biosensor. Tras la solidificación del LB blando, las placas se incubaron a 37°C y cada

hora se colocaron placas de radiografía sobre las TLCs para la detección de emisión de luz por los biosensores.

5.3.2 Luminómetro

Los tres biosensores de *E. coli* JM109 también se utilizaron para la detección de AHLs en sobrenadantes “crudos” (no sometidos a extracción) y en extractos orgánicos en acetonitrilo. Los ensayos se llevaron a cabo en líquido en placas microtiter negras Fluoro Nunc F96 MicroWell™. Para sobrenadantes crudos, se mezclaron 100 µL con 150 µL de una dilución 1/100 en LB de un cultivo de 12 horas de los biosensores. Se establecieron tres pocillos por muestra y como controles positivos se añadieron AHLs sintéticas en concentración final 1 µg/mL (5 µM) ajustando el volumen a 100 µL con LB. Como controles negativos se establecieron pocillos con 100 µL de medio de cultivo fresco (FMM o CM).

En el caso de extractos de sobrenadantes, se evaporaron 100 µL de cada extracto directamente en las placas microtiter. Los extractos secos se resuspendieron luego en 150 µL de una dilución 1/100 en LB de un cultivo de 12 horas de biosensor. Del mismo modo se establecieron controles positivos y negativos evaporando 100 µL de AHLs sintéticas o acetonitrilo. Las placas microtiter se incubaron a 37°C durante 4 horas y se midió la producción de luz en luminómetro Ultra Evolution Xfluor4beta E 4.51e (Tecan Trading AG, Suiza). Los valores de bioluminiscencia se normalizaron con los valores obtenidos para los controles negativos.

5.3.3 HPLC-MS

Los extractos de sobrenadantes que activaron los biosensores de AHL fueron analizados posteriormente por HPLC-MS para identificación de sus AHLs. Los análisis por HPLC-MS se llevaron a cabo en dos laboratorios, en Nottingham (Reino Unido) y en Santiago de Compostela, usando diferentes equipos con condiciones similares. En Nottingham el equipo HPLC utilizado fue un Shimadzu series 10AD VP equipado con bombas binarias, un desgasificador de vacío y un autosampler SIL-HTc (Shimadzu, MD, EEUU). La columna usada fue una Phenomenex Gemini C18, 150 x 2 mm (5 µm

de tamaño de partícula) a 45°C. La fase móvil se estableció con 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). La tasa de flujo empleada fue de 0,45 mL/min. Las condiciones de elución fueron: 1 min con 0% de B, gradiente lineal hasta 50% de B en 0,5 min, gradiente lineal desde 50% hasta 90% de B durante 4 min, luego hasta 99% de B durante 2 min y vuelta a condiciones iniciales en 0,2 min. La columna se reequilibró durante 4 min. Se inyectaron alícuotas de 10 µL de cada muestra en la columna. Los análisis mediante MS se llevaron a cabo con un 4000 QTRAP hybrid triplecuadrupolo de trampa de iones lineal (Applied Biosystem, CA, EEUU) equipado con una fuente TurboIon utilizada en electrospray de ion positivo y en modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM). Se utilizaron como estándares las AHLs con o sin sustituciones oxo- o hidroxil- y de tamaños de cadena lateral entre 4 y 14 carbonos: C4-HSL, *N*-oxobutanoil-L-homoserín lactona (OC4-HSL), *N*-hidroxibutanoil-L-homoserín lactona (OHC4-HSL), C6-HSL, OC6-HSL, *N*-hidroxihexanoil-L-homoserín lactona (OHC6-HSL), *N*-heptanoil-L-homoserín lactona (C7-HSL), C8-HSL, OC8-HSL, *N*-hidroxioctanoil-L-homoserín lactona (OHC8-HSL), C10-HSL, *N*-oxodecanoil-L-homoserín lactona (OC10-HSL), *N*-hidroxidecanoil-L-homoserín lactona (OHC10-HSL), C12-HSL, OC12-HSL, *N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona (OHC12-HSL), *N*-tridecanoil-L-homoserín lactona (C13-HSL), *N*-oxotridecanoil-L-homoserín lactona (OC13-HSL), *N*-hidroxitridecanoil-L-homoserín lactona (OHC13-HSL), C14-HSL, *N*-oxotetradecanoil-L-homoserín lactona (OC14-HSL) y *N*-hidroxitetradecanoil-L-homoserín lactona (OHC14-HSL). Las AHLs en las muestras fueron identificadas por comparación de tiempos de elución y espectros de picos obtenidos para las estándar.

En Santiago de Compostela el equipo y condiciones utilizadas fueron las mismas que las descritas previamente (sección 1.3 de materiales y métodos).

5.4 Detección de AHLs *in vivo*

Se realizaron infecciones experimentales de juveniles de rodaballo (25 gramos de peso medio) mantenidos en un flujo constante de agua de mar a 15°C con niveles de oxígeno superiores a 8 mg/L y 32 ‰ de salinidad. Para los ensayos de patogenicidad los peces fueron aclimatados a las condiciones anteriores durante 5 días y luego fueron

infectados mediante inoculación intraperitoneal de 100 μ L de suspensión bacteriana de *T. discolor* DSM 18842 en solución salina (10^9 células por mililitro). Se examinó la mortalidad durante 21 días y se consideró debida a la inoculación de *T. discolor* DSM 18842, cuando la bacteria fue recuperada pura a partir de órganos internos de los peces muertos. Se inocularon muestras de sangre, hígado y riñón de peces muertos en placas de AM y FMM para la recuperación de *T. discolor* DSM 18842. Para la detección de AHLs, se extrajeron y pesaron los tejidos (hígado, bazo y riñón) y sangre de los peces asintomáticos, moribundos, muertos y sanos (inoculados con 100 μ L de solución salina). Los tejidos se homogeneizaron en disruptor celular en 3 mL de tampón PBS a pH 2 y se extrajeron tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo. Se evaporó el solvente orgánico bajo flujo de nitrógeno y el extracto seco así obtenido se resuspendió en 1 mL de acetonitrilo. Las muestras extraídas se guardaron a -20°C para la detección posterior de AHLs mediante HPLC-MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. Quorum quenching en muestras marinas con elevada densidad bacteriana y en metagenomas marinos

1.1 Resultados

1.1.1 Aislamiento bacteriano

El número de unidades formadoras de colonias (UFCs) para cada muestra fue muy diferente dependiendo del medio de cultivo y la temperatura de cultivo utilizada (Figura 10). La muestra con la mayor población bacteriana fue la obtenida en sedimento de tanque de cultivo de peces, alcanzando 3×10^6 UFCs/mL. La máxima cantidad de UFCs obtenida para la biopelícula de tanque de reserva de agua de mar fue un orden de magnitud menor que la de sedimento y la muestra de *F. vesiculosus* fue la de menor carga microbiana con un máximo de 3×10^4 UFCs/mL aproximadamente. Como era de esperar, la temperatura y, de modo más importante, el medio de cultivo utilizado para el aislamiento bacteriano influyeron en el número de bacterias viables aisladas. La temperatura de 22°C permitió el crecimiento de un mayor número de colonias en la mayoría de los casos. Los medios de cultivo AM 1/100 y FAS-CAS fueron los más efectivos para crecimiento de UFCs en las muestras de sedimento y biopelícula, mientras que para la muestra de *F. vesiculosus* el AM y FAS-POL fueron igualmente efectivos a 22°C, alcanzándose 3 veces más UFCs que en los otros medios de cultivo (Figura 10).

Se obtuvieron un total de 166 aislados para los tres hábitats de medio marino seleccionados. 85 cepas procedieron de sedimento de tanque de cultivo de peces, 48 de biopelícula y 33 de *F. vesiculosus* (Tabla 6). Aproximadamente la mitad de los aislados seleccionados para la búsqueda de actividad QQ se obtuvieron en los medios más ricos: TSA-I y AM, debido a la mayor variabilidad de colonias observada. Para el caso de la muestra de sedimento, más del 70% de los aislados procedieron de los medios de cultivo más ricos mientras que en la muestra de biopelícula la mayoría de las cepas se aislaron de los medios FAS (Tabla 6). El número de cepas aisladas para las dos temperaturas utilizadas fue similar: 91 de placas incubadas a 22°C y 75 cepas de placas a 15°C.

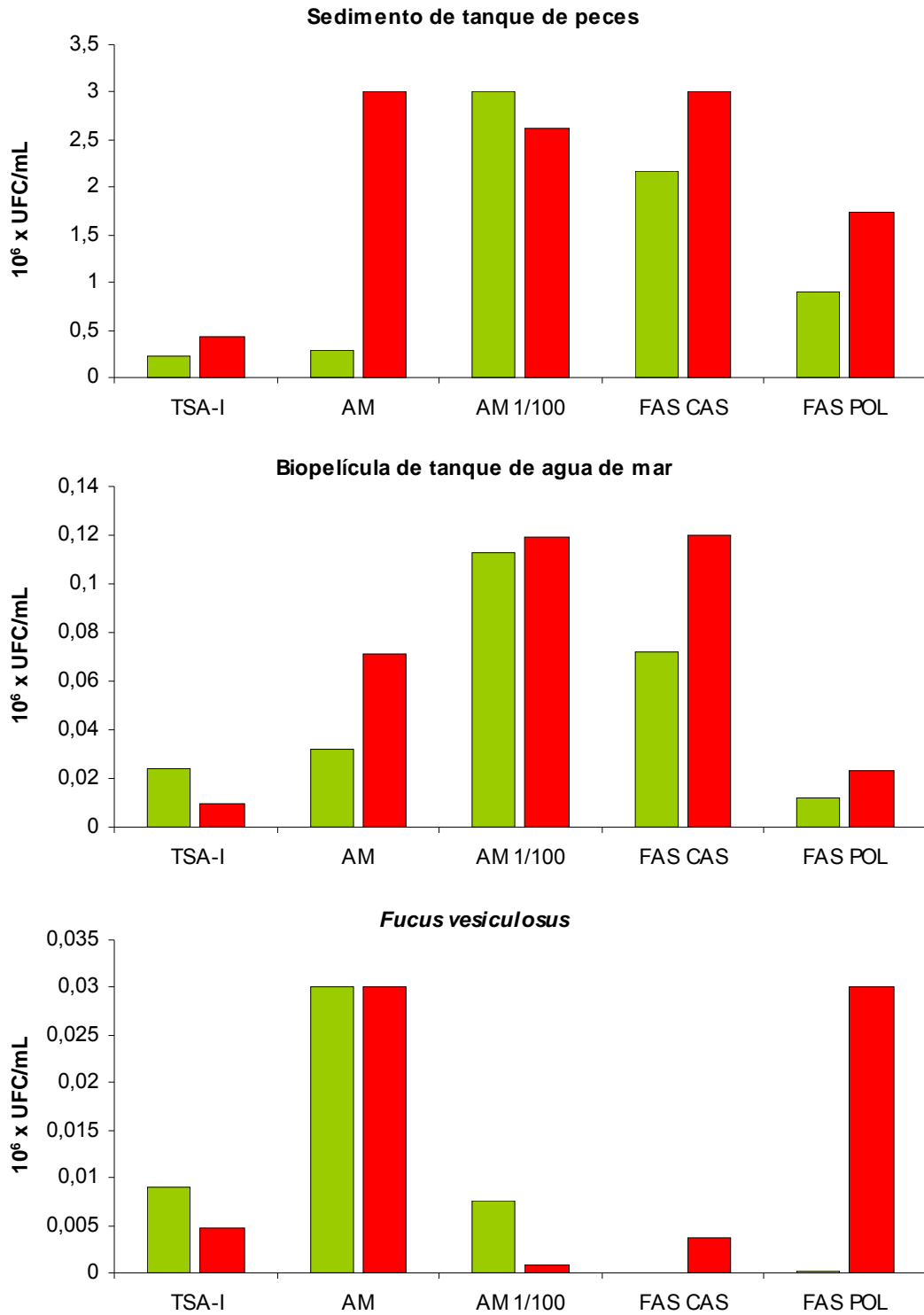


Figura 10. Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL obtenidas para cada muestra y medio de cultivo a 15°C (barras verdes) y 22°C (barras rojas).

Muestra	Nº de cepas aisladas	Cepas QQ	% QQ
Sedimento	85	8	9,4
TSA-I	30	2	6,7
AM	31	4	12,9
AM 1/100	9	1	11,1
FAS-CAS	7	0	0,0
FAS-POL	8	1	12,5
Biopelícula	48	3	6,3
TSA-I	9	0	0,0
AM	5	0	0,0
AM 1/100	7	0	0,0
FAS-CAS	17	2	11,8
FAS-POL	10	1	10,0
<i>Fucus vesiculosus</i>	33	13	39,4
TSA-I	9	3	33,3
AM	9	2	22,2
AM 1/100	5	3	60,0
FAS-CAS	7	3	42,9
FAS-POL	3	2	66,7
Todas la muestras	166	24	14,4
TSA-I	48	5	10,4
AM	45	6	13,3
AM 1/100	21	4	19,0
FAS-CAS	31	5	16,1
FAS-POL	21	4	19,0

Tabla 6. Tabla resumen de las cepas marinas aisladas de las diferentes muestras y medios de cultivo. Se muestra el número y porcentaje de aislamiento de cepas con actividad QQ contra C6-HSL obtenidos usando el ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026.

1.1.2 Detección de actividad quorum quenching

Inicialmente la búsqueda de actividad QQ se llevó a cabo utilizando un ensayo en medio líquido en placas microtiter con dos biosensores de *E. coli* JM109 basados en genes chivatos *lux*. En este ensayo se realizó por separado la degradación de C4 y C12-HSL y la actividad de las AHL se midió tras 24 horas de exposición a las cepas marinas mediante cuantificación de la bioluminiscencia de los biosensores. Esta metodología de búsqueda dio como resultado un 31% de cepas activas (51 de 166 aislados) contra una o ambas AHLs: 23 aislados activos frente a C12-HSL, 16 frente a C4-HSL y 12 frente a ambas señales. Un ejemplo de cuantificación de bioluminiscencia mediante luminómetro se muestra en la Figura 11, incluyendo una de las cepas con actividad QQ confirmada (cepa 20J). Sin embargo, el análisis HPLC-MS de las cepas que presentaban doble actividad (degradación de AHLs cortas y largas) confirmó únicamente una de las

cepas, la cepa 20J, con actividad enzimática QQ sobre las AHLs presentes en el medio de cultivo.

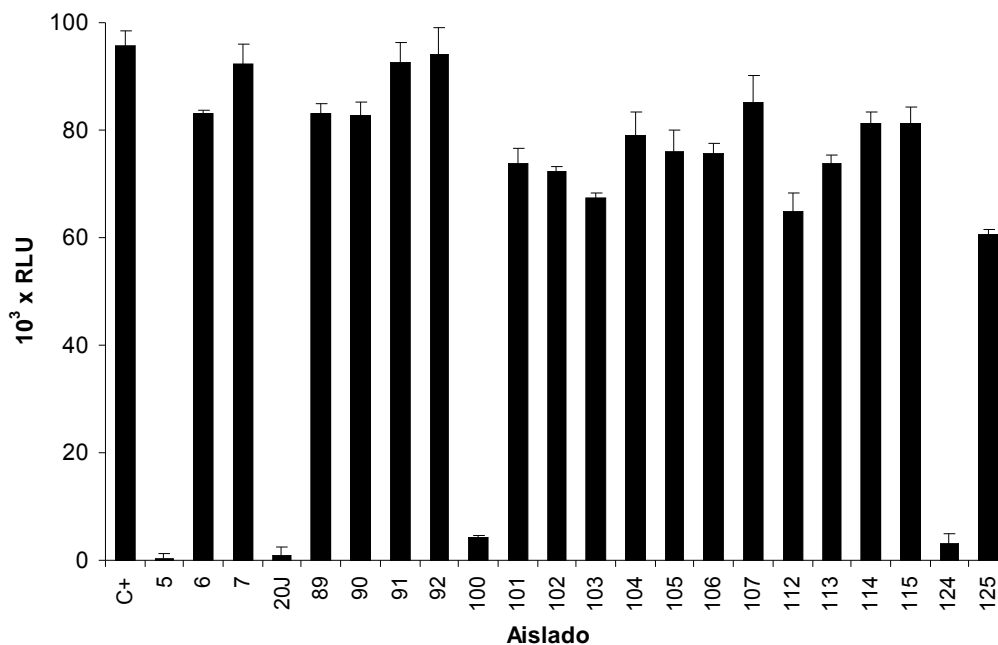


Figura 11. Diagrama de barras obtenido por cuantificación de bioluminiscencia de *E. coli* JM109 pSB1075, en el ensayo de degradación de C12-HSL (50 μ M) en medio líquido para la detección de cepas marinas con actividad QQ. Las cepas 5, 20J, 100 y 124 parecen degradar o antagonizar la acción de C12-HSL tras 24 horas ya que inhiben la producción de luz del biosensor, pero las cepas 100 y 124 resultaron falsos positivos en el ensayo sólido con *C. violaceum* CV026. Los valores de luminiscencia son la media de tres pocillos de placa microtiter. Control (C+): C12-HSL 50 μ M en CM. RLU: unidades relativas de luz.

La elevada cantidad de cepas negativas para degradación de AHLs en el análisis con HPLC-MS de las seleccionadas en el bioensayo en medio líquido, motivó el desarrollo de un nuevo ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 para confirmar la posible producción de antagonistas. Este nuevo ensayo nos permitió diferenciar de manera directa las cepas con inhibición de crecimiento sobre biosensor de las cepas con actividad QQ real. Así, en todas las cepas positivas con doble actividad obtenidas en el ensayo en medio líquido que no pudieron ser confirmadas por HPLC-MS se observó la producción de un halo de inhibición de crecimiento de *C. violaceum* CV026. Probablemente esta inhibición de crecimiento fue la responsable de la no detección de

bioluminiscencia con los biosensores basados en *lux*. La mayoría de estas cepas procedían de la muestra de *F. vesiculosus* y presentaban un crecimiento en swarming característico (Figura 12). En el ensayo con *C. violaceum* CV026 en medio sólido se identificaron 24 cepas con actividad QQ, lo que representó un 14,5% de las cepas aisladas (Tabla 6). Se confirmaron de este modo 10 cepas con QQ de las identificadas con *E. coli* JM109, siendo 7 activas frente a C4-HSL en el ensayo líquido, y se detectaron 10 nuevas cepas capaces de degradar C6-HSL.

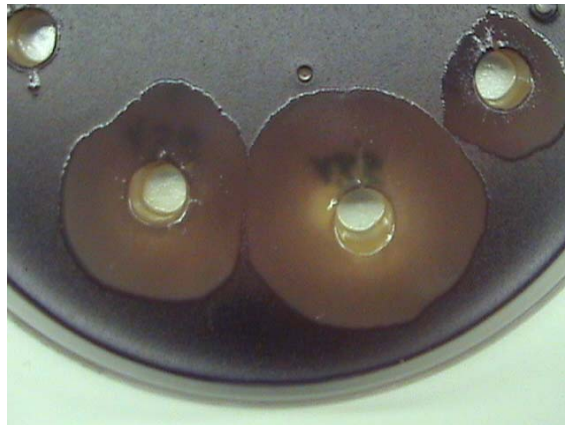


Figura 12. Imagen del crecimiento en swarming e inhibición de crecimiento de varios aislados marinos en ensayo de detección de QQ en medio sólido con *C. violaceum* CV026.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios utilizados para el aislamiento de cepas con actividad QQ (Tabla 6, test Chi cuadrado, $p > 0,05$). Aproximadamente el 50% de las cepas activas se aislaron a 22°C y por tanto el efecto de la temperatura sobre el aislamiento de bacterias con actividad QQ tampoco fue significativo (test exacto de Fisher, $p > 0,05$). Por el contrario se observaron importantes diferencias sobre el aislamiento de cepas con actividad QQ dependiendo de la muestra utilizada (Tabla 6, test Chi cuadrado, $p < 0,05$). Mientras que las cepas aisladas de los tanques presentaban un porcentaje de actividad QQ entre el 6 y 9% (Tabla 6), casi un 40% de las cepas aisladas de la muestra de *F. vesiculosus* fueron activas frente a C6-HSL (Tabla 6).

Las 24 cepas capaces, aparentemente, de bloquear la actividad C6-HSL se analizaron también para interceptación de C10-HSL con el mismo ensayo en medio sólido usando el biosensor *C. violaceum* VIR07. De éstas, solamente 15 fueron capaces

de interceptar completamente en 24 horas la actividad C6 y C10-HSL (Figura 13) y por tanto estas cepas fueron seleccionadas para caracterización de su actividad QQ e identificación. De estos aislados, 7 procedieron de muestra de *F. vesiculosus*, 7 de sedimento de tanque y 1 de biopelícula de tanque de agua de mar (Tabla 7).

Paralelamente se realizó un ensayo con *C. violaceum* CV026 para detectar la producción de AHLs por los aislados que nos permitiese estimar la prevalencia de bacterias productoras de AHLs en las muestras y permitir detectar posibles interferencias en ensayos de QQ. Sin embargo no se detectó producción de AHLs en este ensayo con ninguno de los aislados marinos ensayados debido a la relativa alta concentración de AHLs necesaria para ser detectados por los biosensores de *C. violaceum*.

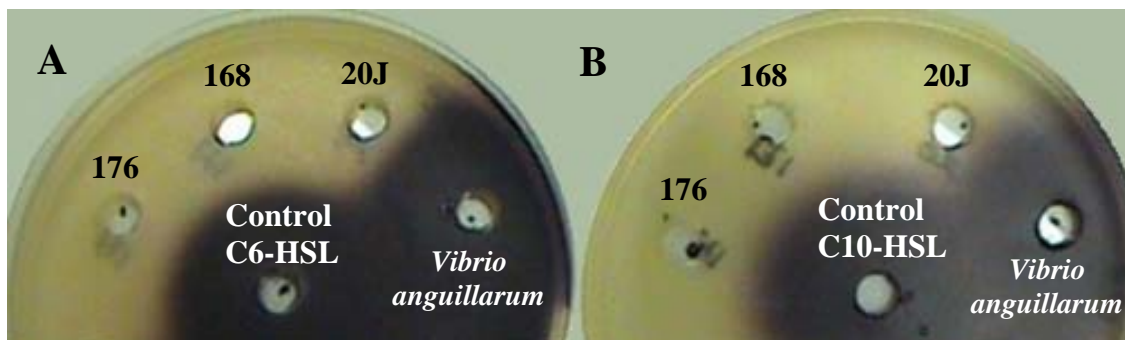


Figura 13. Foto de un ensayo en medio sólido para la detección de actividades QQ en cepas marinas con los biosensores de AHLs *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). Las cepas marinas capaces de degradar o antagonizar la acción de C6 y C10-HSL (10 μ M) tras 24 horas impiden la formación del halo de violaceína en los biosensores. El pocillo central se corresponde con el control de AHL (10 μ M). También se establecieron controles negativos para QQ con la bacteria *Vibrio anguillarum*.

Además, en estas cepas se comprobó la capacidad de degradación de la AHL sustituida OC12-HSL utilizando un ensayo en placa con el biosensor *E. coli* JM109 pSB1075 (Figura 14). Diez de las 15 cepas fueron capaces de suprimir completamente la AHL sustituida detectable por el biosensor (Tabla 7), indicando que estos aislados pueden inactivar un amplio rango de AHLs.

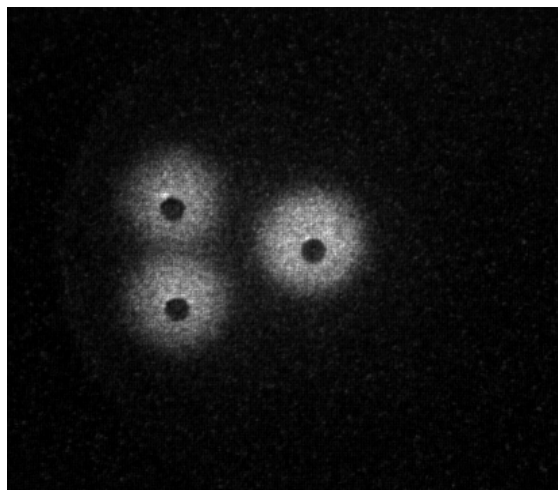


Figura 14. Foto de un ensayo en medio sólido para la detección de actividad QQ sobre OC12-HSL en cepas marinas con el biosensor *E. coli* JM109 pSB1075. Las cepas marinas capaces de degradar o antagonizar la AHL tras 24 horas impiden la producción de luz por el biosensor. El pocillo central se corresponde con el control de AHL (10 μ M), los pocillos a la izquierda se corresponden con aislados negativos para degradación de OC12-HSL (Cepas 30 y 33).

1.1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS

Las 15 cepas capaces de interceptar C6 y C10-HSL en ensayo en placa con medio sólido fueron capaces de reducir significativamente la concentración de C4 y C12-HSL cuantificada por HPLC-MS (Figura 15). El pH final de los cultivos tras 24 horas de ensayo de degradación estuvo, en todos los casos, por debajo de 7,0 y por tanto se pudo descartar una apertura espontánea del anillo HSL de las señales debido a pHs básicos. Este resultado indicó la presencia de actividad enzimática degradadora de AHLs en todas las cepas. El aspecto del halo de violaceína en *C. violaceum* permitía ya adelantar la presencia de actividad QQ de tipo enzimático ya que, con la concentración de AHLs utilizada, la degradación enzimática de señales se mostraría como ausencia o reducción del diámetro del halo violeta alrededor de los pocillos, mientras que un antagonista de AHLs generalmente se muestra como un halo más claro de violaceína rodeado por un segundo halo de violaceína más intenso, como ocurre con la difusión de furanonas de *D. pulchra* (Figura 9).

Resultados y Discusión

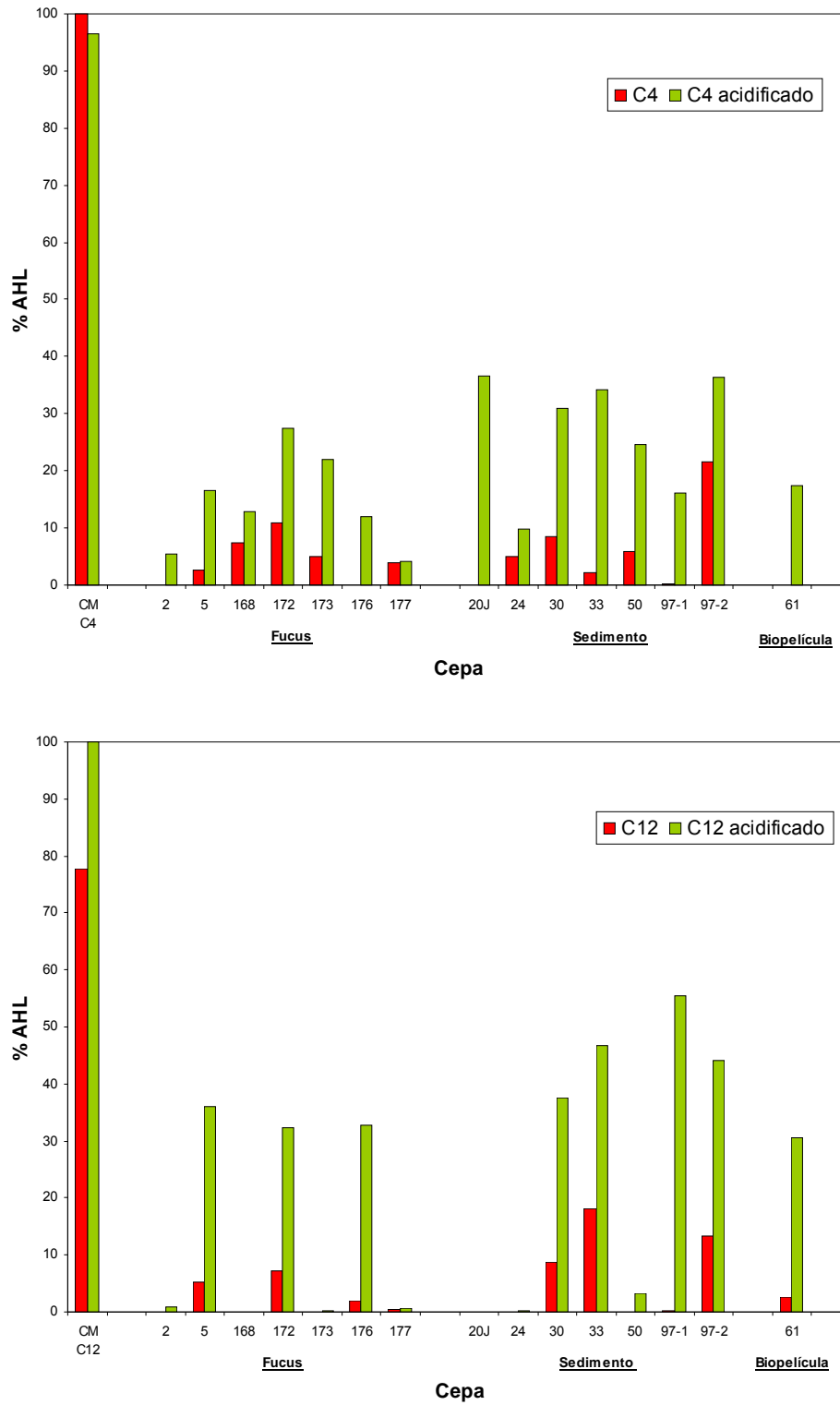


Figura 15. Análisis HPLC-MS de degradación de C4 y C12-HSL (50 μ M) tras 24 horas por las 15 cepas QQ positivas seleccionadas. Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras verdes)

Origen	Cepa	Bacteria cultivada más cercana	16S % ID	Gram	TSA-I	OC12	Posible secuencia
Fucus vesiculosus	2	<i>Hyphomonas</i> sp. DG895	99	-	-	+++	Acilasa y lactonasa
	5	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+	lactonasa
	168	<i>Alteromonas</i> sp. BCw156	99	-	-	+++	acilasa
	172	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
	173	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	100	+	+	+++	lactonasa
	176	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
	177	<i>Phaeobacter</i> sp. NH52F	96	-	-	+++	
Sedimento	20J	<i>Tenacibaculum discolor</i> DSM 18842	99	-	-	+++	
	24	<i>Bacillus circulans</i> cepa X3	98	+	+	+++	lactonasa ⁽¹⁾
	30	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
	33	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539	99	-	-	-	
	50	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MM30	99	+	+	+++	lactonasa
	97-1	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
	97-2	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
Biopelícula	61	<i>Roseovarius aestuarii</i> SMK-122	99	-	-	+++	

Tabla 7. Identificación de las 15 cepas con actividad QQ de amplio espectro en base a las secuencias de sus genes de ARNr 16S. También se muestra la tinción de Gram según método tradicional de las cepas, la capacidad de crecimiento en medio sin sales marinas (TSA-I) y la capacidad de degradar AHL sustituida (OC12-HSL), así como la presencia y tipo de posibles secuencias de enzimas degradadoras de AHL en los genomas secuenciados. (1) Basado en la presencia común de lactonasas en los genomas disponibles del género *Bacillus*.

La mayoría de las cepas degradaron completamente C4 y C12-HSL a pesar de que los bioensayos con las que se seleccionaron originalmente fueron con las señales C6 y C10-HSL. La recuperación de AHL debido a la acidificación del medio de cultivo a

pH 2, que permite la recircularización del anillo HSL causada por actividades lactonasa, fue más frecuente para C4-HSL. Únicamente en las cepas 2, 24, 168 y 177, que degradaron casi completamente las AHLs corta y larga, la acidificación no recuperó la concentración de las señales indicando que la actividad enzimática presente en estos aislados no se debe a una lactonasa. Varias cepas como 20J presentaron un perfil de degradación diferente para AHL corta y larga indicando la posible presencia de más de un tipo de actividad enzimática, mientras que otras como las cepas 5, 30, 33, 97-1, 97-2, 172 y 176 parecen tener lactonasas con amplio espectro de degradación de AHLs, debido a que la concentración de ambas AHLs se recupera parcialmente tras la acidificación del medio de cultivo (Figura 15).

1.1.4 Identificación de aislados

Se obtuvieron las secuencias del gen de ARN ribosómico 16S (Anexo 1) de las 15 cepas seleccionadas y, para su identificación taxonómica, se realizó una búsqueda comparativa mediante BLAST en las secuencias disponibles de ARNr 16S del GenBank. La bacteria más próxima a cada aislado se muestra en la Tabla 7. De los 15 aislados, dos pertenecen a γ -Proteobacteria (33 y 168), seis a α -Proteobacteria (5, 97-1, 176, 2, 61 y 177), cuatro a Firmicutes (24, 30, 97-2 y 172), dos a Actinobacteria (50 y 173) y una a Bacteroidetes (20J).

De las 15 cepas marinas aisladas únicamente tres: la cepa 24 (identificada como *Bacillus circulans* al 98% con el identidad) y las cepas 50 y 173 (*Rhodococcus erythropolis* con un 99 y 100% de identidad respectivamente), pertenecen a géneros en los que aislados del medio terrestre habían sido descritos como capaces de degradar AHLs (Dong et al., 2002; Uroz et al., 2003). Aunque *B. circulans* ha sido aislado estas muestras (Das et al., 2008) la presencia de especies de *Bacillus* no es común en muestras del medio marino (Ivanova et al., 1999). Debido a que el aislado 24 procede de un sedimento de tanque de un circuito cerrado de agua de mar para cultivo de peces en unas instalaciones lejanas al mar (Santiago de Compostela), es posible que su origen sea terrestre.

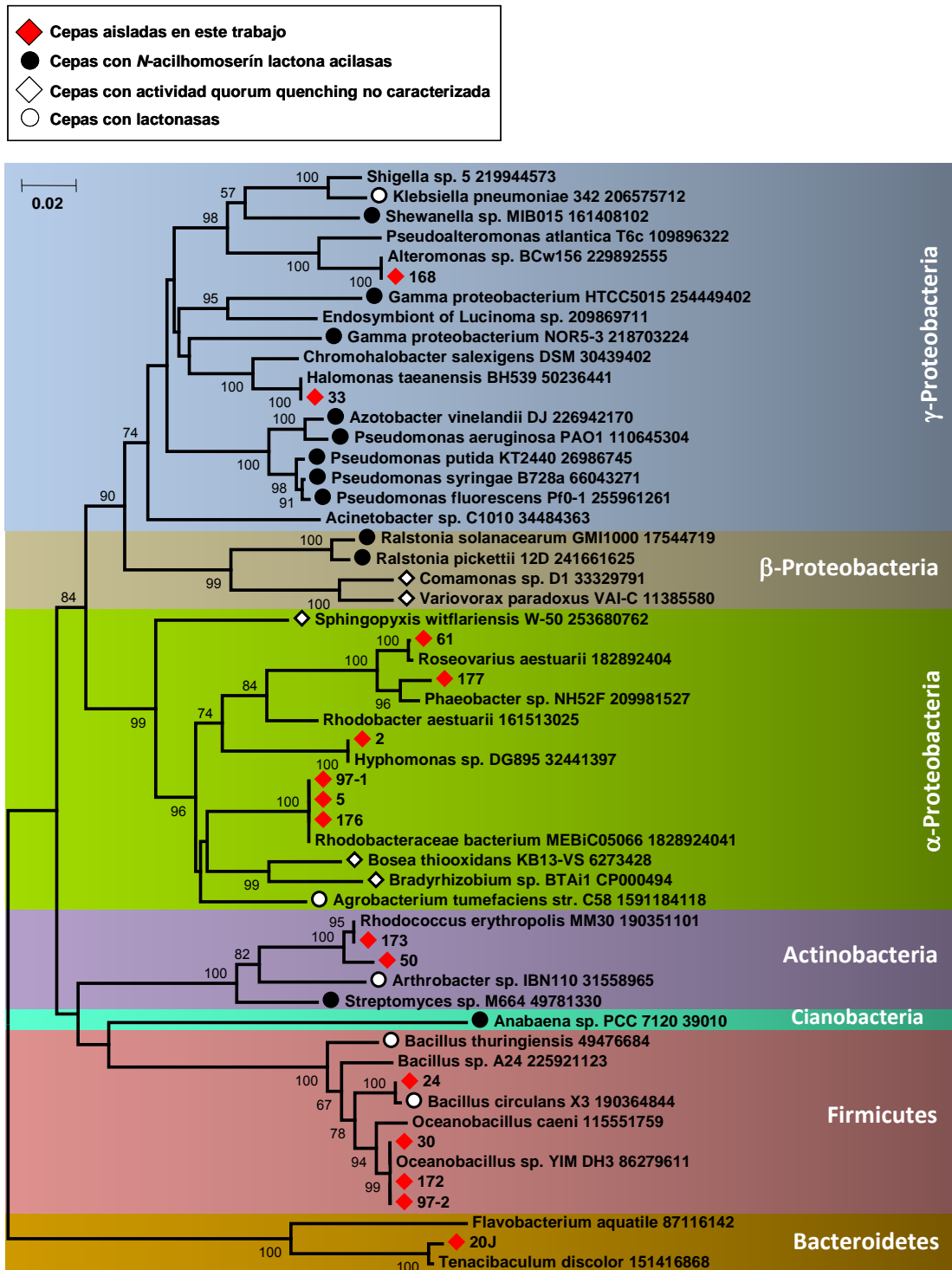


Figura 16. Árbol filogenético construido por el método del vecino más próximo (“neighbour-joining”) mostrando las relaciones taxonómicas basadas en secuencias de genes de ARNr 16S de los 15 aislados seleccionados en este trabajo (en rojo) y especies anteriormente descritas con actividad quorum quenching. El código que sigue a cada taxón se corresponde con el número de acceso a su respectiva secuencia del 16S. Se muestran los porcentajes mayores del 50% de homología en el análisis neighbour-joining. Barra de escala: 0,02 sustituciones por posición nucleotídica.

Dos aislados, obtenidos de diferente muestra, la cepa 50 de sedimento y la cepa 173 de *F. vesiculosus*, fueron identificados como *R. erythropolis* (Tabla 7), indicando que esta especie es un representante común entre las bacterias marinas con actividad QQ. El género *Rhodococcus* está ampliamente distribuido en hábitats acuáticos y terrestres y varias especies son conocidas por su alta capacidad degradadora de compuestos orgánicos complejos (Goodfellow y Maldonado, 2006). Varias especies de este género degradan AHLs, pero hasta la fecha todas son procedentes de muestras de origen terrestre (Uroz et al., 2008).

Todos los aislados con actividad QQ no descrita previamente pertenecen a géneros típicos de ambientes marinos aunque muchos fueron capaces de crecer en TSA-I (NaCl 1%) (Tabla 7). La α -Proteobacteria *Stappia* sp. (cepas 5, 176 y 97-1), un género que incluye varias especies marinas clasificadas anteriormente como pertenecientes al género *Agrobacterium*, y el Firmicute *Oceanobacillus* sp. (cepas 172, 30 y 97-2), un género que incluye muchas especies marinas alcalófilas facultativas, parecen ser abundantes y ubicuos, ya que representantes de ambos géneros pudieron ser aislados varias veces de muestras de muy diferente origen (*F. vesiculosus* y sedimento de tanque).

De entre las cepas aisladas de muestra de *F. vesiculosus*, *Hyphomonas* sp. (cepa 2) pertenece al grupo de los prostecados, bacterias típicamente epibiontes de algas (Poindexter, 2006), mientras que *Alteromonas* sp. (cepa 168) es un género de γ -Proteobacterias marinas que son aisladas con frecuencia de varios ambientes marinos, incluyendo algas (Gauthier y Breittmayer, 1992). Ambas especies fueron incapaces de crecer en TSA-I indicando que se trata de cepas con origen estrictamente marino (Tabla 7). Finalmente, la cepa 177 (Cepa objeto de patente, Anexo 2.4) representa una nueva especie de α -Proteobacteria que está relacionada (ID 96%) con *Phaeobacter* sp., un género de bacterias marinas próximo al grupo de las Roseobacterias (Martens et al., 2006; Figura 16), aunque las secuencias más próximas filogenéticamente a este aislado se corresponden con bacterias no cultivables (Jones et al., 2007). En cuanto a los aislados procedentes de sedimento de tanque de peces, la cepa 20J presentó un 99% de identidad en su secuencia del gen de ARNr 16S con el patógeno de peces *Tenacibaculum discolor*. El género *Tenacibaculum* pertenece al grupo Bacteroidetes,

que constituye uno de los grupos dominantes de bacterias heterótrofas en los ambientes acuáticos e incluye varias especies causantes de la tenacibaculosis/flexibacteriosis o “gliding bacterial disease” en peces. Sorprendentemente, la cepa 20J fue aislada en TSA-I, una característica que la excluiría de la especie *Tenacibaculum discolor* (Piñeiro-Vidal et al., 2008). La cepa 33 se identificó como miembro del género *Halomonas* (ID 99%), un grupo de γ -Proteobacterias generalmente marinas que incluye varias cepas halofílicas moderadas. La única cepa con actividad QQ aislada de biopelícula de tanque de agua de mar (cepa 61) fue identificada como *Roseovarius aestuarii* (ID 99%). El género *Roseovarius* comprende α -Proteobacterias estrictamente marinas (Labrenz et al., 1999). Esta especie pertenece al linaje de Roseobacterias que, se estima, comprende del 20 al 30% de las secuencias de genes ARNr 16S de la zona fótica de los hábitats marinos (Wagner-Dobler y Biebl, 2006).

Las relaciones entre las secuencias de ARNr 16S de los 15 aislados y las de otras cepas con actividad QQ descritas con anterioridad (Carlier et al., 2003; Kang et al., 2004; Uroz et al., 2007) se muestran en el dendrograma de la Figura 16. Aunque *Delftia* sp. A317 y *Ochrobactrum* sp. A44 presentan actividad QQ (Jafra et al., 2006), no fueron incluidas en el análisis debido al escaso tamaño de la secuencia de ARNr 16S disponible en las bases de datos.

1.1.5 Genes de quorum quenching en colecciones de metagenomas marinos

Aunque la presencia de lactonasas ya ha sido descrita en colecciones de metagenomas de muestras de suelo procedentes de una planicie del río Tanana en EEUU y de una tierra de pastos en Francia (Williamson et al., 2005; Riaz et al., 2008; Schipper et al., 2009), no se han realizado búsquedas de genes QQ en otros hábitats. Para determinar si este tipo de enzimas (lactonasas y acilasas) son tan comunes en el medio marino como la actividad QQ encontrada en bacterias marinas cultivables aisladas en este estudio, se analizaron las secuencias de colecciones de metagenomas marinos para detectar homólogos de las secuencias de lactonasas y acilasas conocidas.

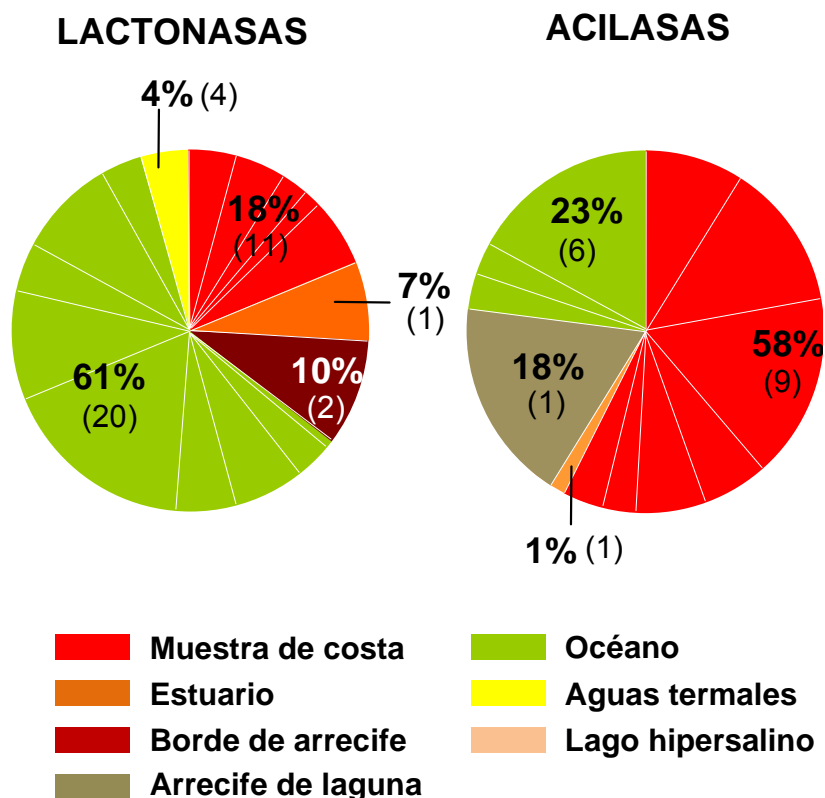


Figura 17. Distribución de las secuencias de metagenomas GOS que presentan homología con lactonasas y acilasas clasificadas por diferentes hábitats. Entre paréntesis se indica el número de secuencias encontradas en cada librería metagenómica. El número de secuencias encontrado se normalizó por el número de megabases secuenciadas en cada hábitat.

A pesar del alto porcentaje de cepas activas obtenido a partir de muestras marinas, el número de secuencias con homología con lactonasas o acilasas encontrado en las colecciones GOS fue muy bajo considerando el tamaño de los metagenomas (equivalente a 4.845 genomas asumiendo que el tamaño medio de un genoma marino es 3,5 Mb). Se obtuvieron únicamente 37 posibles lactonasas y 17 acilasas para un porcentaje de similitud mínimo de un 50%. Sin embargo, utilizando un porcentaje menos restrictivo de similitud de un 30% para el 70% de la secuencia, se obtuvieron 46 lactonasas (36 con del dominio β -lactamasa y 7 de ellas con el dominio PTE) y 297 acilasas (Tabla 8). La mayor abundancia de acilasas encontradas se explica por la mayor variedad de secuencias que presentan estas enzimas, incluso entre bacterias cultivables. La abundancia relativa (normalizada teniendo en cuenta el tamaño de la base de datos, ver materiales y métodos) de estas proteínas se muestra en la Figura 17. Los resultados obtenidos con los metagenomas se confirman al realizar búsquedas de lactonasas y

acilasas en los genomas secuenciados disponibles en las bases de datos. Así, cuando aplicamos la metodología de búsqueda más restrictiva (50/70%) para lactonasas obtenemos 99 especies con secuencias homólogas para estas enzimas, entre las que se incluyen básicamente, bacterias con actividad lactonasa ya conocida pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter* y *Agrobacterium* (Tabla 2; Introducción). Para acilasas con los porcentajes restrictivos 50/70% obtenemos 75 especies bacterianas que también, salvo pocas excepciones, pertenecen a los géneros bacterianos con actividad acilasa ya descrita: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Streptomyces* y *Shewanella* (Tabla 2; Introducción), pero únicamente cuando aplicamos los porcentajes de homología menos restrictivos (30/70%) aparecen los géneros: *Rhodococcus*, *Anabaena* (*Nostoc* sp. PCC7120), *Variovorax*, *Delftia* y *Comamonas*, todos con actividad QQ ya descrita, incluidos géneros descritos en este trabajo cuyos genomas están secuenciados: *Stappia*, *Oceanobacillus*, *Alteromonas* e *Hyphomonas* (Figura 18; Tabla 2). Además, con menor restricción, la cantidad de secuencias de enzimas de QQ en otras bacterias aumenta de manera notable, obteniéndose 175 especies con posible actividad QQ del tipo lactonasa y 275 acilasas, incluyendo eucariotas como la planta *Ricinus comunis*, el protozoo *Giardia intestinalis* y varios hongos como *Aspergillus oryzae*, además de Archeas (Figura 18), posiblemente debido a transferencias horizontales.

La distribución en las diferentes colecciones de metagenomas marinos utilizadas no fue homogénea: un 65% de las secuencias homólogas a lactonasas se encontraron en muestras de océano, mientras que la mayoría de las secuencias similares a las secuencias conocidas de acilasas pertenecieron a muestras costeras (76%). Aunque debe tenerse en cuenta que existe una desviación causada por el uso de agua de mar filtrada en la construcción de metagenomas marinos (filtración a 0,1-0,8 μm), lo que deriva en que los metagenomas contengan principalmente genomas de bacterias de vida libre. Parece haber una clara tendencia a la asociación de actividad acilasa con aguas más ricas en nutrientes, como los medios costeros, respecto a aguas oligotróficas de océano. Por comparación, se realizó una búsqueda similar en otros metagenomas marinos de menor tamaño que los GOS y de suelo de granja, teniendo también en cuenta el tamaño de las colecciones. Así en las bases de datos de menor tamaño obtenidas de columna de agua y zonas afóticas no se encontraron positivos para lactonasas y acilasas. En colecciones de esqueleto de ballena, donde las muestras se tomaron directamente sin

filtración, no se obtuvieron secuencias homólogas para lactonasas y acilasas con el porcentaje de similitud más restrictivo pero, se obtuvieron 6 acilasas y una lactonasa con el porcentaje de similitud situado al 30% para el 70% de la longitud de las secuencias, lo que supondría una frecuencia cinco veces mayor que la obtenida en las colecciones de metagenomas GOS con la misma metodología de búsqueda, teniendo en cuenta el tamaño del metagenoma de esqueleto de ballena. En metagenoma de suelo se encontraron 2 secuencias homólogas a acilasas y una lactonasa con los porcentajes de similitud al 50/70%, mientras que estos valores fueron de 8 acilasas y 5 lactonasas con porcentajes 30/70% (Tabla 8).

Colección	% Homología	Nº Lactonasas	Nº Acilasas
Metagenoma GOS (16,96 Gpb)	50/70	37	17
	30/70	46	297
Metagenoma de esqueleto de ballena (75 Mpb)	50/70	0	0
	30/70	1	6
Metagenoma de suelo de granja (16,7 Gpb)	50/70	1	2
	30/70	5	8

Tabla 8. Secuencias de enzimas de QQ encontradas en varias colecciones de metagenomas según los porcentajes restrictivos de homología seleccionados.

1.2 Discusión

Este estudio indica que el quorum quenching (QQ) es un proceso común entre las bacterias marinas cultivables aisladas de ambientes marinos. El porcentaje de cepas aisladas capaces de interceptar la actividad AHL obtenido en este estudio, 14,4% (Tabla 6), es mucho mayor que los porcentajes obtenidos en otros estudios para muestras de suelo y plantas. En el estudio pionero que permitió la clonación a partir del género *Bacillus* de la primera lactonasa conocida (Dong et al., 2000), únicamente 24 aislados de un total de 500 cepas (4,8%) procedentes de suelo fueron activos frente a AHLs. Los porcentajes de cepas QQ obtenidos de muestras de suelo en estudios posteriores fueron incluso menores, con un poco más del 2% de positivos (Dong et al., 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). Una búsqueda con más de 10.000 clones de una librería de metagenoma de suelo produjo un único clon capaz de degradar AHLs (Riaz et al.,

2008), mientras que una búsqueda similar en 7.000 clones de otro metagenoma de suelo permitió la identificación de 2 clones con actividad lactonasa (Schipper et al., 2009). Sin embargo estos bajos porcentajes de actividad obtenidos podrían no ser representativos del nivel real de actividad QQ presente en el suelo, debido a la dificultad intrínseca para la recuperación de actividad enzimática de librerías de metagenomas basadas en fósidos. Por el contrario, 2 de los 16 aislados analizados procedentes de una biopelícula de un sistema de tratamiento de aguas presentaron actividad QQ (Lin et al., 2003), indicando ya la importancia de este proceso en ambientes acuáticos.

En la metodología de búsqueda de actividad QQ utilizada en este trabajo se evitó el uso de cultivos de enriquecimiento, basados en la capacidad de crecimiento de los aislados en medios con AHLs como única fuente de carbono y nitrógeno, y que han sido usados en la mayoría de estudios precedentes (Leadbetter y Greenberg, 2000; Park et al., 2003; Uroz et al., 2003; Park et al., 2006), lo que nos permite estimar la prevalencia y significación ecológica de los procesos de QQ en las muestras marinas seleccionadas, al menos entre las bacterias cultivables. Uno de los resultados más llamativos es que todos los aislados degradaron activamente las AHLs incluso en medio rico en nutrientes (CM) en el que están disponibles otras fuentes de carbono, indicando que la capacidad de degradar las señales no es meramente una actividad metabólica dirigida a la obtención de energía, sino una actividad enzimática expresada de forma constitutiva, incluso en presencia de otras fuentes de carbono, que probablemente les confiere una ventaja adaptativa sobre los competidores. La selección del método adecuado de búsqueda de actividad QQ fue crucial para detección de un elevado número de cepas activas de forma fiable. Los ensayos basados en los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 resultaron mucho más robustos que los de los biosensores basados en *lux* de *E. coli* JM109 en placa microtiter, permitiendo la identificación de falsos positivos obtenidos para *E. coli* JM109 por inhibición de crecimiento. Por el contrario, el biosensor *C. violaceum* no es adecuado para la detección de producción de AHLs por las mismas cepas, debido a que no se pudo detectar actividad AHL en ninguno de los 166 aislados. Estudios anteriores describen el alto número de bacterias productoras de AHLs en medio marino (Gram et al., 2002; Wagner-Dobler et al., 2005; Cicirelli et al., 2008; Huang et al., 2008) por tanto, la imposibilidad de detección de AHLs en nuestras cepas se debe probablemente a la alta concentración de AHL que *C. violaceum* requiere

para la producción de violaceína, como ya ha sido sugerido en otros estudios (Gram et al., 2002). La no detección de AHLs por los biosensores de *C. violaceum* descarta también que las cepas positivas seleccionadas deriven de la producción de AHLs heterólogas que inhiban la producción de violaceína, apoyando la idoneidad de este ensayo para la detección de bacterias con actividad QQ.

Aunque se esperaba un fuerte efecto del medio de cultivo utilizado sobre el número de cepas con actividad QQ obtenido, tal efecto no pudo ser confirmado. Por el contrario, se observó una fuerte correlación entre el origen de la muestra y el número de positivos. Así, casi un 40% de las cepas aisladas de muestra de *F. vesiculosus* fueron capaces de degradar AHLs. La muestra de *F. vesiculosus* y la de biopelícula de tanque de agua pertenecen a la misma zona de costa y por tanto estuvieron expuestas a la misma agua, por el contrario, el sedimento de tanque de cultivo de peces procedía de un circuito de agua de mar situado tierra adentro y estaba expuesto a mayor carga orgánica, como reflejó el alto valor de UFCs obtenido para esta muestra (Figura 10). Por tanto, parece existir una relación inversa entre la cantidad de carga microbiana y la actividad QQ de una muestra. Se han descrito ya diferencias entre el número de aislados QQ activos en suelo y rizosfera de tabaco (D'Angelo-Picard, 2005), pero en este caso las diferencias se relacionaron con la diversidad taxonómica de los aislados, que fue mayor en la rizosfera, y no al porcentaje de cepas activas obtenidas de estos medios. El altísimo porcentaje de actividad QQ obtenido en la muestra de *F. vesiculosus* apoya la existencia de fuertes interacciones en la interfaz entre eucariotas y procariotas que estimularía actividades biológicas únicas (Gao et al., 2003; Egan et al., 2008).

En contraste con la alta actividad QQ encontrada entre las cepas cultivables de medios marinos, la búsqueda en los metagenomas marinos disponibles reveló una sorprendente baja abundancia de secuencias homólogas a las acilasas y lactonasas conocidas cuando se aplicaron los porcentajes de homología más restrictivos (50/70%) (Figura 17). De modo similar, solamente se pudieron identificar 20 homólogos de *luxI* y 31 de *luxR* (familia de genes codificadores de la sintetasa y receptor de AHLs) en el proteoma predicho a partir de las secuencias de metagenoma GOS (Case et al., 2008), lo que implicaría una baja frecuencia de genes relacionados con la producción y recepción de señales AHL en el hábitat marino. En este trabajo se repitió esta búsqueda aplicando la misma metodología que para genes de QQ y el resultado reveló un número

ligeramente superior de secuencias (42) con un porcentaje mayor o igual a un 50% de similitud con las secuencias de sintetasas de AHLs. Debido a que la producción de AHL es frecuente en bacterias marinas cultivables (Gram et al., 2002; Wagner-Dobler et al., 2005; Huang et al., 2008; Mohamed et al., 2008) y especialmente en biopelículas y nieve marina (Gram et al., 2002), se pueden proponer varias hipótesis para explicar la diferencia entre las actividades QS y QQ en los aislados marinos y la baja frecuencia obtenida en genes de metagenomas marinos.

La metodología utilizada para la construcción de librerías metagenómicas usa principalmente agua de mar filtrada y de este modo excluye la materia particulada a la que se asocian numerosas bacterias. La asociación de los procesos de QS y QQ a comunidades bacterianas asociadas a materia particulada, excluida de los metagenomas, explicaría la baja frecuencia de genes de QS y QQ observada en éstos. Esta hipótesis estaría apoyada por los estudios del análisis de tasas de degradación de AHLs en agua de mar, puesto que estos trabajos han concluido que es altamente improbable que los procesos de QS mediados por AHLs funcionen en las comunidades de mar abierto debido a la mayor tasa de degradación de AHLs observada en el agua de mar natural respecto al agua de mar artificial, y esta diferencia sería ocasionada probablemente por la presencia de enzimas de QQ (Hmelo y Van Mooy, 2009). Esto es consistente con la baja frecuencia de genes de QS y QQ en los metagenomas marinos basados en genomas de bacterias de vida libre. Además, la concentración de los fenómenos de QS y QQ en la materia particulada y microcosmos densos se complementaría con la hipótesis de “difusión sensing/efficiency sensing” (Redfield, 2002; Boyer y Wisniewski-Dyé, 2009), que explica la producción de señales AHL como un medio que las bacterias poseen para percibir el grado de difusión y mezcla de metabolitos en el medio que las rodea, lo que les permitiría determinar los beneficios de secretar moléculas que implican mayor gasto energético. De este modo evitarían un despilfarro de recursos, por ejemplo, produciendo y liberando enzimas extracelulares como proteasas, factores de virulencia o formación de biopelículas, si el medio que las rodea las diluyera inmediatamente. Además, la señalización química opera en distancias cortas, así Gantner et al. (2006) usando un biosensor de *Pseudomonas putida* en superficie de plantas demostraron que algunas señales podían viajar distancias de hasta 78 μm y todavía presentar actividad autoinductora, aunque la mayoría de la señalización ocurre en distancias menores de 10

μm , lo que se ha denominado “distancia de llamada”. Por tanto, la difusión molecular a largas distancias, como la esperada en comunidades bacterianas marinas de vida libre, llevaría mucho tiempo y supondría mucho gasto energético.

En el caso de que las actividades QQ estuvieran generalmente asociadas a materia particulada y por tanto a superficies en el medio marino, sería de esperar una mayor frecuencia de secuencias de genes QQ en las colecciones metagenómicas procedentes de biomasa de esqueletos de ballenas (75 Mpb, Tringe et al., 2005), que no presentan desviaciones por filtración. Aunque no se encontraron posibles secuencias de genes QQ cuando se aplicaron las condiciones más restrictivas, la frecuencia de secuencias de QQ obtenidas en los esqueletos de ballena fueron significativamente mayores que la obtenida para colecciones GOS cuando se aplicó el criterio menos estricto, lo que apoyaría la asociación entre la materia particulada y los procesos de QS y QQ. De todas formas, cualquier comparación entre los resultados de búsqueda en las colecciones metagenómicas GOS y de esqueleto de ballena debe tomarse con precaución debido a la diferencia de tamaños de secuencia disponible en cada una de ellas.

Otra hipótesis que explicaría la discrepancia en la relevancia de los sistemas de QS y QQ en las bacterias marinas cultivables y las bases de datos de metagenomas marinos es el número limitado de secuencias de las que disponemos para enzimas productoras y degradadoras de AHLs. La mayoría de las sintetasas de AHL que han sido identificadas son homólogos de LuxI pertenecientes a α -, β - y γ -Proteobacteria (Williams et al., 2007). La amplia variedad taxonómica de Proteobacterias marinas productoras de AHLs junto con el reciente descubrimiento de producción de AHLs por aislados marinos de Bacteroidetes (Huang et al., 2008; Romero et al., 2010, Anexo 2.2), podría estar indicando la existencia de una mayor diversidad molecular de sintetasas y receptores de AHLs cuya presencia no sería revelada por el uso de las secuencias de *luxI* y *luxR* en las colecciones de metagenomas. El mismo problema sería aplicable a las secuencias de QQ. Así, recientemente se ha clonado una nueva clase de lactonasa de *R. erythropolis* (Uroz et al., 2008), que no presenta homología con la familia de lactonasas bien caracterizadas que comparten un dominio de unión a Zn (HXDH~H~D) y están representadas por AiiA de *Bacillus* sp. (Dong et al., 2000). También se han identificado dos nuevas lactonasas en un estudio de metagenoma de suelo (Schipper et al., 2009) y el

presente trabajo ha permitido la identificación de bacterias con actividad QQ pertenecientes a 8 nuevos géneros en los que esta actividad no había sido descrita con anterioridad, incluyendo una nueva especie de α -Proteobacteria (cepa 177) y un miembro de Bacteroidetes (cepa 20J), lo que seguramente ampliará el número de secuencias disponibles para estas enzimas. La baja homología de las secuencias de enzimas de QQ hace necesario reducir los porcentajes de similitud en las búsquedas en colecciones de metagenomas y genomas, lo que resulta en un importante incremento en la cantidad de secuencias con posible actividad acilasa o lactonasa (Figura 18) disminuyendo la discrepancia de resultados obtenidos con la actividad de las bacterias cultivables.

Otro resultado significativo derivado del análisis de metagenomas marinos es la clara divergencia encontrada entre la distribución espacial de lactonasas y acilasas (Figura 17). Las lactonasas presentan homología con la familia de β -lactamasas pero parecen ser enzimas altamente específicas sin o con baja actividad sobre otras moléculas (Dong et al., 2007). La única excepción la representa la lactonasa BlcC de *Agrobacterium tumefaciens*, cuyo gen forma parte del operón *blcABC*, que presenta actividad sobre γ -butirolactona (GBL) y de hecho le confiere a la bacteria capacidad de crecimiento con GBL como única fuente de carbono (Carlier et al., 2004; Khan y Farrand, 2008). Por otro lado, las acilasas presentan homología con acilasas de cefalosporinas, hidrolasas N-terminales (Ntm) (Dong et al., 2007) y en algunos casos son capaces de catalizar la hidrólisis de Penicilina G como la acilasa AhIM de *Streptomyces* sp. (Park et al., 2005). Debido a estas diferencias de especificidad entre los dos tipos procariotas de enzimas degradadoras de AHLs descritos hasta la actualidad, se puede hipotetizar con que la mayor abundancia de las acilasas, degradadoras de AHLs en las muestras de metagenomas costeros, es el reflejo de un ambiente más rico y complejo en el que las acilasas podría actuar como bloqueadores de QS mediado por AHLs, así como con otras funciones como defensa contra la producción de antibióticos por competidores.

A parte del mayor porcentaje de aislados con actividad QQ, la diversidad taxonómica de bacterias degradadoras de AHL obtenidas en este trabajo es mucho mayor que la encontrada en muestras de suelo y asociadas a plantas. Se aislaron miembros de 10 géneros diferentes pertenecientes a α -, γ -Proteobacteria,

Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Figura 16) incluida la identificación de una nueva especie relacionada con *Phaeobacter* (cepa 177). Casi todos los aislados marinos activos pertenecen a géneros comúnmente o exclusivamente marinos, excluyendo un posible origen terrestre de las cepas, a pesar del carácter costero de las muestras. Únicamente tres de los aislados pertenecen a géneros (*Bacillus* y *Rhodococcus*) en los que habían sido descrito previamente representantes terrestres con actividad QQ (Dong et al., 2002; Uroz et al., 2003). En contraste con nuestros resultados, en la búsqueda de QQ realizada en 800 cepas procedentes de suelo todos los aislados activos caracterizados pertenecieron al género *Bacillus* (Dong et al., 2002). En otro estudio con diferentes cepas de *Bacillus* sp. y α -Proteobacterias procedentes de muestra de rizosfera de tabaco, únicamente se obtuvieron cepas degradadoras para especies de *Bacillus* (D'Angelo-Picard et al., 2005), indicando una menor variedad de los representantes con actividad QQ entre las bacterias de suelo, o al menos entre aquellas cultivables.

Aunque los resultados de los bioensayos excluían a priori la posibilidad de que las cepas seleccionadas produjeran AHLs o antagonistas que pudieran bloquear los receptores para AHL del biosensor, la actividad enzimática de las 15 cepas seleccionadas se confirmó mediante metodología HPLC-MS (Figura 15). Los resultados de HPLC-MS demostraron que los 15 aislados seleccionados degradaron activamente tanto C4-HSL como C12-HSL. La acidificación de los medios de cultivo tras el ensayo de degradación permitió la identificación de posibles actividades lactonasa en las cepas, ya que el anillo lactona puede ser recircularizado a pHs bajos (Yates et al., 2002).

La actividad lactonasa parece estar muy extendida en el género *Bacillus* (Dong et al., 2002), sin embargo la acidificación de los medios tras degradación de AHLs en nuestro aislado de *B. circulans* no recuperó la actividad C12-HSL y sólo un poco de C4-HSL (Figura 15) indicando un tipo de actividad enzimática diferente de la lactonasa descrita hasta ahora para este género. Será necesario confirmar si una posible actividad oxidasa sobre AHLs como la descrita para *B. megaterium* (Chowdhary et al., 2007; Cirou et al., 2009) es la responsable de la capacidad QQ de *B. circulans* cepa 24.

R. erythropolis W2 es una cepa particular pues se ha demostrado que es capaz de inactivar un amplio rango de AHLs usando tres mecanismos enzimáticos diferentes: una lactonasa, una acilasa y una oxidoreductasa que reduce las oxo-AHLs a sus equivalentes hidroxilados (Park et al., 2006; Uroz et al., 2008). Esta combinación única

no pudo ser encontrada en otras cepas terrestres de *R. erythropolis*, en los que únicamente se ha descubierto actividad lactonasa sobre las AHLs (Uroz et al., 2008). Esta importante diversidad en cuanto actividad enzimática en el nivel infraespecie ya había sido descrita para cepas de *R. erythropolis* procedentes de regiones geográficas muy alejadas (Brandão et al., 2003). Aunque es necesario realizar estudios más detallados de las actividades enzimáticas presentes en nuestros aislados marinos de *R. erythropolis*, los análisis por HPLC-MS de degradación de la señal C12-HSL demuestran que el pico de concentración de AHL no se recupera tras acidificación del medio de cultivo y por tanto una actividad enzimática diferente de la de lactonólisis debería estar presente en ambos aislados. Por el contrario, la señal C4-HSL pudo recuperarse parcialmente tras el tratamiento de acidificación (Figura 15), y por tanto se propone la presencia de un complejo sistema enzimático para la degradación activa de AHLs en nuestros aislados marinos, similar al descrito para *R. erythropolis* W2 (Uroz et al., 2008). Este sistema merecerá mayor caracterización pues los dos aislados marinos de *R. erythropolis* obtenidos en este trabajo también inactivan la AHL oxo- sustituida OC12-HSL (Tabla 7).

Uno de los aislados procedentes de sedimento de tanque de cultivo de peces, la cepa 33 identificada como *Halomonas* sp. (99%) y el único aislado activo obtenido de la biopelícula de tanque de agua de mar, identificado como *Roseovarius aestuarii* (99%) pertenecen a géneros que habían sido descritos como productores de señales AHL previamente (Llamas et al., 2005, Wagner-Dobler et al., 2005). *R. aestuarii* pertenece al linaje marino de las roseobacterias, que ha sido propuesto como el más numeroso de entre las bacterias productoras de AHL en el hábitat marino, al menos dentro de los grupos bacterianos cultivables (Cicirelli et al., 2008). La producción de AHLs también ha sido descrita para ciertas cepas productoras de polisacáridos del género *Halomonas* (Llamas et al., 2005), característica que podría estar relacionada con su capacidad para promover o inhibir el asentamiento larval en organismos marinos como poliquetos y briozoos (Holmstrom y Kjelleberg, 2000). Por tanto, la presencia de un amplio espectro de actividad degradadora de señales AHL en estas especies podría representar un mecanismo de automodulación de los niveles de señal, como ya ha sido descrito para *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang et al., 2002), o también como sistema de interferencia con las señales de posibles competidores (Park et al., 2008). Las posibles

diferencias en cuanto a producción de señales AHL y su degradación en estos géneros, podría constituir una buena herramienta experimental para el estudio de la importancia de las AHLs en la formación de biopelículas y procesos de biofouling en el medio marino (Dobretsov et al., 2009).

La búsqueda de genes de QQ en los genomas bacterianos secuenciados disponibles en las bases de datos y con la metodología menos restrictiva (30/70%), reveló la presencia de secuencias homólogas en varias de las especies con actividad QQ identificadas en este trabajo (Tabla 7; Figura 18). En algunos casos, como en las cepas de *Stappia* sp., que presentaron una clara actividad lactonasa, la secuencia obtenida de los genomas del género secuenciados coincidió con los resultados preliminares del análisis por HPLC-MS. Por el contrario, en el caso de *Oceanobacillus* spp., los análisis por HPLC-MS indicaron la presencia de actividad tipo lactonasa, mientras que en el genoma sólo se detectó una secuencia homóloga a acilasas conocidas. La clonación de las enzimas responsables de la actividad QQ en estos nuevos aislados extenderá muy probablemente nuestro conocimiento sobre la variabilidad y modos de acción de estas enzimas y permitirá una interpretación ecológica más completa de los procesos de QQ derivada de búsquedas más precisas en metagenomas. Además, una caracterización profunda de estos aislados y de sus actividades podría conducir al desarrollo de herramientas biotecnológicas para el tratamiento y prevención de infecciones en las que intervienen procesos de QS mediados por AHLs, especialmente en el campo de la acuicultura (Defoirdt et al., 2007).

El alto porcentaje de cepas con actividad QQ aisladas en el presente trabajo parece indicar que el QQ es una estrategia comúnmente adoptada por las bacterias marinas cultivables con el fin de obtener ventajas competitivas, al menos en medios marinos costeros ricos en nutrientes. Esta actividad es especialmente importante para las bacterias aisladas de muestra de *F. vesiculosus*, indicando la existencia de fuertes interacciones bacterianas en la superficie de las algas. La llamativa diferencia encontrada para los porcentajes de cepas con QQ entre las bacterias cultivables y la baja frecuencia de genes de QQ en las secuencias de metagenomas marinos merece estudios en más profundidad para determinar si existen verdaderas diferencias entre la prevalencia de estas actividades en los hábitats marinos costeros y oceánicos o, por el

contrario, se derivan de las metodologías empleadas en la obtención de las secuencias de metagenomas.

Capítulo 2. Quorum quenching en agua de mar de estuario y mar abierto

2.1 Resultados

2.1.1 Aislamiento bacteriano

Con el objetivo de determinar si las discrepancias encontradas entre el aislamiento de cepas con actividad QQ en comunidades microbianas densas de origen marino y la frecuencia de genes de QQ en metagenomas marinos (Capítulo 1) reflejaban diferencias reales entre ambos hábitats, se repitió la búsqueda de aislados con capacidad de interferir con comunicación mediada por AHLs en muestras marinas no asociadas a superficies y con menor carga orgánica consistentes en agua de estuario obtenida en la misma localización que las muestras de *Fucus vesiculosus* y biopelícula de tanque reservorio de agua de mar (Ría de Arousa, Capítulo 1) y mar abierto a 0 y 10 metros de profundidad. En estas nuevas muestras el número de UFCs obtenido fue entre dos y tres órdenes de magnitud inferior a las obtenidas para muestras de comunidades microbianas marinas densas (Figuras 10 y 19). La muestra con mayor población bacteriana fue la de estuario, alcanzando 4×10^4 UFCs/mL, un orden de magnitud superior a las muestras de alta mar (Figura 19). En aguas de alta mar la cantidad de UFCs obtenida fue similar para ambas profundidades, y no se encontraron diferencias entre los distintos medios y temperaturas utilizados, alcanzándose valores máximos con medios de cultivo más oligotrofos como AM 1/100 (Figura 19), mientras que en agua de estuario existió más variabilidad entre medios de cultivo, al igual que ocurría en las muestras de comunidades microbianas densas de origen marino (Figuras 10 y 19). El medio más efectivo para aislamiento de bacterias cultivables en agua de estuario fue el AM (Figura 19).

Se seleccionaron un total de 132 aislados en base a morfología y coloración de las colonias para la muestra de agua de mar de estuario y 166 para cada una de las muestras de alta mar (Tabla 9).

Resultados y Discusión

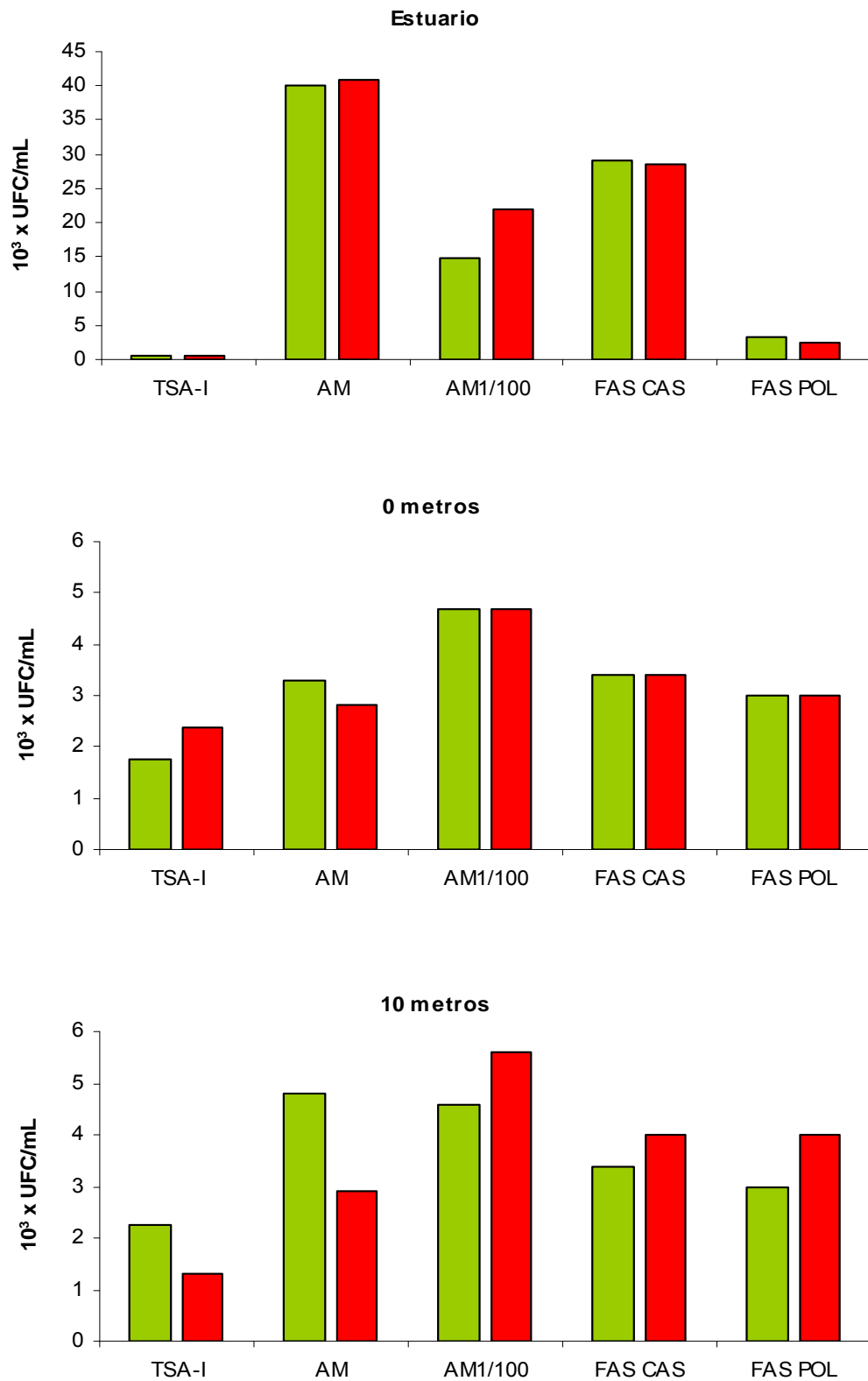


Figura 19. Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL obtenidas para las distintas muestras de agua con cada medio de cultivo a 15°C (barras verdes) y 22°C (barras rojas).

Aproximadamente la mitad de los aislados de los tres tipos de muestra (239 cepas) procedían de los medios más ricos en nutrientes: TSA-I y AM. El número de cepas aisladas para las dos temperaturas utilizadas fue similar: 257 de placas incubadas a 22°C y 207 cepas de placas a 15°C. En los tres tipos de muestra el medio del que se obtuvieron un mayor número de aislados fue AM (Tabla 9).

Muestra	Nº de cepas aisladas	Cepas QQ	% QQ
Estuario	132	3	2,3
TSA-I	15	0	0,0
AM	42	1	2,4
AM 1/100	37	0	0,0
FAS-CAS	16	0	0,0
FAS-POL	22	2	9,1
Alta mar 0 metros	166	46	27,7
TSA-I	31	7	22,6
AM	59	15	25,4
AM 1/100	26	9	34,6
FAS-CAS	34	9	26,5
FAS-POL	16	6	37,5
Alta mar 10 metros	166	36	21,7
TSA-I	32	5	15,6
AM	60	13	21,7
AM 1/100	28	10	35,7
FAS-CAS	36	7	19,4
FAS-POL	10	1	10,0
Todas la muestras	464	85	18,3
TSA-I	78	12	15,4
AM	161	29	18,0
AM 1/100	91	19	20,9
FAS-CAS	86	16	18,6
FAS-POL	48	9	18,7

Tabla 9. Tabla resumen de las cepas marinas aisladas de las diferentes muestras y medios de cultivo. Se muestran el número y porcentaje de aislamiento de cepas con actividad QQ contra C6-HSL obtenidos usando el ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026.

2.1.2 Detección de actividad quorum quenching

El ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 para la detección de interceptación de actividad C6-HSL permitió la identificación de 85 cepas con actividad QQ, lo que en porcentaje representó un 18,3% de las cepas aisladas (Tabla 9). No se observaron diferencias significativas en cuanto al aislamiento de cepas con actividad

QQ para la temperatura y medio de cultivo utilizado (Chi cuadrado $p > 0,05$). El número de positivos para muestras de alta mar fue un orden de magnitud mayor que en la muestra de estuario (Tabla 9), por tanto, se confirman los resultados del capítulo anterior sobre la influencia del origen de la muestra sobre el porcentaje de actividad interceptora de AHLs. Además, el porcentaje total de QQ obtenido (18,3%; Tabla 9), fue ligeramente superior al registrado en las muestras de comunidades bacterianas densas (14,4%; Tabla 6), lo que confirma la abundancia de procesos de bloqueo de QS mediado por AHLs en el medio marino y contrasta fuertemente con los resultados generados por búsqueda de secuencias de enzimas de QQ en colecciones de metagenomas marinos.

Las 85 cepas capaces de bloquear la actividad de C6-HSL se analizaron también para interceptación de C10-HSL con el mismo ensayo en medio sólido usando el biosensor *C. violaceum* VIR07. Todas ellas fueron capaces de bloquear la actividad C10-HSL y por tanto fueron seleccionadas para confirmación de actividad QQ por metodología HPLC-MS.

2.1.3 Confirmación de la actividad degradadora de AHLs por HPLC-MS

Las 85 cepas capaces de degradar C6 y C10-HSL en ensayo en placa con medio sólido fueron capaces de reducir significativamente la concentración de C12-HSL cuantificada por HPLC-MS (Figura 20). Sin embargo, sólo 4 de éstas fueron capaces de degradar casi completamente (más del 85%) la señal C4-HSL; se trató del aislado 138E de estuario y los aislados 131, 139 y 160 de agua de alta mar de 10 metros de profundidad (Figura 21).

Debido a que las 85 cepas habían presentado actividad QQ sobre C6-HSL, se repitió el ensayo en medio sólido con el biosensor *C. violaceum* CV026 para las AHLs C4-HSL y C6-HSL. En este experimento se observó que todas las cepas presentaron, nuevamente, actividad QQ sobre C6-HSL pero únicamente 11 fueron activas frente a C4-HSL (Figura 22).

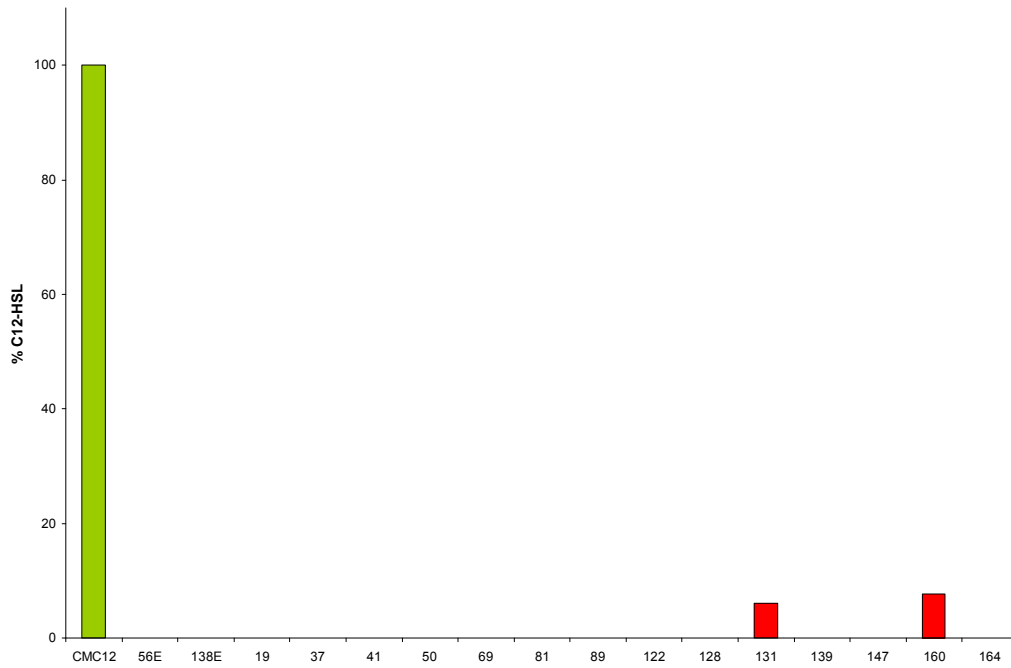


Figura 20. Análisis por HPLC-MS de degradación de C12-HSL (50 μ M) de 16 de las 85 cepas positivas en los bioensayos de *C. violaceum*. En el resto de cepas se obtuvieron unos resultados similares para degradación de C12-HSL. Control: CM + C12 (barra verde).

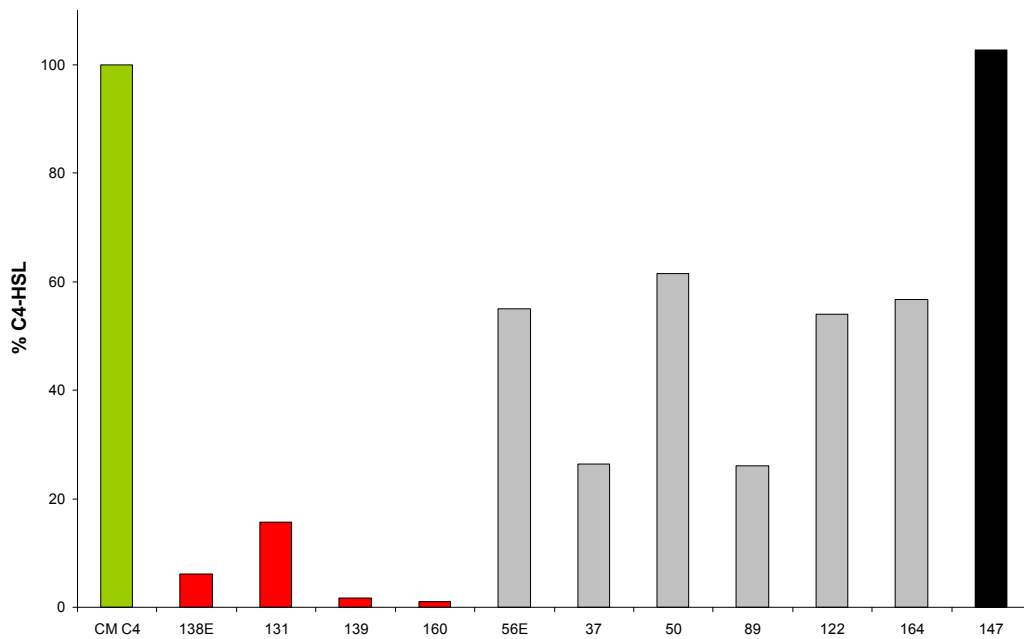


Figura 21. Análisis HPLC-MS de degradación de C4-HSL (50 μ M) respecto a control de CM + C4-HSL (barra verde) para las 11 cepas marinas con actividad QQ sobre C4-HSL en bioensayo con *C. violaceum* CV026.

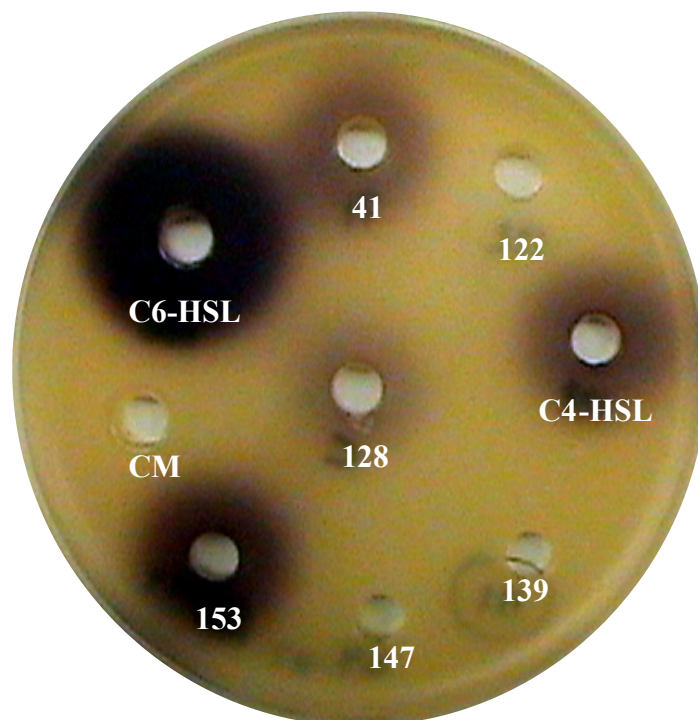


Figura 22. Foto de un ensayo en medio sólido para la detección de actividades QQ sobre C4-HSL (10 μ M) en cepas marinas con el biosensor *C. violaceum* CV026. Como controles se establecieron pocillos de medio sólo (CM) o CM con C4 y C6-HSL (10 μ M).

Entre éstas, se confirmaron como positivas las 4 cepas con actividad degradadora sobre C4-HSL según HPLC-MS (138E, 131, 139 y 160). De las 7 cepas positivas restantes, los aislados 56E; 37; 50; 81; 122 y 164, aunque no degradaban completamente la señal C4-HSL, redujeron entre un 70 y un 50 % la concentración inicial de señal corta en el ensayo de HPLC-MS. La ausencia de halo en pocillos de estas cepas en los que la degradación no es completa se explicaría porque *C. violaceum* CV026 responde más eficientemente a C6-HSL y OC6-HSL que a C4-HSL, por lo que es más sencillo bajar la concentración de C4-HSL por debajo del umbral de detección (Figura 22). En el caso de la cepa 147, aislada de alta mar a 10 metros de profundidad, no se detectó degradación de C4-HSL en ensayo con HPLC-MS (Figura 21) sin embargo presentó actividad QQ sobre esta AHL en ensayo con *C. violaceum* CV026 (Figura 22), al igual que había ocurrido para C6-HSL, lo que podría indicar la presencia de un antagonista de AHLs cortas en esta bacteria.

La acidificación de los medios de cultivo en las 4 cepas con capacidad de degradación de C4, C6, C10 y C12-HSL permitió la identificación de actividad enzimática tipo lactonasa en las cepas 131 y 160 (Figura 23).

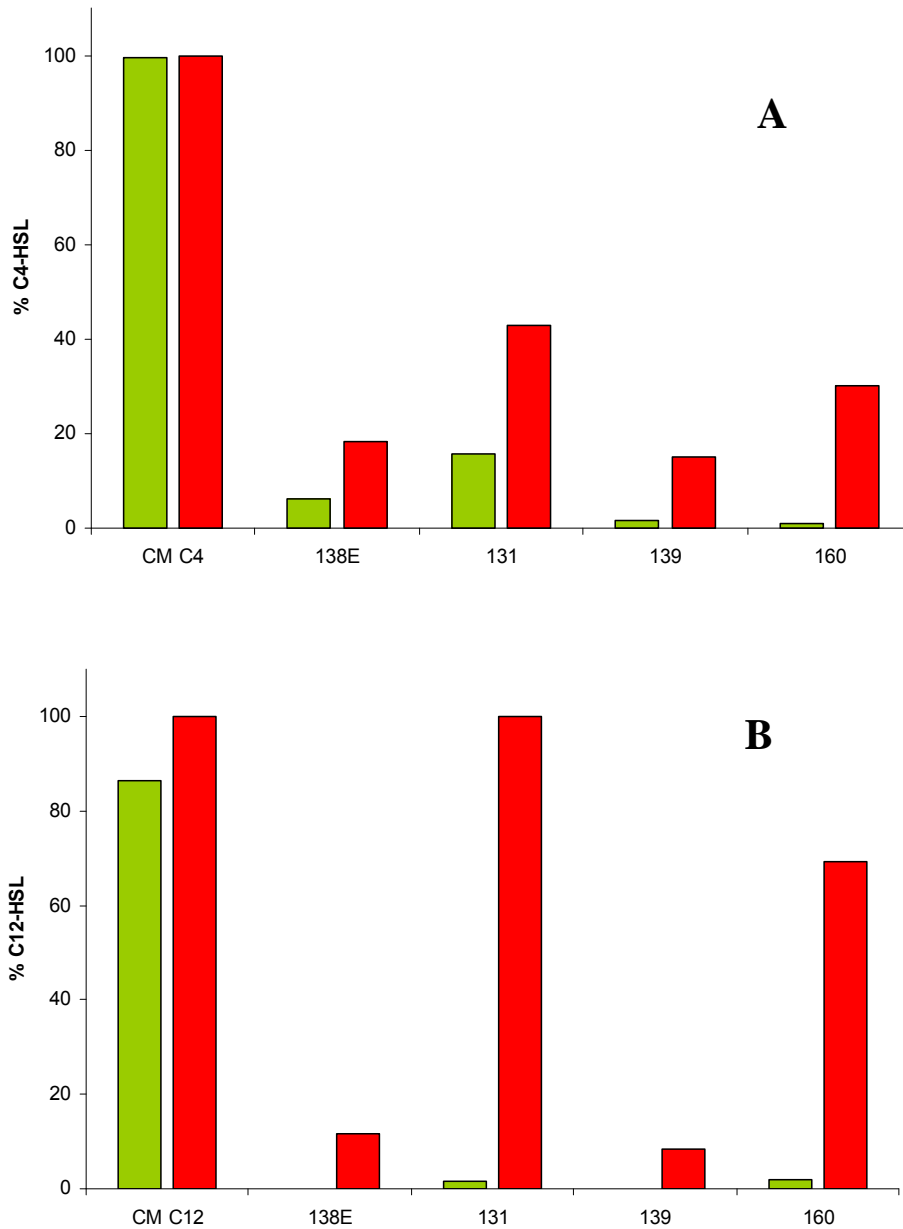


Figura 23. Análisis HPLC-MS de degradación de C4-HSL (A) y C12-HSL (B) tras 24 horas, respecto a control de AHL 50 μ M, por las 4 cepas QQ positivas seleccionadas. Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras rojas).

2.1.4 Identificación de aislados

Se seleccionaron las 4 cepas (138E, 131, 139 y 160) con actividad degradadora confirmada para C4, C6, C10 y C12 para su identificación taxonómica. Para ello se obtuvieron las secuencias del gen de ARN ribosómico 16S (Anexo 1) de las cepas y se realizó una búsqueda comparativa mediante BLAST en las secuencias disponibles de ARNr 16S del GenBank. La bacteria más próxima a cada aislado se muestra en la Tabla 10. Los aislados 131 y 160 pertenecieron a la misma especie: *Salinicola salarius* (*Halomonas salaria*) (Kim et al., 2007) con un porcentaje de similitud del 98,4% y 99,9% respectivamente con la secuencia del gen ARNr 16S. La actividad QQ sobre AHLs parece estar conservada en especies del grupo de las *Halomonas*, pues *S. salarius*, que había sido clasificada hasta hace poco como *Halomonas salaria* (De la Haba et al., 2010), es muy próxima a uno de los aislados con actividad QQ de muestra de sedimento de tanque del capítulo anterior que también se identificó como otra especie de este género (Cepa 33, *Halomonas taeanensis* 99%). Tanto en el caso de los dos aislados de *Halomonas* de alta mar como el obtenido a partir de sedimento de tanque del capítulo anterior, el análisis por HPLC-MS del producto de degradación después de acidificación revela la presencia de actividad lactonasa (Figuras 15 y 23), lo que confirma la robustez de la metodología empleada.

Origen	Cepa	Bacteria cultivada más cercana	16S % ID	Medio aislamiento
Estuario	138E	<i>Olleya marilimosa</i>	99,9	FAS POL
Alta mar (10 m)	131	<i>Salinicola salarius</i> (<i>Halomonas salaria</i>)	98,4	AM
	139	<i>Maribacter ulvicola</i>	94,7	AM
	160	<i>Salinicola salarius</i> (<i>Halomonas salaria</i>)	99,9	AM 1/100

Tabla 10. Identificación de las 4 cepas con actividad QQ en base a sus secuencias de los genes de ARNr 16S. Se muestra el origen y el medio de aislamiento de cada cepa.

A pesar de que los porcentajes de identidad de secuencias de genes de ARNr 16S no fueron iguales, el aislamiento de dos cepas de *S. salarius* a partir de la misma muestra indicaría la posibilidad de que alguno de los 82 aislados positivos de muestras de alta mar fuesen el resultado de múltiples aislamientos de la misma cepa. En espera de un estudio en profundidad para la caracterización taxonómica del resto de las especies de origen oceánico con actividad, la observación morfológica de las colonias permite agruparlas en varias tipologías que indican que efectivamente, algunas de las cepas podrían haber sido aisladas más de una vez.

Las cepas 138E y 139 aisladas de agua de mar de estuario y agua de alta mar de 10 m de profundidad pertenecen al phylum Bacteroidetes. En el caso del aislado 138E la especie más próxima es *Olleya marilimos*a (99,9%). Esta especie fue aislada de materia particulada de Océano Antártico (Nichols et al., 2005). El género *Olleya* incluye dos especies *Olleya marilimos*a y *Olleya aquimaris*, aislada de agua de puerto en Corea (Lee et al., 2010). La cepa 139 representaría una nueva especie ya que presenta un porcentaje de identidad del 94,7% con *Maribacter ulvicola*. Las especies más próximas a las cuatro bacterias seleccionadas son de origen estrictamente marino, por lo que se puede descartar una contaminación en la toma de muestras. Ninguna especie de los 3 géneros aislados en este estudio había sido descrita previamente como degradadora de AHLs o con capacidad inhibitoria de QS mediado por AHLs.

2.2 Discusión

En el trabajo descrito en este capítulo se realizó una búsqueda de cepas marinas con actividad QQ en muestras de agua de mar de estuario y alta mar a 0 y 10 metros de profundidad, con el objetivo de comparar los resultados con las muestras obtenidas en comunidades bacterianas densas costeras. Como se esperaba, en estas muestras se obtuvo una menor densidad de bacterias cultivables que en las comunidades bacterianas densas utilizadas con anterioridad para los medios seleccionados, aunque el número de UFCs fue considerablemente mayor (un orden de magnitud) en aguas de estuario que en aguas oceánicas, probablemente debido a su mayor carga orgánica (Figura 19).

Como ya sucediera con muestras del capítulo anterior, la alta actividad interceptora de comunicación por señales AHL encontrada en estos aislados marinos

manifiesta que el QQ es un proceso común entre bacterias en este medio. El porcentaje medio de cepas aisladas capaces de bloquear la actividad AHL obtenido en muestras de agua de mar fue de un 18,3% (Tabla 9), muy similar al de muestras de comunidades microbianas densas (14,4%; Tabla 6) y mucho mayor que los porcentajes obtenidos en otros estudios para muestras de suelo y plantas. Esta actividad es especialmente significativa entre las bacterias planctónicas obtenidas de agua de mar oceánica, alcanzando al menos un 20% de actividad, independientemente de la profundidad de la muestra (Tabla 9). Debido a que en la metodología de búsqueda de actividad QQ se evitó el uso de cultivos de enriquecimiento, se ha podido obtener un aislado bacteriano con posible actividad antagonista de AHLs (cepa 147) (Figuras 21 y 22). Aunque los resultados obtenidos todavía son preliminares, su confirmación supondría que la cepa 147 sería el segundo aislado bacteriano marino descrito con actividad inhibitoria de QS mediado por AHL, puesto que recientemente se ha descrito un aislado marino de *Halobacillus salinus* como productor de dos fenetilamidas con estructura similar a la de las AHLs y con capacidad de antagonizar la unión de las señales con sus receptores (Teasdale et al., 2009). La cepa 147 presentaría antagonismo sobre AHLs cortas pues se obtuvo degradación completa de C12-HSL medida por HPLC-MS (Figura 20). La actividad antagonista específica sobre ciertos tipos de AHL ya ha sido descrita debido a la diversidad estructural de las señales (Ni et al., 2009), de este modo están descritas moléculas capaces de antagonizar la recepción de AHLs cortas pero con escasa actividad sobre AHLs de cadena lateral larga y viceversa (Smith et al., 2003). Aunque debido a que la degradación de AHLs largas por la cepa 147 impide la detección de actividad antagonista sobre éstas.

Al igual que para las muestras de comunidades bacterianas costeras no se encontraron diferencias significativas entre el número de cepas con actividad QQ obtenido dependiendo del medio de cultivo o temperatura utilizados para su aislamiento, pero sí en cuanto al origen de la muestra, con un porcentaje mucho mayor en muestras de alta mar, 27,7 y 21,7% para 0 y 10 metros respectivamente, frente a sólo un 2,3% en agua de estuario, porcentaje que aproxima a esta muestra al de las muestras de suelo. Como sucediera en las muestras de comunidades bacterianas costeras, el porcentaje de aislados con actividad QQ parece incrementarse significativamente en muestras marinas con menor número de UFCs, como la superficie del alga *F. vesiculosus* y muestras de

alta mar (0 y 10 metros). Parece existir una correlación negativa entre el número de UFCs y actividad QQ, ya que las muestras con mayor actividad son aquellas que presentan menor número de bacterias cultivables. La muestra de *F. vesiculosus* y las de alta mar pueden presentar similitud en cuanto a la disponibilidad de fuentes de carbono complejas que impliquen una mayor competencia por recursos.

Un resultado significativo derivado del análisis por HPLC-MS es la elevada actividad degradadora sobre C12-HSL registrada por los 85 aislados seleccionados a partir de bioensayo con *C. violaceum* (Figura 20), mientras que únicamente 4 fueron capaces de degradar completamente la señal corta C4-HSL (Figura 21). Este resultado contrasta con el hecho de que se ha observado una menor tasa de degradación de AHLs largas respecto cortas en agua de mar filtrada, que ha sido atribuida a la existencia de enzimas de QQ (Hmelo y Van Mooy, 2009). Además, cuanto mayor sea la cadena lateral de las AHLs más estable es la molécula, de este modo las AHLs más largas son más estables a pHs alcalinos (Yates et al., 2002). Por tanto nuestras observaciones indicarían que las bacterias marinas podrían utilizar preferentemente señales AHLs de cadena lateral larga como moléculas con mayor fuente de carbono. A pesar de que los ensayos de degradación se realizaron en medio rico en nutrientes (CM) la degradación de AHLs parece expresarse constitutivamente en estos aislados, independientemente de la disponibilidad de otras fuentes de carbono.

El principal objetivo del trabajo descrito en este capítulo fue determinar si las discrepancias encontradas entre el aislamiento de cepas con actividad QQ en muestras de comunidades microbianas densas de origen costero y la frecuencia de genes de QQ en metagenomas marinos se debía a diferencias en la significación ecológica de este proceso en distintos ambientes marinos o se derivaba de problemas metodológicos. Las muestras de agua de mar analizadas en este capítulo fueron similares a las utilizadas para la construcción de librerías metagenómicas, aunque se evitó el filtrado que se aplica en algunas de las muestras de metagenomas (0,1-0,8 μm) (Rusch et al., 2007), y por lo tanto se esperaba una menor actividad QQ en sus aislados que en los aislados de superficies costeras, por el bajo número de secuencias homólogas a acilasas y lactonasas halladas en metagenomas. Sin embargo, de nuevo la actividad registrada fue similar o incluso mayor que la obtenida para muestras de comunidades bacterianas densas, especialmente en las muestras de agua de mar abierto.

Es por tanto más factible la segunda hipótesis enunciada en el capítulo anterior, que explicaría la discrepancia en la relevancia de los sistemas de QS y QQ en las bacterias marinas cultivables y las bases de datos de metagenomas marinos en base al número limitado de secuencias para enzimas productoras y degradadoras de AHLs disponibles. La mayoría de las sintetasas de AHL que han sido identificadas son homólogos de LuxI pertenecientes a α -, β - y γ -Proteobacteria (Williams et al., 2007). La amplia variedad taxonómica de Proteobacterias marinas productoras de AHLs junto con el reciente descubrimiento de producción de AHLs por aislados marinos de Bacteroidetes (Huang et al., 2008; Romero et al., 2010, Anexo 2.2), apoyaría la existencia de una mayor diversidad de sintetasas y receptores de AHLs cuya presencia no sería revelada por el uso de las secuencias de *luxI* y *luxR* en las colecciones de metagenomas. El mismo problema se aplica para las secuencias de QQ, puesto que de los 4 puntos posibles de corte de la estructura de las AHL (Figura 7A, Dong y Zhang, 2005), únicamente se han descrito enzimas con actividad sobre dos de ellos, por lo que no se puede descartar que además de existir secuencias marinas con baja homología para las acilasas y lactonasas conocidas, existan otros tipos de enzimas todavía no descritos con estos tipos de actividad. Además existen diferentes familias de enzimas con un mismo tipo de actividad. Así, recientemente se ha clonado de *R. erythropolis* una nueva clase de lactonasa (Uroz et al., 2008), que no presenta homología con la familia de lactonasas bien caracterizadas que comparten un dominio de unión a Zn (HXDH~H~D) y están representadas por AiiA de *Bacillus* sp. (Dong et al., 2000). También han sido identificadas dos nuevas lactonasas en un estudio de metagenoma de suelo (Schipper et al., 2009). La baja homología existente entre las secuencias de las enzimas de QQ hace necesario disminuir los parámetros de restricción en las búsquedas para la obtención de secuencias en los genomas bacterianos secuenciados (Figura 18). La aplicación de estos mismos parámetros en la búsqueda en colecciones de metagenomas resulta en un importante incremento en la cantidad de secuencias con posible actividad acilasa o lactonasa disminuyéndose la discrepancia de resultados obtenidos con la actividad de las bacterias cultivables. El presente trabajo ha permitido la identificación de un total de 19 bacterias con actividad QQ pertenecientes a 10 nuevos géneros en los que esta actividad no había sido descrita con anterioridad, incluyendo una nueva especie de α -Proteobacteria (cepa 177) y Bacteroidetes (cepa

139), lo que seguramente permitirá la identificación de nuevas secuencias de enzimas degradadores de AHLs.

Otra explicación que todavía no puede ser totalmente descartada, debido a la utilización de muestras de agua de mar no filtradas en este capítulo, es que la metodología utilizada para la construcción de librerías metagenómicas excluye la materia particulada a la que se asocian numerosas bacterias. La asociación de los procesos de QS y QQ a comunidades bacterianas asociadas a materia particulada (Gram et al., 2002; Cicirelli et al., 2008; Hmelo y Van Mooy, 2009; Tait et al., 2009), excluida de los metagenomas, explicaría también la baja frecuencia de genes de QS y QQ observada en éstos. Un dato que apoya esta hipótesis es que la cepa 138E, con elevada actividad QQ sobre AHLs, obtenida en este trabajo se corresponda con *Olleya marilimos*, Bacteroidete aislado originalmente de materia particulada del océano Antártico (Nichols et al., 2005).

El océano es un ecosistema extremo debido a la baja concentración de nutrientes, ya que elementos como nitrógeno, fósforo y hierro están frecuentemente a concentraciones muy bajas o casi indetectables, lo que ocurre en el 70% de los océanos (Michaels et al., 1994). Estas condiciones limitan en gran medida la abundancia de bacterias en aguas oceánicas. La abundancia bacteriana en el océano es un tema controvertido debido a las discrepancias obtenidas dependiendo de las técnicas utilizadas. Mediante técnicas moleculares generalmente esta densidad se sitúa en 10^5 bacterias/mL en la superficie de los océanos (0-300m) (Ducklow, 2000), mientras que mediante cultivo con medios microbiológicos estándar únicamente el 0,1% de éstas son cultivables (Ferguson et al., 1984), lo que limita en gran medida las conclusiones ecológicas que se pueden obtener a partir de las bacterias cultivables obtenidas de muestras oceánicas. A pesar de esto, la utilización de técnicas de filogenia molecular, basadas en la similitud en las secuencias de genes como el del ARNr 16S (Pace et al., 1986; Woese, 1987) aplicadas a los análisis metagenómicos que secuencian de manera aleatoria porciones de los genomas presentes en la muestras y de este modo muestran la habilidades funcionales de los microorganismos de un determinado hábitat (Venter et al., 2004), han permitido estimar las abundancias relativas de las diferentes divisiones y phyla de los microorganismos en el océano. El phylum dominante de bacterias en muestras de océano, tanto en muestras cultivables como en los análisis metagenómicos,

son las Proteobacterias (sobretudo α - y γ -Proteobacterias) constituyendo aproximadamente el 60% de las secuencias de RNA 16S en colecciones de los metagenomas (Giovanonni y Stingl, 2005; Rusch et al., 2007). Otro grupo importante del bacterioplancton marino lo constituye el phylum Bacteroidetes que, de acuerdo con los análisis de hibridación de fluorescencia in situ (FISH), constituiría la mitad de las células del bacterioplancton potencialmente hibridadas en una muestra marina (Cottrell y Kirchman, 2000). Estos resultados contrastan con la baja frecuencia de clones pertenecientes a Bacteroidetes detectados en librerías de RNA 16S de muestras de océano. Se ha hipotetizado con que estas discrepancias se podrían deber a una desviación aparente contra este grupo por los cebadores utilizados habitualmente en la construcción de estas librerías (Weaver et al., 2003), sin embargo la relativa baja frecuencia de este phylum en estudios de colecciones metagenómicas realizados hasta la fecha sugiere que los análisis FISH no son completamente representativos (5-13% de miembros de Bacteroidetes; Giovanonni y Stingl, 2005; Rusch et al., 2007).

Aunque los resultados de estudios con bacterias marinas cultivables deben tomarse con cautela y el bajo número de representantes con actividad QQ limita la generalización de estos resultados, la diversidad de bacterias obtenidas en este estudio no refleja los porcentajes de prevalencia de los distintos grupos derivados de las técnicas moleculares, ya que la mitad de los aislados seleccionados con actividad QQ de amplio espectro pertenecieron al phylum Bacteroidetes (Cepa 138E: *Olleya marilimosa* y Cepa 139: nueva especie próxima a *Maribacter ulvicola*) mientras que la prevalencia de este grupo en muestras oceánicas según librerías de secuencias de ARNr 16S es mucho menor. Se piensa que este grupo constituye uno de principales degradadores de materia orgánica del bacterioplancton (Riemann et al., 2000), por tanto es posible que entre la amplia variedad de estrategias degradadoras en este grupo, se incluya la utilización de señales AHL como fuente de energía adicional.

Con la excepción del alto porcentaje de QQ obtenido para la muestra de *F. vesiculosus*, los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que los fenómenos de QQ son más abundantes en aguas oceánicas. En espera del estudio taxonómico de las 82 cepas obtenidas de agua oceánica, los Bacteroidetes parecen ser el grupo predominante entre los aislados de aguas oceánicas con esta actividad y por tanto parece

existir una menor diversidad taxonómica entre los aislados con actividad QQ de amplio espectro en el mar abierto respecto a muestras de superficies costeras.

Capítulo 3. Caracterización de *Tenacibaculum discolor* 20J, una cepa marina con elevada actividad degradadora de AHLs

3.1 Resultados

3.1.1 Especificidad de la actividad quorum quenching

De las cepas con actividad QQ identificadas en las muestras marinas, se seleccionó para un primer estudio de caracterización de la actividad la cepa *Tenacibaculum discolor* 20J, por ser un aislado con alta actividad degradadora sobre las cinco AHLs testadas inicialmente (C4, C6, C10, C12 y OC12-HSL), por su rápido crecimiento y por ser cultivable en medios marinos y terrestres. Por estas características esta cepa ha sido objeto de patente y actualmente se encuentra en fase de aprobación internacional (Anexo 2.3). Para esta cepa se determinó, mediante HPLC-MS en cultivos de mayor volumen (20 mL), el tipo de actividad QQ que presentaba y su capacidad de degradar todo el rango de AHLs de distinta longitud de cadena lateral de las que disponíamos en el laboratorio. Esta técnica analítica permite comprobar de forma inequívoca la degradación de las AHLs. Las señales ensayadas fueron: C4, C6, C8, C10, C12 y C14-HSL en concentración 50 μ M. Para C4 y C12-HSL se acidificaron los sobrenadantes para la detección de posible actividad lactonasa (Yates et al., 2002). Tras 24 horas *T. discolor* 20J eliminó totalmente todas las AHLs no sustituidas probadas demostrando por tanto poseer actividad degradadora altamente inespecífica (Figura 24). Como sucediera en cultivos de 1 mL (Figura 15), cuando se acidifican a pH 2 los sobrenadantes de cultivos de mayor volumen de *T. discolor* 20J se recupera aproximadamente la mitad de la concentración de la señal corta (Figura 24). Este resultado indica la posible presencia de una lactonasa responsable de, al menos, la mitad de la actividad degradadora sobre C4-HSL. En el caso de C12-HSL, no se pudo recuperar la molécula señal tras acidificación, por tanto la actividad enzimática de *T. discolor* 20J sobre AHLs largas no puede ser explicada por la presencia de una lactonasa, debiendo ser analizado mediante la técnica de dansilación si se trata de una acilasa (Uroz et al., 2005). Estos datos indican por tanto que el aislado 20J presenta

doble actividad degradadora de AHLs, lactonasa sobre AHLs cortas y acilasa u otra sobre largas.

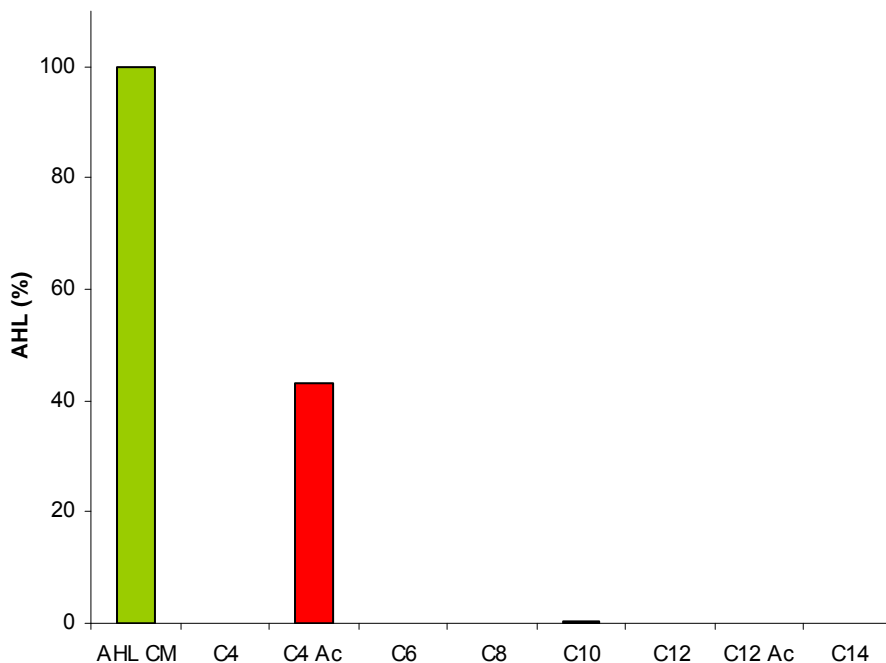


Figura 24. Degradación, por la cepa marina *T. discolor* 20J, de señales AHL con cadena lateral no sustituida de entre 4 y 14 carbonos (C4-C14) respecto a controles con 50 μ M en caldo marino (AHL CM). En el caso de las señales C4 y C12-HSL se acidificó el sobrenadante a pH 2 (C4 y C12 Ac) tras la degradación para detectar actividad lactonasa.

Este resultado se confirmó en el ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 para la señal C6-HSL 10 μ M y *C. violaceum* VIR07 para C10 y C12-HSL 10 μ M, con y sin acidificación hasta pH 2. En este caso tras degradación de las señales por cultivos de *T. discolor* 20J se realizaron extracciones orgánicas de los sobrenadantes y sobrenadantes acidificados de los cultivos y los extractos secos se resuspendieron en agua para posterior ensayo en pocillo con los biosensores de *C. violaceum*. Se obtuvo recuperación de la producción de violaceína en las muestras de cultivos de degradación de C6-HSL (Figura 25), pero no se observó recuperación de las AHLs de cadena larga C10 y C12-HSL (No se muestran los datos).

T. discolor 20J fue capaz de degradar también la AHL sustituida OC12-HSL (Tabla 6), en el ensayo con el biosensor *E. coli* JM109 pSB1075, lo que indica el amplio espectro de degradación de AHLs de esta cepa.

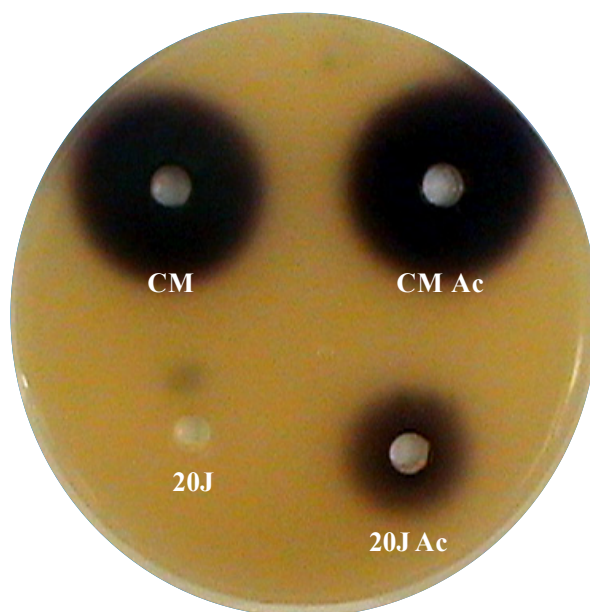


Figura 25. Ensayo con *C. violaceum* CV026 para detectar degradación por *T. discolor* 20J de C6-HSL 20 μ M (20J) en relación a control (CM) y los mismos sobrenadantes tras acidificación a pH 2 (Ac).

3.1.2 Cinética de degradación de AHLs

Se investigaron las cinéticas de degradación de *T. discolor* 20J para una señal corta (C4-HSL) y larga (C12-HSL). Se tomaron y extrajeron muestras a diferentes tiempos tras adición de las AHLs: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas (Figura 26) y la cantidad de AHL restante en cada extracto se cuantificó por HPLC-MS. *T. discolor* 20J degradó la señal C4-HSL desde muestras muy tempranas, reduciendo a la mitad la concentración de esta AHL después de 30 min de exposición (Figura 26).

Esta actividad degradadora fue más rápida para C12-HSL, puesto que el aislado 20J degradó el 100% de la señal después de 30 minutos (Figura 26). La rapidez con la que se produjo la degradación de C12-HSL parece indicar que *T. discolor* 20J no necesita la presencia de AHLs para inducir la producción de enzimas degradadoras, sino que esta actividad está presente de modo constitutivo en esta cepa. La concentración 30 μ M de C4-HSL fue eliminada completamente tras 8 horas de incubación (Figura 26).

Las diferentes cinéticas de degradación observadas para las dos AHLs de distinto tamaño apoyan la hipótesis de la presencia de dos actividades enzimáticas en *T. discolor* 20J.

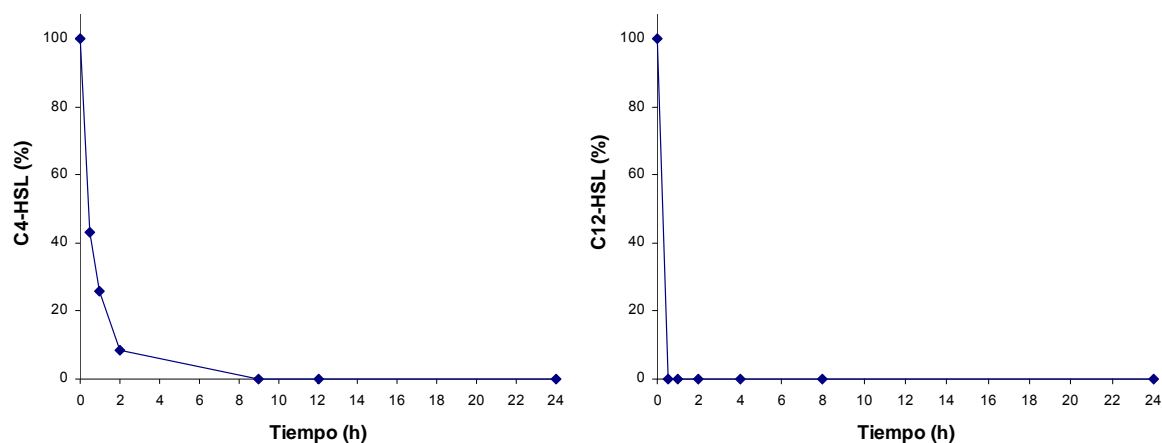


Figura 26. Cinéticas de degradación obtenidas para C4 y C12-HSL por cultivos vivos de la cepa marina *T. discolor* 20J medidas por HPLC-MS en muestras a distintos tiempos. Concentración inicial de las AHLs: 30 μ M.

3.1.3 Localización celular de la actividad degradadora de AHLs en *Tenacibaculum discolor* 20J

Para determinar la localización celular de las actividades degradadoras de AHLs, se obtuvo el sobrenadante y extracto celular crudo (CCE) de cultivos de 24 horas de *T. discolor* 20J. Se expusieron las señales C4 y C12-HSL a los sobrenadantes o CCEs durante 24 horas y la cantidad restante de AHL se determinó por HPLC-MS o por producción de violaceína con *C. violaceum* CV026 ó VIR07. La actividad QQ de *T. discolor* 20J pudo ser detectada tanto en sobrenadantes como CCEs (Figura 27). Como en anteriores ensayos las dos AHLs testadas (C4 y C12-HSL) fueron degradadas en su totalidad cuando se expusieron a cultivos vivos de *T. discolor* 20J (Figura 27). En el caso de CCEs la degradación de C4 y C12-HSL fue comparable, sin embargo la recuperación de la señal corta fue mayor tras acidificación, lo que indicaría la existencia de otra actividad enzimática además de la actividad lactonasa en los CCEs de *T. discolor* 20J, además de una actividad lactonasa preferentemente sobre AHLs cortas (Figura 27). Los sobrenadantes de cultivos de 20J degradaron gran parte de la C4-HSL

y cuando se acidificó se recuperó aproximadamente la mitad de su concentración inicial (Figura 27), indicando que la lactonasa anteriormente detectada podría ser también secretada al medio de cultivo.

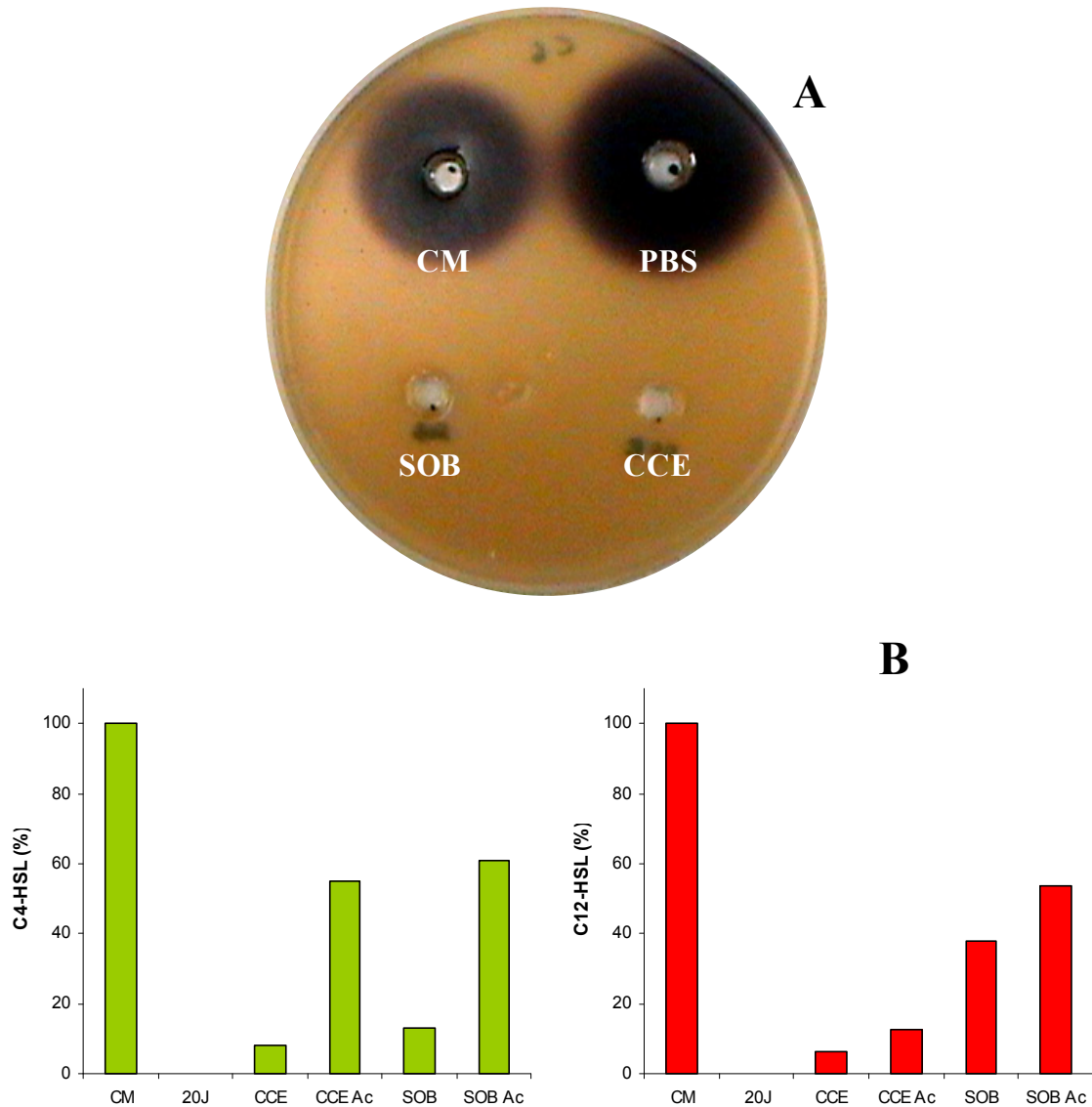


Figura 27. A) Degradación de la señal C6-HSL 20 μ M por sobrenadantes (SOB) y extracto celular crudo (CCE) de *T. discolor* 20J en comparación con controles (CM y PBS). B) Degradación de las señales C4 y C12-HSL 50 μ M por cultivos vivos (20J), CCEs o sobrenadantes (SOB) de *T. discolor* 20J, medida por HPLC-MS.

La degradación y recuperación tras acidificación de C12-HSL fue significativamente más débil en los sobrenadantes, indicando que la principal enzima degradadora de esta señal se encuentra principalmente unida a la célula o al menos es

funcional sólo en presencia de otros componentes celulares. La disminución de C12-HSL detectada en el sobrenadante podría deberse bien a la acción inespecífica de la lactonasa, que presentaría algo de actividad sobre AHLs largas o a la existencia de una pequeña cantidad de enzimas celulares en el sobrenadante capaces de degradar C12-HSL liberadas por rotura celular durante la manipulación.

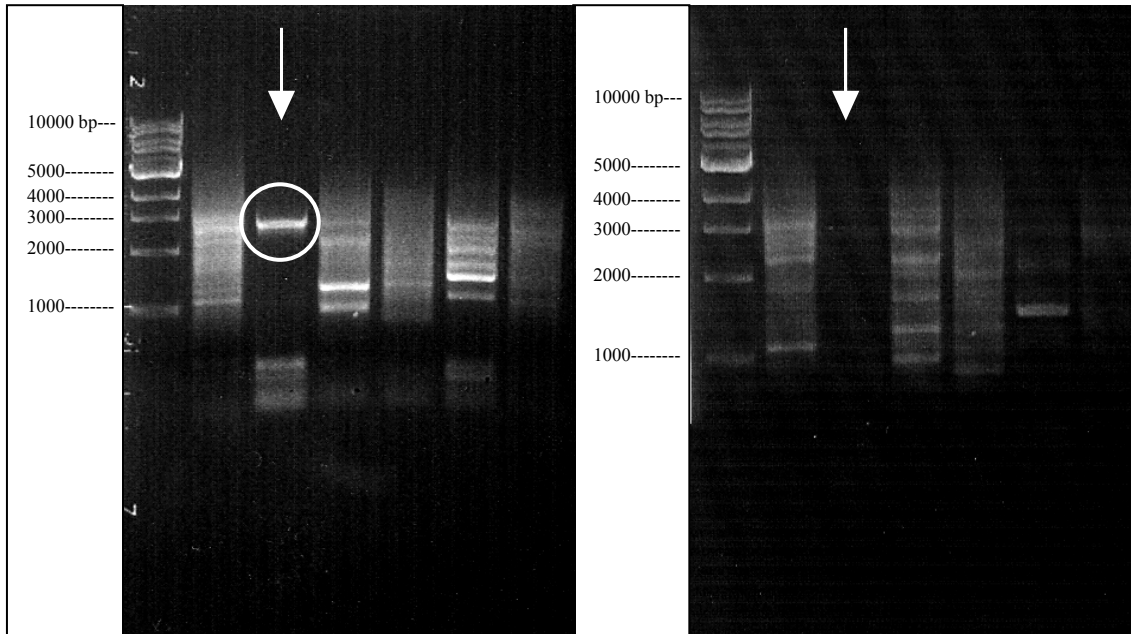


Figura 28. Izquierda: banda de amplificación obtenida por PCR con cebadores para genes lactonasa en *T. discolor* 20J (flecha) a 50°C de temperatura de hibridación. Derecha: ausencia de amplificación para *T. discolor* 20J a temperatura de hibridación de 55°C.

3.1.4 PCR para lactonasas y acilasas

Con el objetivo de determinar si las actividades enzimáticas sobre señales AHLs en *T. discolor* 20J eran debidas a acilasas o lactonasas homólogas a las ya descritas en la bibliografía, se realizaron PCRs con cebadores degenerados diseñados para las secuencias más conservadas de estas enzimas (Park et al., 2003; 2005). Para la PCR de acilasas no se obtuvo amplificación incluso reduciendo la temperatura de hibridación (de 55 a 50°C), por tanto, o bien la enzima responsable de la mayor parte de la degradación de señales de cadena lateral larga no es una acilasa o se trata de una acilasa que no presenta homología con ninguna de las acilasas conocidas hasta la fecha. En el

caso de lactonasas se obtuvo una banda de amplificación de aproximadamente 3000 pb (Figura 28), pero el tamaño esperado de la banda del fragmento de gen de lactonasa, según las secuencias conocidas era de 180 pb, por lo que probablemente se trataba de amplificación inespecífica. Para comprobar esta posibilidad se realizó una nueva PCR aumentando la temperatura de hibridación, desapareciendo la banda de amplificación (Figura 28).

3.1.5 Clonación de genes de quorum quenching de *Tenacibaculum discolor* 20J

Debido a que no se obtuvo amplificación específica para acilasas o lactonasas conocidas a partir de ADN genómico de *T. discolor* 20J, se llevó a cabo un intento de clonación de los genes de QQ responsables de las actividades degradadoras de AHLs presentes en *T. discolor* 20J mediante la construcción de una librería genómica en plásmido con insertos entre 2 y 4 kb. Esta librería se utilizó para transformar *P. aeruginosa* PAOI portadora del plásmido QSIIS pMH655 (Rasmussen et al., 2005), que fue diseñada para la detección de inhibidores de QS, ya que la cepa no puede sobrevivir en presencia de sacarosa y AHL.

A pesar de que se superó el número mínimo de recombinantes a analizar (32.000) para obtener una probabilidad del 99% de incluir los genes responsables de la actividad QQ en *T. discolor* 20J, no se obtuvieron clones capaces de degradar las señales y por tanto de crecer en el medio selectivo. Para comprobar la validez de la metodología utilizada se realizó una transformación del mismo biosensor de *P. aeruginosa* PAOI con el plásmido pME6000 portador del gen *aiiA* codificador de lactonasa de *Bacillus* sp. obteniéndose crecimiento en presencia de sacarosa. La imposibilidad de clonación de las enzimas responsables de la degradación de señales con la metodología empleada en este estudio podría indicar que la degradación de AHLs en *T. discolor* 20J requiere de varios genes ubicados en una región del cromosoma de tamaño superior a 4 kb, o bien que los genes de QQ presentan un tamaño superior a 4 kb. Es posible también que el huésped seleccionado no permita la expresión de los genes de un miembro del grupo Bacteroidetes o que se requiera algún coenzima específico para su funcionalidad. Para explorar estas posibilidades en la actualidad se está construyendo una librería en fósidos con fragmentos de ADN de *T. discolor* 20J

mayores (40 kb) y que será expresada en *E. coli* DH5 α , para la que se ha puesto ya a punto la metodología para la detección de clones con actividad QQ.

3.1.6 Análisis de patogenicidad de *Tenacibaculum discolor* 20J

Con el objetivo de determinar si la cepa 20J de *T. discolor* aislada en este trabajo podría tener aplicaciones biotecnológicas directas en el campo de la acuicultura se comprobó si era patógena para peces. Para ello se realizó una infección experimental de juveniles de rodaballo, mediante inoculación intraperitoneal de 100 μ L de suspensión bacteriana de *T. discolor* 20J en solución salina (10^9 células por mililitro). A pesar de la elevada concentración bacteriana utilizada para la inoculación de los peces no se registró mortalidad de los juveniles al cabo de 21 días por lo que se descarta la posibilidad de que esta cepa sea patógena para rodaballo en las condiciones ensayadas. Es necesario sin embargo comprobar la patogenicidad de esta cepa en otras especies y en condiciones de estrés, antes de pasar a comprobar la viabilidad de su utilización como probiótico en co-inoculaciones con patógenos.

3.1.7 Actividad quorum quenching en el género *Tenacibaculum*

Adicionalmente se probaron otras cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* (Tabla 4) para determinar si presentaban actividad degradadora de AHLs. Se utilizaron los biosensores de *C. violaceum* CV026 para detectar actividad QQ sobre C6-HSL y *C. violaceum* VIR07 para C10-HSL. Se observó degradación completa de ambas señales tras 24 horas cuando se añadieron a cultivos de todas las especies de *Tenacibaculum* ensayadas, con la excepción de *T. maritimum* NCIMB 2154^T, que no eliminó la señal corta (Figura 29A) (Anexo 2.2). Corroborando resultados anteriores que apoyaban la hipótesis de que la lactonasa responsable de degradación de AHLs cortas se encontraba en sobrenadantes, mientras que la enzima que actúa sobre largas se encontraría unida a biomasa, la actividad QQ de *T. maritimum* sobre AHLs largas estaría asociada a la biomasa, debido a que no se observó una reducción significativa de actividad C10-HSL cuando la señal se añadió a sobrenadantes filtrados de la bacteria (Figura 29B).

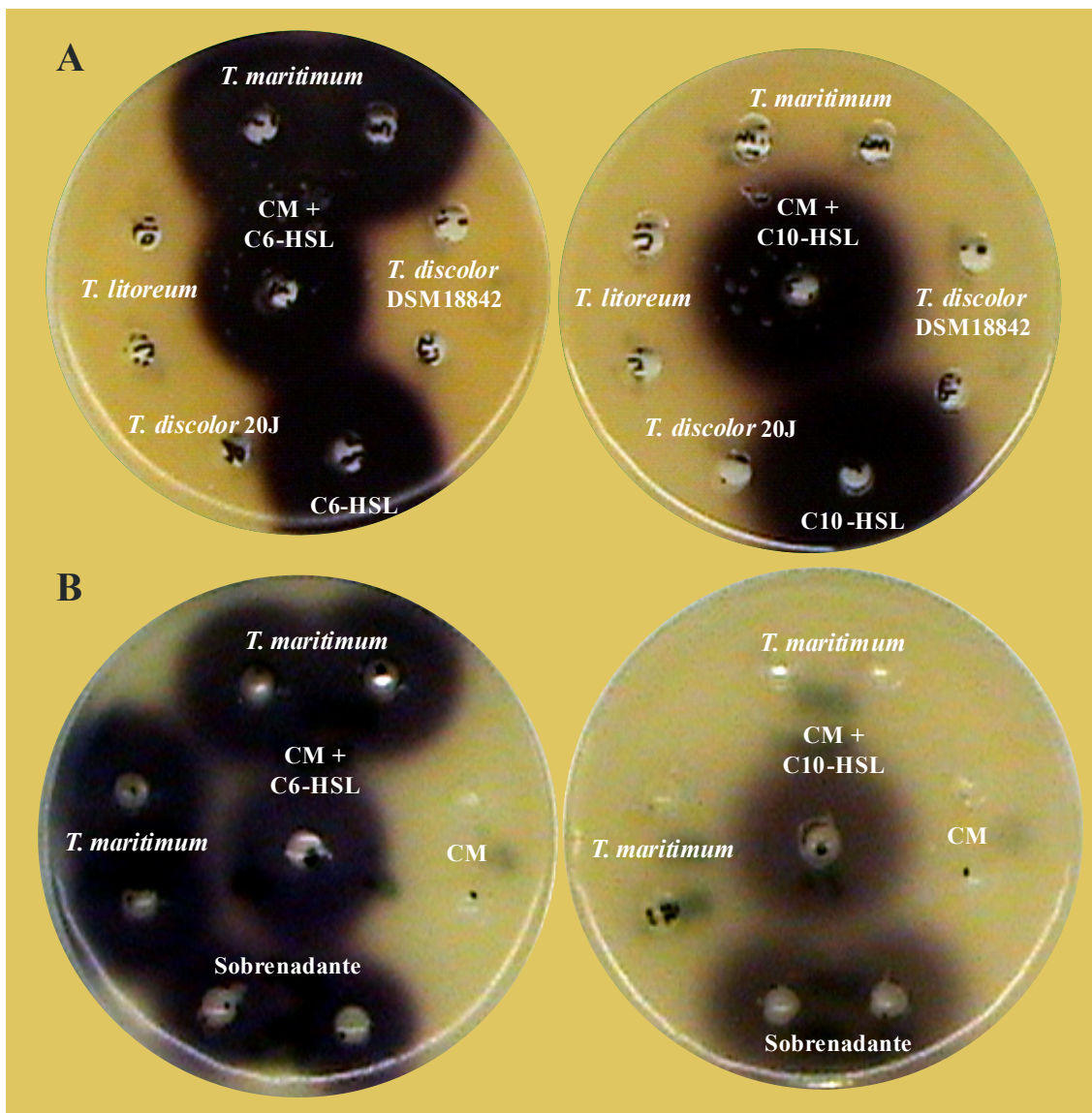


Figura 29. Fotografías de ensayos de QQ en placa con los biosensores *C. violaceum* CV026 (izquierda) y VIR07 (derecha). A) Ensayo de degradación de C6 y C10-HSL por cultivos de 24 horas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T, *T. discolor* DSM 18842, *T. discolor* 20J y *T. litoreum* JCM13039. Como controles se añadieron 2 µg/mL (10 µM) de C6 ó C10-HSL en CM o directamente a pocillo. B) Ensayo de QQ en *T. maritimum* NCIMB 2154^T y sobrenadante de un cultivo de 24 de *T. maritimum* NCIMB 2154^T. Como controles se añadieron 2 µg/mL (10 µM) de C6 ó C10-HSL en CM o CM sin AHL.

La realización del ensayo para determinar el tipo de actividad degradadora presente en *T. maritimum* NCIMB 2154^T mediante análisis en HPLC-MS confirmó que la bacteria degradaba el 90% de la señal C10-HSL tras 24 horas de exposición, pero no

se recuperó la señal tras acidificación del medio de cultivo, lo que descartaría una actividad tipo lactonasa en esta cepa (Figura 30).

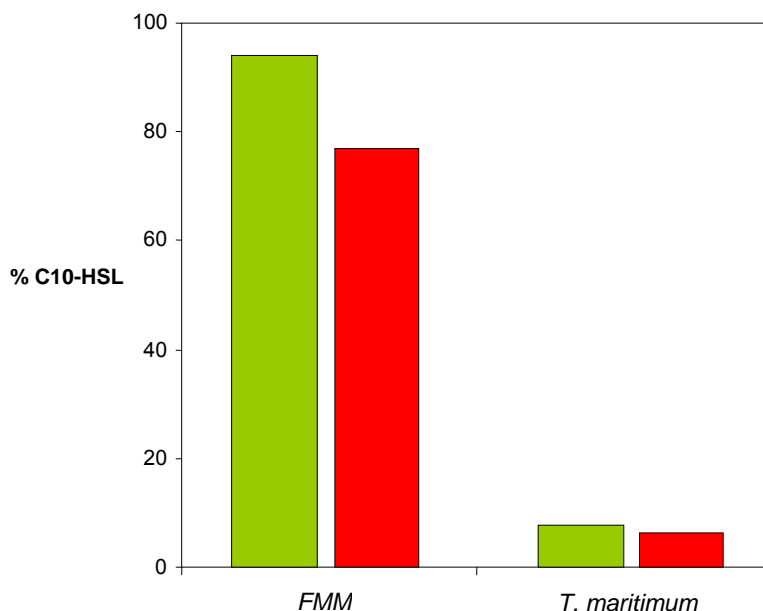


Figura 30. Cuantificación por HPLC-MS de C10-HSL tras 24 horas en FMM y FMM inoculado con *T. maritimum* NCIMB 2154^T, en extractos de sobrenadantes de cultivo sin acidificación (barras verdes) o acidificados a pH 2 (barras rojas). Los datos están expresados como porcentaje de la concentración inicial de AHL (2 µg/mL=10 µM).

3.1.8 Detección e identificación de AHLs en el género *Tenacibaculum* y efecto de adición de C4-HSL en *Tenacibaculum maritimum* NCIMB 2154^T

Durante los ensayos de detección de QQ con las distintas cepas de especies pertenecientes al género *Tenacibaculum* se observaron halos tenues de activación de violaceína con el biosensor *C. violaceum* CV026 para sobrenadantes de *T. maritimum* NCIMB 2154^T. Estos resultados podrían indicar la producción de AHLs por estos miembros de un género perteneciente al grupo Bacteroidetes, que constituye uno de los grupos dominantes de bacterias heterotróficas en los ambientes acuáticos. Esta observación significaba la primera descripción de la producción de AHLs por una no-proteobacteria, ya que hasta ese momento las AHLs sólo habían sido identificadas en α ,

β y γ -Proteobacterias. Además, en este caso, se trataba de una bacteria patógena del grupo Bacteroidetes.

Con el objetivo de confirmar estos resultados preliminares obtenidos con *C. violaceum* CV026, se utilizaron también los tres biosensores de *E. coli* JM109 con mayor sensibilidad para la detección de amplio rango de tamaños de AHL. Para ello se analizaron sobrenadantes crudos (no extraídos orgánicamente) obteniéndose activación de *E. coli* JM109 pSB536 en luminómetro lo que indicaría la presencia de señales AHL de cadena corta en los sobrenadantes del cultivo (no se muestran los datos). Debido a que la activación de biosensores podría deberse a compuestos diferentes de señales tipo AHL presentes en los medios de cultivo de *Tenacibaculum*, se extrajeron orgánicamente muestras de mayor volumen (40 mL) de sobrenadantes de cultivo tomadas a 24 y 48 horas tras inoculación. De nuevo estos extractos se analizaron mediante luminómetro y TLC con las tres cepas biosensoras de *E. coli* JM109.

CEPA	24h	48h
<i>T. discolor</i> 20J	+	++
<i>T. discolor</i> DSM 18842	+	++
<i>T. discolor</i> LC073.2.2	+	++
<i>T. discolor</i> R016.8.1	+	++
<i>T. gallaicum</i> R006.0.1	+	++
<i>T. gallaicum</i> A37.1	+	++
<i>T. litoreum</i> JCM13039	+	++
<i>T. maritimum</i> NCBI 2154 ^T	+	++
<i>T. maritimum</i> NCIMB 2153	++	+
<i>T. maritimum</i> NCIMB 2158	++	+
<i>T. maritimum</i> ACC6.1	+	++
<i>T. maritimum</i> ACR104.1	+++	+
<i>T. maritimum</i> LGH35-03	-	+++
<i>T. maritimum</i> PC424.1	+	++
<i>T. maritimum</i> PC503.1	++	+++
<i>T. maritimum</i> PC538.1	++	+
<i>T. soleae</i> LL0412.1.7	+	++
<i>T. soleae</i> 567/06.1	+	++

Tabla 11. Activación de biosensor de AHLs cortas *E. coli* JM109 pSB536 por extractos orgánicos de sobrenadantes de cultivo de diferentes cepas del género *Tenacibaculum* recogidos después de 24 y 48 horas de cultivo.

En ambos ensayos se confirmó activación con *E. coli* JM109 pSB536 tanto para las muestras de 24 como 48 horas para todas la cepas del género *Tenacibaculum* probadas, aunque con diferencias en el tiempo máximo de activación (Tabla 11).

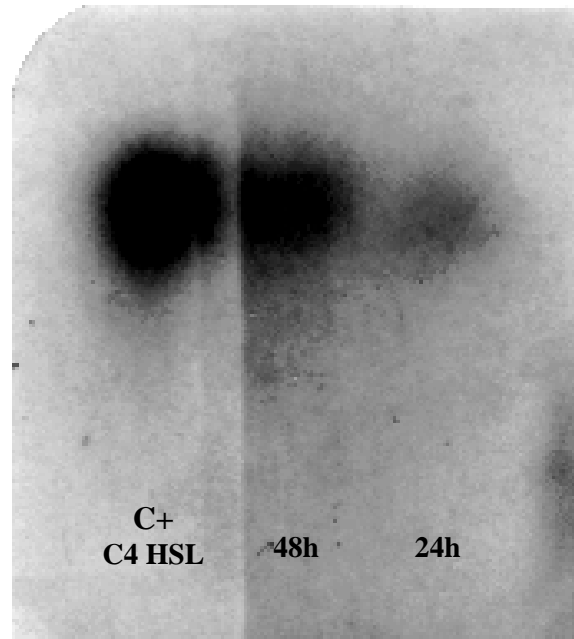


Figura 31. Detección de actividad AHL en extractos de medio de cultivo de 24 y 48 horas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T en ensayo con TLC. Las TLC fueron cubiertas con *E. coli* JM109 pSB536 y la luz emitida por el biosensor fue registrada mediante velado de placas de radiografía.

Además, debido a que el ensayo con TLC permite una identificación parcial de la señal presente en los extractos por comparación de migración con la de AHLs sintéticas, se identificó el compuesto activador como una probable C4-HSL (Figura 31). Los análisis por HPLC-MS identificaron de manera inequívoca la presencia de C4-HSL en los extractos por comparación de los espectros de masas con los de la AHL sintética (Figuras 32 y 33). Estos análisis se realizaron en dos laboratorios con dos equipos diferentes y condiciones cromatográficas ligeramente distintas para ratificar la bondad de la identificación, debido a que se trataba de la primera descripción de Bacteroidetes patógenos como productores de señales AHL.

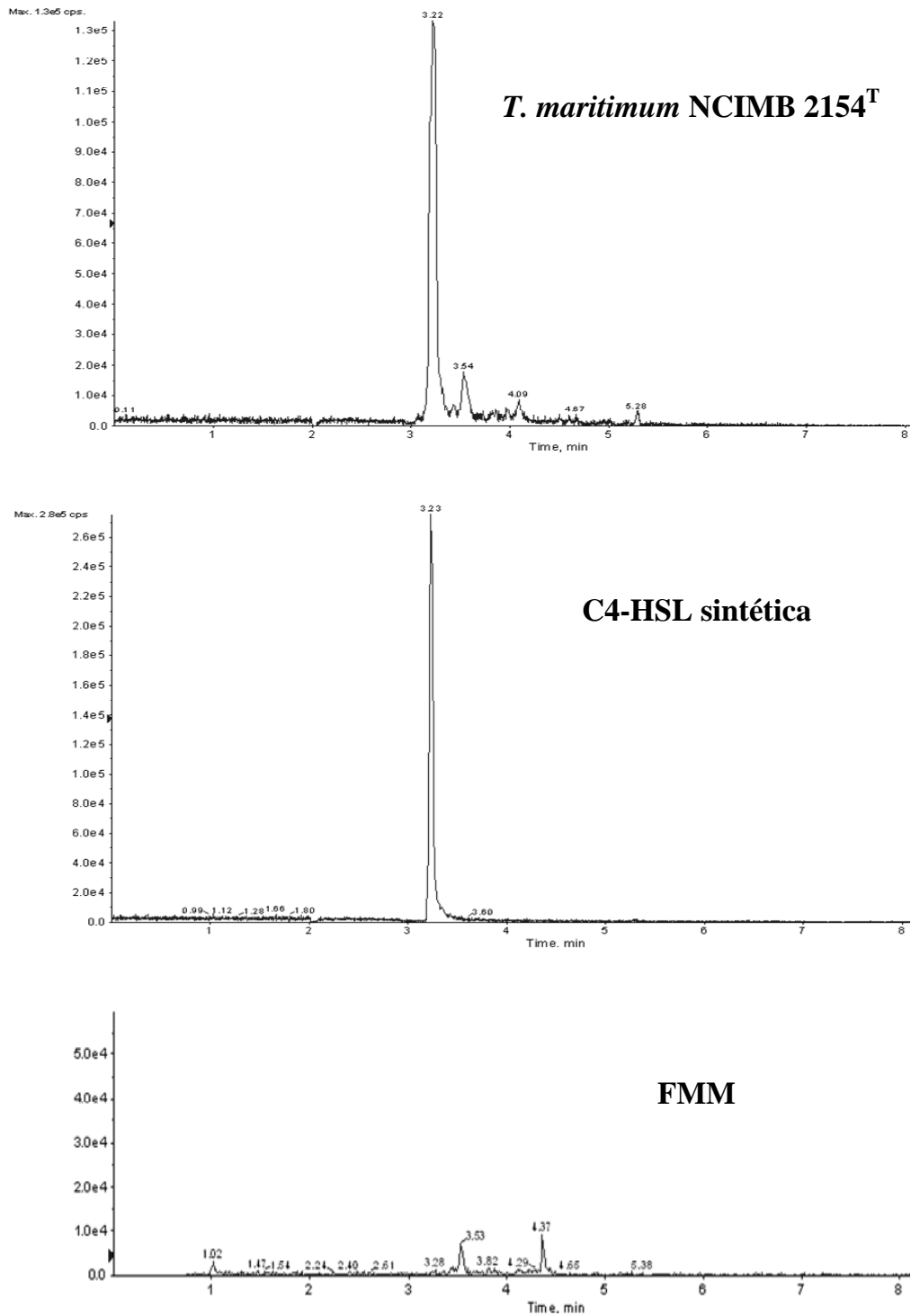


Figura 32. Cromatogramas de iones obtenidos a partir de transición 172.1 > 102.1 (C4-HSL) de MRM (Multiple Reaction Monitoring) de extractos de medio de cultivo de 48 horas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T en FMM, C4-HSL sintética y medio de cultivo FMM.

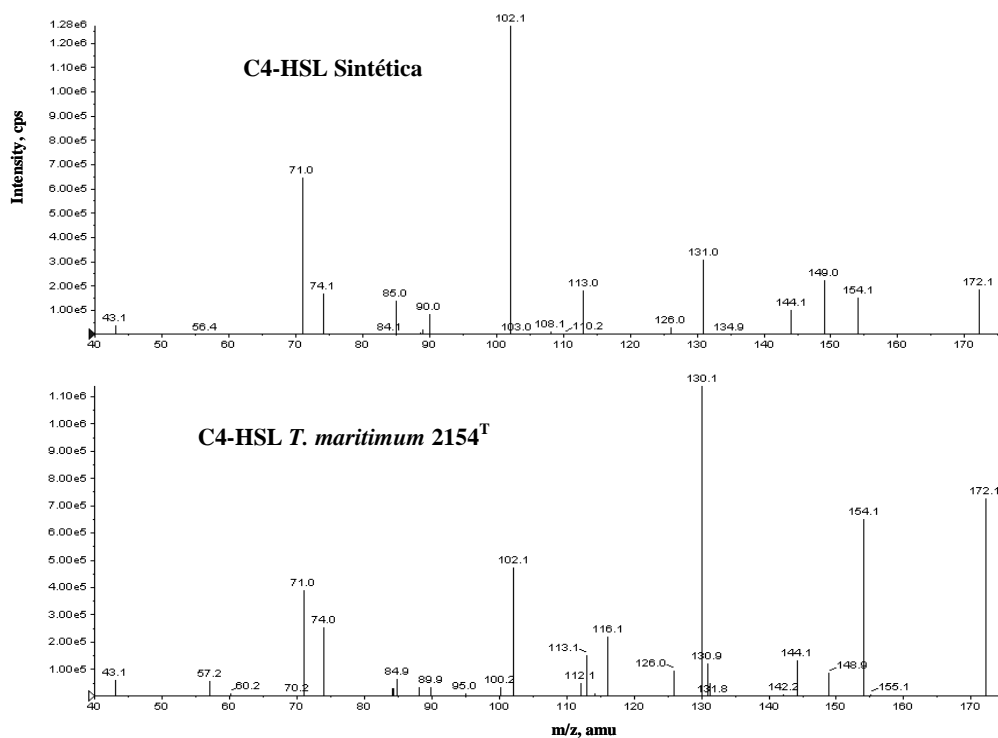


Figura 33. Identificación de C4-HSL. Picos del espectro de masas obtenido para C4-HSL sintética y el correspondiente para extractos de medio de cultivo de *T. maritimum* NCIMB 2154^T.

Para estudiar el efecto del medio de cultivo en la producción de C4-HSL, se seleccionó la cepa *T. maritimum* NCIMB 2154^T. Se cultivó la bacteria en FMM o CM y se tomaron muestras a diferentes tiempos tras inoculación para estudiar la producción de señal a lo largo de la curva de crecimiento mediante luminómetro con el biosensor *E. coli* JM109 pSB536. En ambos medios se detectó actividad C4-HSL, siendo las curvas de producción de la AHL bastante diferentes. Aunque el máximo de producción de señal detectado en ambos medios se situó a las 48 horas tras inóculo, éste fue más acusado en medio FMM, debido a que en el CM la producción de AHL ya fue elevada en muestras tempranas (Figura 34). También se obtuvo una curva de producción de C4-HSL muy similar a partir de los mismos extractos de medio FMM en HPLC-MS (Figura 34) confirmando la validez de la metodología de cuantificación de señal mediante biosensor basado en *lux*.

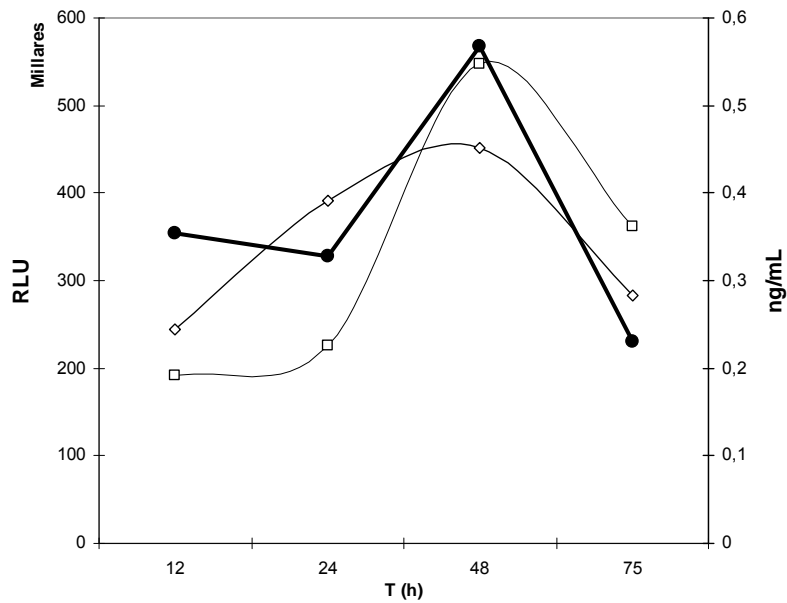


Figura 34. Curvas de producción de C4-HSL por *T. maritimum* NCIMB 2154^T obtenidas a partir de extractos de cultivos en medio FMM o CM. Las cuantificaciones se realizaron en luminómetro con el biosensor *E. coli* JM109 pSB536 (unidades relativas de luz, RLU) o por HPLC-MS (ng/mL). C4-HSL en FMM (-▽-; -●-), C4-HSL en CM (-□-).

Se hipotetizó que la presencia de un pico de producción de C4-HSL a las 48 horas de cultivo de *T. maritimum* NCIMB 2154^T podría estar relacionado con las características de crecimiento de esta especie. Inicialmente *Tenacibaculum maritimum* crece en hilos y agregados formando biopelícula en las paredes y fondo de los matraces y tras 48 horas de cultivo pasa de manera abrupta al medio creciendo de manera densa (Figura 35), una característica de maduración de biopelículas que ha sido correlacionada con procesos de QS. Sin embargo esta característica no fue observada para ninguna de las restantes especies del género *Tenacibaculum* estudiadas a pesar de producir también C4-HSL. Para determinar de modo sencillo si existía algún control por QS de la formación de biopelícula en esta bacteria se añadió C4-HSL en concentración: 1, 2,5, 5 ó 10 $\mu\text{g/mL}$ a matraces de FMM o CM inoculado con *T. maritimum* NCIMB 2154^T. De modo interesante, todas las concentraciones de C4-HSL empleadas redujeron de manera significativa la formación de biopelícula, observable tras tinción con cristal violeta, en comparación con el control (Figura 36).



Figura 35. Biopelícula de un cultivo de 24 horas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T en FMM incubado a 22°C y 110 rpm.

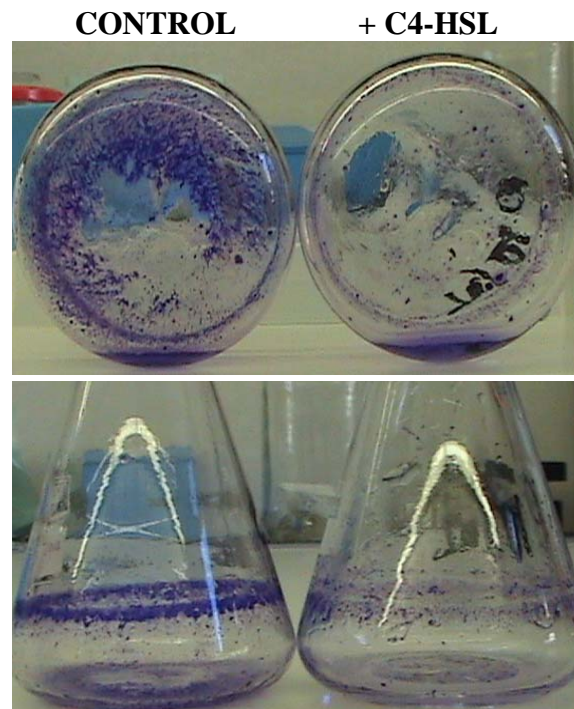


Figura 36. Fotografía mostrando biopelículas de *T. maritimum* NCIMB 2154^T teñidas con cristal violeta adheridas a matraces. En las imágenes se observa la menor producción de biopelícula en medio FMM a 22°C y 110 rpm con adición externa de 10 µg/mL C4-HSL (derecha) con respecto a controles sin adición de C4-HSL (izquierda).

Debido que con anterioridad otros autores trataron sin éxito de detectar la presencia de AHLs en medios de cultivo de otros Bacteroidetes, extrayendo a partir de medio sólido de diferentes cepas de *Flavobacterium psychrophilum* (Bruhn et al., 2005), se utilizó la misma metodología para intentar detectar C4-HSL en FMM sólido y AM de *T. maritimum* NCIMB 2154^T y *Flavobacterium psychrophilum* PT4.1 cultivado en Anacker y Ordal agar. Los extractos obtenidos se analizaron por luminómetro con los biosensores de *E. coli* JM109, observándose activación para *E. coli* JM109 pSB536 en extractos de *T. maritimum* NCIMB 2154^T, mientras que los extractos de *Flavobacterium psychrophilum* PT4.1 activaron el biosensor de señales largas *E. coli* JM109 pSB1075 (No se muestran los datos).

Rodaballo	Muestra	C4-HSL (nmol/Kg)	Recuperación de bacteria
No infectado (n=10)	Sangre	0,00	-
	Bazo	0,00	-
	Riñón	0,00	-
	Hígado	0,00	-
Asintomático (n=8)	Sangre	0,46	+
	Bazo	1,12	+
	Riñón	0,49	+
	Hígado	0,37	+
Moribundo (n=18)	Sangre	0,00	+
	Bazo	0,29	+
	Riñón	0,04	+
	Hígado	0,09	+
Muerto (n=8)	Sangre	0,00	-
	Bazo	1,84	+
	Riñón	0,09	+
	Hígado	1,40	+

Tabla 12. Concentraciones de C4-HSL presentes en tejidos de peces infectados con *T. discolor* DSM 18842 y recuperación de la bacteria. Resultados obtenidos en colaboración con el laboratorio de la Prof. Ysabel Santos.

3.1.9 Detección de AHLs *in vivo*

Con el objetivo de determinar si la señal C4-HSL detectada en cultivos *in vitro* de distintas cepas del género *Tenacibaculum* era también producida *in vivo* en infecciones, se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad con juveniles de rodaballo (25 g) con la cepa patógena *T. discolor* DSM 18842. Se analizaron mediante HPLC-MS extractos acidificados de sangre y tejidos de rodaballos sanos e infectados experimentalmente. Únicamente fue posible detectar el compuesto identificado como C4-HSL en peces inoculados, tanto asintomáticos, como moribundos y muertos (Tabla 12). El perfil de AHL presente en los tejidos no cambió en el tiempo mientras que en sangre sólo pudo detectarse C4-HSL en peces asintomáticos. La mayor concentración de señal se registró en bazo (entre 0,29 y 1,84 nmol/Kg), seguida de hígado (0,09 a 1,40 nmol/Kg) y riñón (0,04 a 0,492 nmol/Kg). Niveles similares de AHLs habían sido detectados también en infecciones experimentales de peces con el patógeno *Vibrio anguillarum* (Buch et al., 2003), en el que el control de factores de virulencia por procesos de QS mediados por AHLs está bien caracterizado.

3.2 Discusión

Aunque todas las bacterias con actividad QQ identificadas en las muestras marinas analizadas eran interesantes, se seleccionó la cepa *T. discolor* 20J por degradar completamente las cinco AHLs probadas inicialmente (C4, C6, C10, C12 y OC12-HSL) y por su rápido crecimiento. Esta cepa fue aislada a partir de la muestra de sedimento de tanque de cultivo de peces (Tabla 7) en medio TSA-I. La capacidad de crecer en este medio la excluiría de *Tenacibaculum discolor* debido a que el único miembro descrito de esta especie crece en medios con sales marinas pero no en medios con NaCl solamente (Piñeiro-Vidal et al., 2008). Esta característica hizo esta cepa aún más interesante pues la hace aplicable a medios terrestres. Aunque la temperatura de aislamiento fue relativamente baja, 15°C, la cepa 20J puede crecer a temperatura ambiente e incluso a 37°C. Otra característica interesante de este aislado es que pertenece al grupo Bacteroidetes, en el que no había sido descrito actividad QQ

previamente y por tanto presentaba más probabilidades de poseer un nuevo tipo de actividad degradadora de AHLs.

La actividad QQ de *T. discolor* 20J fue identificada tanto en ensayo con *C. violaceum* como con *E. coli* JM109, lo que indicaba su alta actividad sobre AHLs, esto fue confirmado en los ensayos de especificidad con señales de tamaño muy diferente (Figura 24) y con sustituciones en el tercer carbono de su cadena lateral (Tabla 7). La acidificación de sobrenadantes tras degradación permitió recuperar en parte las señales cortas (Figuras 24 y 25) lo que indica la presencia de una lactonasa en *T. discolor* 20J que no parece presentar homología con las metalo- β -lactamasas, puesto que no fue posible obtener amplificación específica por PCR con cebadores degenerados con homología para las secuencias conservadas de estas enzimas (Figura 28). Solo se registró actividad lactonasa para AHLs cortas, debido a que no se detectó recuperación de señales largas tras acidificación lo que indica la presencia de una doble actividad degradadora AHLs (Figura 24). Las diferencias en las cinéticas de degradación de ambos tipos de AHL parecen apoyar esta hipótesis, siendo la actividad sobre AHLs largas más intensa (Figura 26). La existencia de varias actividades enzimáticas de QQ en una misma especie ya había sido descrita con anterioridad para *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* PAOI y *Rhodococcus erythropolis* W2 (Zhang et al., 2002; Carlier et al., 2003; Huang et al., 2003; 2006; Uroz et al., 2005; 2008). En el caso de *A. tumefaciens* existen dos actividades enzimáticas de tipo lactonasa (BlcC y AiiB) (Zhang et al., 2002; Carlier et al., 2003) mientras que *P. aeruginosa* presenta dos acilasas (PvdQ y QuiP) (Huang et al., 2003; 2006). Sin embargo en *Rhodococcus erythropolis* W2 la degradación de AHLs se produce por dos tipos diferentes de enzimas, una acilasa (Uroz et al., 2005) y lactonasa (QsdA, Uroz et al., 2008), además de una actividad oxido-reductasa sobre AHLs oxo- sustituidas (Uroz et al., 2005).

La localización de la actividad QQ en *T. discolor* 20J se encuentra principalmente ligada a las células, aunque también se produjo degradación de AHLs por sobrenadantes filtrados de la bacteria, sin embargo esta actividad fue mayor sobre AHLs cortas lo que podría indicar que la bacteria libera la lactonasa al medio extracelular (Figura 27). Esta localización extracelular de enzimas de QQ no es común, pues la mayoría de las lactonasas y acilasas conocidas han sido descritas como citoplásmicas, aunque en el caso de *Streptomyces* sp. ha sido descrita una acilasa

(AhLM) en el medio extracelular (Park et al., 2005) y en la acilasa AiiC de *Anabaena* sp. PCC7120 la existencia de un dominio transmembrana en la zona N-terminal, según la predicción de estructura secundaria de la proteína, indicaría una localización periplásmica de esta acilasa (Romero et al., 2008). La degradación mayoritaria de AHLs cortas por la lactonasa de *T. discolor* 20J es consistente con la capacidad de estas enzimas de degradar un amplio rango de señales, incluida C4-HSL, mientras que las acilasas muestran mayor preferencia por sustrato, siendo generalmente activas únicamente sobre AHLs largas (C10-HSL o mayores) (Czajkowski y Jafra, 2009). En resumen, los datos obtenidos indican que en *T. discolor* 20J la degradación de AHLs largas estaría mediada por las dos actividades enzimáticas distintas mientras que AHLs cortas son degradadas en su mayor parte por una lactonasa, que también actúa extracelularmente.

Cuando se ensayaron distintos miembros del género *Tenacibaculum* se observó que todos presentaban actividad QQ tanto para AHLs largas como cortas, lo que indica que la capacidad degradadora de AHLs está conservada en este género. La excepción fue *T. maritimum* NCIMB 2154^T que no degrada AHLs cortas (Figura 29). Tras acidificación a pH 2 no se recuperaron las AHLs (Figura 30) por lo que en esta especie la actividad lactonasa parece estar ausente, además no hay actividad degradadora en los sobrenadantes de esta bacteria (Figura 29) lo que apoya la liberación extracelular de lactonasa por *T. discolor* 20J.

La degradación inmediata de C12-HSL en *T. discolor* 20J (Figura 26) indica que la actividad QQ en esta bacteria es constitutiva, puesto que no requiere exposición previa a las señales para su expresión. Además debido a que este aislado degrada las AHLs en ensayos con medios ricos como AM o TSA-I, su actividad QQ no parece estar relacionada con la obtención de fuentes de carbono o nitrógeno alternativos como ocurre con *Variovorax paradoxus*, que utiliza el ácido graso de las AHLs como fuente de energía (Leadbetter y Greenberg, 2000). Otro ejemplo es *P. aeruginosa* que utiliza la acilasa PvdQ (Huang et al., 2003) para liberar el ácido graso de las señales, que también utiliza como fuente de energía (Huang et al., 2003). La acilasa PvdQ asegura una fuente de carbono adicional cuando la bacteria crece en un medio pobre en nutrientes y su expresión está inducida o reprimida dependiendo de las condiciones ambientales (Huang et al., 2003). Adicionalmente, *P. aeruginosa* sintetiza otra acilasa denominada

QuiP que controla los procesos de virulencia mediados por QS y a diferencia de PvdQ se expresa constitutivamente (Huang et al., 2006).

La expresión de enzimas degradadoras de moléculas señal por las especies del género *Tenacibaculum* podría jugar un papel como mecanismo de competencia por recursos naturales limitados, como ya ha sido descrito para interacciones entre *Bacillus thuringiensis* y *Erwinia carotovora*. *B. thuringiensis* no produce compuestos que afecten al crecimiento de *E. carotovora*, pero la síntesis de la lactonasa AiiA por parte del Firmicute reduce de manera significativa la adaptabilidad de *E. carotovora* y su capacidad de infección en plantas (Dong et al., 2004). Este ejemplo indica que los sistemas de QS podrían ser inactivados por degradadores de AHLs en el medio ambiente jugando un papel ecológico muy importante en las relaciones bacterianas, tanto simbióticas como patogénicas. Además se ha observado que un mutante de *B. thuringiensis* en *aiiA* es incapaz de colonizar la rizosfera de plantas y su viabilidad se ve reducida de manera significativa (Park et al., 2008). Estos resultados sugieren que la lactonasa AiiA podría estar implicada en mecanismos de competencia para la colonización de rizosferas y ayudaría a la bacteria a sobrevivir en las raíces de plantas. Otra posible función de los enzimas de QQ presentes en *Tenacibaculum* podría estar relacionada con el control y regulación de procesos dependientes de QS mediados por AHL. Debido a que se ha descubierto la presencia de C4-HSL en sobrenadantes de todas las especies del género *Tenacibaculum* analizadas, la actividad QQ en estas bacterias estaría relacionada con la automodulación de los niveles de señal así como un bloqueo de señales externas que pudieran interferir con la comunicación de estos Bacteroidetes. Un mecanismo similar se encuentra en *A. tumefaciens* donde, una de las dos lactonas sintetizadas por esta especie, BlcC, había sido propuesta como integrante de un proceso de control de la conjugación y transferencia del plásmido Ti (Zhang et al., 2002). Para que la conjugación tenga lugar se requiere una alta concentración de AHL, esto es esencial para completar la conjugación y ocurre mientras la población de *A. tumefaciens* se encuentra en expansión. Cuando se alcanza la fase estacionaria la población no aumenta de tamaño y la conjugación, incluso si se produce, no asegura la transferencia de plásmido Ti. Esto ocurre porque cuando se alcanza la fase estacionaria comienza la expresión de BlcC, lo que ocasiona la degradación de AHLs y por tanto la inhibición de la conjugación (Zhang et al., 2002). Sin embargo en estudios posteriores el

efecto de una alta densidad de población sobre la expresión de BlcC no fue confirmado y se ha descubierto que el gen *blcC* forma parte del operón *blcABC*, que presenta actividad sobre γ -butirolactona (GBL) y de hecho le confiere a la bacteria capacidad de crecimiento con GBL como única fuente de carbono (Carlier et al., 2004; Khan y Farrand, 2008). Mientras que los intermediarios del catabolismo de GBL inducen el operón, los intentos de demostrar la inducción del operón por AHLs exógenas han sido fallidos (Carlier et al., 2004; Khan y Farrand, 2008). La degradación de AHLs por BlcC se produce únicamente por expresión constitutiva del gen *blcC* o por inducción de su expresión por adición externa de GBL o sus intermediarios. Estos datos sugieren que GBL es el sustrato principal del operón y la actividad de BlcC sobre AHL podría ser coincidente. Además del controvertido caso de *A. tumefaciens*, existen otros casos en los que se ha demostrado la autorregulación de procesos de QS en *P. aeruginosa* mediante un mecanismo de reducción de estabilidad de LasR mediante la enzima QteE (Siehnel et al., 2010).

Independientemente de las funciones reales de las enzimas de QQ descubiertas se han realizado con éxito estudios de aplicación de estas enzimas para el bloqueo de QS mediado por AHLs en patógenos. La efectividad de las estrategias de QQ se han aplicado principalmente a plantas, como la expresión transgénica por plantas de la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp., obteniéndose plantas de tabaco y patata con resistencia a *E. carotovora* (Dong et al., 2001). Estudios de aplicación de estrategias de QQ también se han mostrado eficaces en patógenos del medio acuático. Como ejemplos podemos citar el uso de consorcios bacterianos con actividad degradadora de AHLs para la protección de *Artemia* sp. contra cepas patógenas de *Vibrio harveyi* (Cam et al., 2009) y la utilización de furanonas naturales para la inhibición de patogenicidad de aislados de *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* sobre *Artemia* (Defoirdt et al., 2006). Tinh et al. (2007) lograron, también con furanonas, neutralizar el efecto negativo de *V. harveyi* sobre rotífero, pero desafortunadamente las furanonas resultaron tóxicas tanto para las artemias como para el rotífero. Los ejemplos anteriores demuestran que las enzimas degradadoras de AHLs junto con los inhibidores de QS podrían ser utilizados con éxito para interferencia con la comunicación bacteriana y el control de infecciones bacterianas. Por tanto el aislado 20J de *T. discolor* podría constituir un candidato prometedor para control de infecciones de patógenos con QS basado en AHL tanto en

medio terrestre como marino. Además este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*. El interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas radica en que al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno, sino a la expresión de los factores de virulencia, no ejercen presión selectiva evitando la aparición de resistencias.

En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biopelículas en estructuras sumergidas tales como jaulas, redes y contenedores; o equipamiento tales como cañerías, bombas, filtros y tanques colectores, y para especies de cultivo, como mejillones, vieiras, ostras, etc. Esta colonización se conoce como biofouling (Railkin, 2004) y afecta a todos los sectores de la acuicultura europea resultando en sustanciales pérdidas económicas. Con frecuencia el QS y la formación de biopelículas están estrechamente relacionados (Nadell et al., 2008). Así, muchas especies, incluido el patógeno *P. aeruginosa*, activan la producción de polisacáridos extracelulares únicamente cuando la población alcanza una alta densidad (Davies et al., 1998; Sakuragi y Kolter, 2007). Estos estudios indican que es posible manipular o bloquear el QS para controlar el biofouling. Un ejemplo es la inhibición de la formación de biopelícula en *V. harveyi* y *V. vulnificus* por la cepa marina degradadora de AHLs *Streptomyces* sp. A66 (You et al., 2007).

La producción de la señal C4-HSL por todas las cepas de *T. maritimum* y las especies de *Tenacibaculum* analizadas (Tabla 11; Figura 31) indica que los mecanismos de QS están conservados en estas especies. Estos resultados contrastan con los obtenidos para el patógeno marino *Aeromonas salmonicida*, que presenta un sistema de QS basado en C4 y C6-HSL, habiéndose demostrado que varias cepas de esta especie no producen AHLs (Bruhn et al., 2005). El máximo de concentración de C4-HSL en muestras de 48 horas alcanzó los 3,5 nM. Estos niveles, aunque bajos, fueron detectables por el biosensor lo que indica que están dentro del rango de producción de AHLs descritos en la bibliografía (entre 0,4 y 400 nM, Kaplan y Greenberg 1985, Schaefer et al., 2002; Burton et al., 2005). Debido a que varias de las especies de *Tenacibaculum* analizadas eran patógenas de peces y en el caso de *T. discolor* DSM 18842 el sistema de quorum sensing mediado por C4-HSL fue funcional *in vivo* en juveniles de rodaballo (Tabla 12), es posible que controle la colonización de tejidos y

patogénesis en la tenacibaculosis. Los niveles de producción de AHL observados en los peces también se encuentran dentro de los rangos normales de producción descritos para otros patógenos (Buch et al., 2003). El sistema de QS en *T. maritimum* también podría controlar el modo de crecimiento en esta especie ya que la adición externa de C4-HSL inhibió la formación de biopelícula característica de esta especie (Figuras 35 y 36). Un comportamiento similar ya había sido observado en el patógeno de humanos *V. cholerae*. Este enteropatógeno comienza la producción de biopelícula inmediatamente tras la adhesión y fijación a una superficie y únicamente bloquea la producción de exopolisacárido cuando se alcanza una alta densidad que implica el umbral de QS de la bacteria. La síntesis de exopolisacárido está controlada por el gen *vps*, cuya expresión puede ser regulada por el homólogo de LuxR en *V. cholerae*, HapR, que lo reprime (Heithoff y Mahan, 2004).

Se habían publicado con anterioridad algunos resultados contradictorios a cerca de la producción de AHLs en el género *Flavobacterium*, también perteneciente al grupo Bacteroidetes. Mientras que había sido detectada actividad tipo AHL en un aislado planctónico de *Flavobacterium* sp., usando el biosensor *E. coli* MT102 con el plásmido pJBA132 basado en *lux* y portador de *luxR* de *V. fischeri* como sensor de AHLs, la presencia de AHLs no pudo ser demostrada por metodología GC-MS (Wagner-Döbler et al., 2005). Tampoco se detectó producción de AHLs en *F. psychrophilum* utilizando los biosensores *C. violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (Bruhn et al., 2005). En el presente trabajo se detectó AHL cuando se analizaron extractos de *F. psychrophilum* con el biosensor de AHLs largas *E. coli* JM109 pSB1075. Las diferencias en las observaciones están, probablemente, relacionadas con la metodología de ensayo y los biosensores utilizados. En nuestra experiencia, los resultados basados en evaluación directa de medios de cultivo de bacterias marinas, frecuentemente CM, deben de ser interpretados con precaución ya que la composición de este medio de cultivo podría inhibir el crecimiento o emisión de bioluminiscencia de estos biosensores, que son fundamentalmente de origen terrestre. Además, como ha sido demostrado en este trabajo, existe influencia de los medios de cultivo sobre el perfil de producción de las AHLs (Figura 32). Otros factores también influyen en la detección de las AHLs, como el pH de los cultivos o la temperatura y podrían explicar que las AHLs no hayan sido detectadas por otros autores en este grupo (Yates et al., 2002). Por otro

lado, debido a la capacidad de diferentes compuestos de activar los biosensores de AHLs (Holden et al., 1999), los resultados positivos deben ser confirmados por métodos analíticos.

Aunque los procesos fisiológicos bajo control de QS en *Tenacibaculum* deben ser investigados en mayor profundidad, la producción de C4-HSL en este género junto con la reciente detección de AHLs en aislados de biopelícula marina pertenecientes a Bacteroidetes (Huang et al., 2008), extiende el paradigma de sistemas de QS mediado por AHLs más allá de Proteobacterias. Debido a que los procesos controlados por señales de tipo AHL habían sido descritos únicamente en un número limitado de géneros de α -, β - y γ -Proteobacterias, muchos de ellos patógenos (Williams et al., 2007), la significación ecológica de los sistemas de QS había sido cuestionada como un factor clave de regulación de la expresión génica dentro de las poblaciones bacterianas en la naturaleza (Manefield y Turner, 2002). El hecho de que géneros fuera de Proteobacteria produzcan las mismas moléculas señal, y que existan mecanismos de degradación en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, Cianobacterias (Dong y Zhang, 2005; Romero et al., 2008), Bacteroidetes (Romero et al., 2010) y células de mamífero (Chun et al., 2004); refuerza la importancia ecológica de los procesos de QS mediados por AHL.

La existencia de AHLs fuera de Proteobacterias no es un resultado sorprendente ya que un estudio filogenético de los genes *luxI* y *luxR* sugirió que los mecanismos de QS se establecieron muy pronto en la evolución bacteriana, aunque la transferencia horizontal pudo haber jugado un papel importante en la distribución de estos genes (Lerat y Moran, 2004). Por tanto la clonación de los genes responsables de la síntesis y detección de C4-HSL en el género *Tenacibaculum* aportará sin duda nueva información para entender la historia evolutiva del QS.

Por primera vez ha sido demostrada simultáneamente en miembros del grupo Bacteroidetes, la producción de AHL y presencia de actividad QQ, incluidos representantes patógenos. Debido a la importancia ecológica de este clúster, especialmente en el ambiente marino, el descubrimiento de procesos de QS mediados por AHL en sus miembros permitirá avanzar en la comprensión de las interacciones microbianas en estos complejos ecosistemas. Además, los fenómenos de comunicación bacteriana deberán ser considerados en otros hábitats en los que los Bacteroidetes

Resultados y Discusión

también juegan un papel importante, como la flora intestinal o la placa dental. En el caso de las cepas patógenas, el descubrimiento de estos procesos abre una nueva vía para el tratamiento de estas enfermedades.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1) El quorum quenching (QQ) podría ser una actividad de elevada prevalencia en el medio marino entre las bacterias cultivables, como demuestra la elevada frecuencia de aislados con capacidad de degradación enzimática de señales de quorum sensing (QS) tipo AHL, obtenidos tanto de comunidades bacterianas costeras como de muestras de agua de mar. De un total de 630 bacterias aisladas, 109 presentaban actividad enzimática degradadora al menos sobre una de las AHLs probadas, lo que representa un 17,3% del total de los aislados analizados, porcentaje casi un orden de magnitud más elevado que el descrito para aislados de suelo.

2) Sólo ha sido posible identificar un aislado capaz de antagonizar la actividad AHL sin degradarla, aunque esta actividad debe ser todavía caracterizada. Sin embargo, la elevada concentración de AHL utilizada en los bioensayos para la detección de actividad QQ no permite concluir que la producción de inhibidores de procesos de QS mediados por AHLs sea un proceso poco común en el medio marino.

3) El medio de cultivo y la temperatura no afectan al número de bacterias aisladas con actividad QQ, mientras que el origen de la muestra afecta fuertemente a la actividad, siendo mayor en el alga *Fucus vesiculosus* (39,4% de especies activas) y en muestras de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad (27,7 y 21,7% respectivamente). Parece existir una correlación negativa entre el número de UFCs/mL y el porcentaje de cepas con actividad QQ en las muestras analizadas.

4) Se han identificado 19 aislados capaces de degradar un amplio espectro de AHLs, 15 de ellos de comunidades bacterianas densas y 4 de agua de mar, en su mayoría pertenecientes a géneros estrictamente marinos. Además de ser más frecuentes, los aislados con actividad QQ de amplio espectro presentaron una mayor variabilidad taxonómica entre los aislados de comunidades bacterianas costeras, perteneciendo a 10 géneros encuadrados en los phyla α -; γ -Proteobacteria (6, incluyendo una nueva especie próxima a *Phaeobacter*); Actinobacteria (1); Firmicutes (2) y Bacteroidetes (1). Los aislados de agua de mar pertenecieron a γ -Proteobacteria (1) y Bacteroidetes (2), incluyendo una nueva especie próxima a *Maribacter*.

5) Existe una fuerte discrepancia entre el número de aislados con actividad QQ en aguas marinas y la frecuencia de las secuencias homólogas a enzimas de QQ conocidos en metagenomas del medio marino. Esta discrepancia puede ser atribuida a la baja homología existente entre secuencias de enzimas de QQ, a la existencia de actividades enzimáticas todavía no descritas y/o a la metodología utilizada para la construcción de librerías metagenómicas, que excluiría las bacterias asociadas a materia particulada.

6) La caracterización de la actividad QQ del aislado 20J, obtenido de la muestra de sedimento de tanque de cultivo de peces e identificado como *Tenacibaculum discolor* (99% ID), revela que esta cepa presenta dos tipos de actividad de tipo enzimático, siendo una de ellas una lactonasa que se excreta al medio de cultivo. La enzima lactonasa es más activa sobre AHLs de cadena corta. Esta actividad QQ de amplio espectro sobre AHLs está conservada en las especies del género *Tenacibaculum*, con la excepción de *T. maritimum* NCIMB 2154^T que únicamente degrada AHLs largas.

7) Miembros del género *Tenacibaculum*, pertenecientes al phylum Bacteroidetes, producen C4-HSL. Esta AHL podría controlar el modo de crecimiento en biopelícula de *T. maritimum* NCIMB 2154^T y puede ser detectada *in vivo* en el patógeno *T. discolor* DSM 18842.

1) Quorum quenching (QQ) could be a common activity among cultivable marine bacteria, as demonstrated by the high frequency of AHL-signals degradation activity found among coastal and open ocean marine bacteria isolates. Out of 630 bacterial isolates, 109 were confirmed as being able to enzymatically degrade at least one of the AHLs tested, which represents a 17.3% of the analysed isolates. This percentage is almost an order of magnitude higher than that reported for soil bacteria isolates.

2) Only one of the selected isolates was able to antagonize the AHL activity without enzymatic degradation, although this activity is still to be characterized. Nevertheless, the high concentration of AHL used in the bioassays for the detection of QQ activity does not allow to categorically conclude that the production of inhibitors of AHL mediated QS processes is not a common process in the marine environment.

3) The culture media and temperature had no effect on the number of QQ active bacteria. On the contrary, a strong effect of the origin of the sample was found, being higher for *Fucus vesiculosus* surface sample (39.4%) and in open ocean samples of 0 and 10 meters depth (27.7 and 21.7% respectively). A negative correlation among number of CFUs and percentage of QQ strains seems to be present in the analysed samples.

4) 19 new marine isolates capable of degrading a wide-spectrum of AHLs were identified from dense marine communities (15) and sea-water (4), almost all of them belonging to strictly marine genera. Besides being more frequent, wide-spectrum QQ isolates from coastal bacterial communities presented a higher taxonomic diversity, belonging to 10 genera located within the phyla α -; γ -Proteobacteria (6, including a new species close to *Phaeobacter*); Actinobacteria (1); Firmicutes (2) and Bacteroidetes (1). Sea-water isolates belonged to the γ -Proteobacteria (1) and Bacteroidetes (2), including a new species related with *Maribacter*.

5) A strong discrepancy was observed in the number of marine isolates with QQ activity and the frequency of sequences homologous to known QQ enzymes found in marine metagenomic collections. This discrepancy could be explained on the basis of the low

homology among QQ enzymes sequences, the existence of unknown enzymatic activities and/or the methodology used for the construction of metagenomic libraries, which excludes bacteria associated to marine particulated-matter.

6) The characterization of the QQ activity in the strain 20J, isolated from the sediment of a fish tank and identified *Tenacibaculum discolor* (99% ID), revealed that this strain has two different enzymatic activities, one of them being a lactonase which is secreted into the media. The lactonase enzyme is more active against short chain AHLs. The wide QQ activity against AHLs is conserved among species of the genus *Tenacibaculum*, except for *T. maritimum* NCIMB 2154^T that only degrades long chain AHLs.

7) Members of the genus *Tenacibaculum*, belonging to the phylum Bacteroidetes, produce C4-HSL. This AHL could be involved in controlling the mode of growth of *T. maritimum* NCIMB 2154^T biofilm and could also be detected *in vivo* in the pathogenic strain *T. discolor* DSM 18842.

RESUMEN/SUMMARY

“Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo *N*-acilhomoserín lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino”

La detección de quorum o “quorum sensing” (QS) describe la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante la regulación de la expresión genética, siendo así capaz de desarrollar un comportamiento social coordinado. Las bacterias comunican su presencia a las demás usando pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores (AIs) o feromonas. Los sistemas de QS intervienen en el control de muchas otras funciones fisiológicas bacterianas, entre las que se encuentra: la producción de antibióticos, la liberación de factores de virulencia, la transferencia conjugacional de plásmidos, el crecimiento en “enjambre” (“swarming”), la formación de endosporas o maduración de biopelículas.

Las señales de QS mejor conocidas son las Acil-homoserín lactonas (AHLs), basadas en un anillo lactona (HSL) al que se une, mediante enlace amida, un ácido graso que constituye la cadena lateral. Poseen una elevada diversidad conformacional, difiriendo en la longitud de cadena lateral, que normalmente contiene entre 4 y 18 carbonos, saturada o insaturada y con o sin sustituciones oxo- o hidroxil- en el tercer carbono. Se ha especulado con que las AHLs fueran producidas exclusivamente por un número relativamente bajo de especies pertenecientes a α -, β - y γ -Proteobacterias, pero recientemente ha sido descrita la presencia de estas señales en otros phyla, como en la cianobacteria colonial *Gloeotheca* y en miembros de Bacteroidetes, lo que refuerza la importancia del papel de los sistemas de QS mediados por AHLs en las poblaciones naturales.

Debido a que la comunicación bacteriana juega un papel crítico en la regulación de numerosas funciones fisiológicas microbianas, incluyendo las relacionadas con la patogenicidad en especies que afectan a plantas y animales, existe un enorme interés en el diseño e implementación de estrategias de inactivación de los sistemas de QS, también denominadas, de forma genérica, “quorum quenching” (QQ), que puedan funcionar como nuevas fórmulas de lucha antimicrobiana. El interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas radica en que al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno, sino a la expresión de los factores de virulencia, no ejercen presión selectiva, evitando por lo tanto la aparición de

resistencias. Aunque la inactivación de otros sistemas de QS es igualmente interesante, hasta el momento los sistemas de QQ mejor conocidos se refieren a la inactivación de las señales tipo AHL. Existen varios tipos de estrategias de QQ posibles, que incluyen: a) la inhibición de la generación de señal AHL, b) el bloqueo de la diseminación de la señal y c) la inhibición de la recepción de la AHL. Hasta la fecha las estrategias más estudiadas han sido el bloqueo de la diseminación de la señal y la inhibición de la recepción de AHLs.

En cuanto al bloqueo de la diseminación de la señal, una de las estrategias se basa en la degradación enzimática de las señales AHL. La estructura química de las AHLs implica que su degradación enzimática podría ocurrir mediante cuatro reacciones diferentes. Dos de ellas implicarían la rotura del anillo HSL y estarían mediadas por enzimas lactonasa o descarboxilasa. Las otras dos separarían el ácido graso del anillo HSL mediante la acción de una acilasa o una deaminasa. Únicamente dos de los cuatro tipos de enzimas mencionados han sido identificados hasta la fecha: lactonasas y acilasas. Estas enzimas han sido descritas en bacterias pertenecientes a diferentes phyla, tanto Gram-negativas como Gram-positivas.

El bloqueo de la transducción de la señal de QS se puede lograr por la presencia de un antagonista de la AHL capaz de competir o interferir con la unión de la señal a su receptor. Los antagonistas competitivos serían lo suficientemente similares, estructuralmente, a las AHLs para permitir su unión al receptor pero no activarían la transducción de señal posterior. De hecho, las AHLs pueden funcionar como antagonistas competitivos de otras AHLs de tamaño de cadena lateral muy distinto. Los antagonistas no competitivos mostrarían baja o ninguna similitud estructural con las AHLs, ya que se unirían a sitios distintos del receptor. En la actualidad están descritos antagonistas de ambos tipos en bacterias y organismos eucariotas.

A pesar de que los procesos de QS y QQ fueron descubiertos originalmente en el medio marino, se ha prestado poca atención a la importancia ecológica de estos mecanismos en mar. Las bajas densidades encontradas en las poblaciones bacterianas de alta mar y la baja estabilidad de las AHLs en este medio, han llevado a sugerir que los procesos de QS mediados por AHLs podrían reducirse a microhábitats específicos como las biopelículas, “nieve marina” y nichos eucariotas. Sin embargo existen otras evidencias que demuestran que el QS mediado por AHL es frecuente en el medio

marino, detectándose actividad AHL en cerca de un 60% de las α -Proteobacteria aisladas de diferentes muestras marinas, incluyendo especies planctónicas y bacterias asociadas a algas. Las señales AHL parecen también tener un papel importante en las interacciones entre eucariotas y procariotas en el hábitat marino, como demuestra la necesidad de presencia de AHLs para la selección de superficies con biopelículas bacterianas para la fijación permanente de zoosporas del alga verde *Ulva*, para la liberación de esporas del alga roja *Acrochaetium* sp. y para el asentamiento inicial de larvas en el poliqueto *Hydroides elegans*. Además, la producción de AHLs es habitual en bacterias patógenas de peces incluyendo: *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* o *Edwardsiella tarda*. Debido a que estas señales controlan la expresión de importantes factores de virulencia en estos patógenos, la posibilidad del uso de procesos de inhibición de QS se ha propuesto como alternativa a la utilización de antibióticos para el control de infecciones en acuicultura.

Los principales objetivos de este trabajo fueron:

- a) Estudiar la existencia y frecuencia de bacterias cultivables capaces de interferir, enzimáticamente o mediante la producción de antagonistas, con sistemas de quorum sensing mediados por AHLs en diferentes hábitats marinos:
 - Comunidades bacterianas marinas expuestas a una elevada carga orgánica: sedimento de tanque de cultivo de peces, biopelícula de tanque reservorio de agua de mar filtrada (25.000 L) y el alga *Fucus vesiculosus*.
 - Muestras agua de mar de estuario y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad.
- b) Caracterización de la actividad de aislados obtenidos con alta actividad QQ contra AHLs para evaluar su potencial uso biotecnológico.

Para la detección de bacterias marinas con actividad QQ sobre AHLs se procedió al aislamiento de cepas, a 15 y 22°C, con medios sólidos con alta concentración de nutrientes como: agar de triptona y soja con 1% NaCl (TSA-I) y agar marino (AM) y también medios con baja concentración de nutrientes como: agar marino en dilución 1/100 (AM 1/100), agua de mar filtrada y autoclavada (FAS), suplementada con 1 g/L de casaminoácidos (FAS CAS) y medio FAS suplementado con 0.5 g/L de los

polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL). Para la detección de actividad QQ, se expusieron cultivos de cada aislado a AHLs de diferente tamaño; una *N*-Hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL) y *N*-Decanoil-L-homoserín lactona (C10-HSL) y se comprobó la actividad de las moléculas señal mediante los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07 en ensayo en medio sólido. Se comprobó por HPLC-MS si las cepas activas contra AHLs presentaban actividad enzimática degradadora de señales. Para ello se utilizaron las señales C4 y C12-HSL.

Se obtuvieron un total de 630 aislados para los hábitats de medio marino seleccionados. De las 166 cepas aisladas de comunidades bacterianas densas, 85 cepas procedieron de sedimento de tanque de cultivo de peces, 48 de biopelícula de tanque y 33 del alga *F. vesiculosus*. De las cepas obtenidas de las muestras de agua, 132 procedían de agua de mar de estuario, 166 de agua de océano a 0 metros de profundidad y 166 a 10 metros de profundidad. Aproximadamente la mitad de los aislados seleccionados para la búsqueda de actividad QQ se obtuvieron en los medios más ricos: TSA-I y AM, debido a la mayor variabilidad de colonias observada.

En el ensayo con *C. violaceum* CV026 se identificaron 109 cepas con actividad QQ contra C6-HSL (24 procedentes de comunidades bacterianas densas y 85 a muestras de agua de mar), lo que representó un 17,3% de las cepas aisladas. Este porcentaje es mucho mayor que los porcentajes obtenidos en otros estudios para muestras de suelo y plantas (alrededor del 2%) lo que indica que el QQ es un proceso común entre las bacterias marinas cultivables aisladas de ambientes marinos. De las 109 cepas activas frente C6-HSL, 100 presentaron actividad sobre C10-HSL en bioensayo con *C. violaceum* VIR07 (15 procedentes de comunidades bacterianas densas y 85 a muestras de agua de mar). El 50% de las cepas activas se aislaron a 22°C y por tanto el efecto de la temperatura sobre el aislamiento de bacterias con actividad QQ no fue significativo. Aunque se esperaba un fuerte efecto del medio de cultivo utilizado sobre el número de cepas con actividad QQ obtenido, tal efecto no pudo ser confirmado ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios utilizados para el aislamiento de cepas con actividad QQ. Uno de los resultados más llamativos es que todos los aislados degradaron activamente las AHLs incluso en medio rico en nutrientes (CM) en el que están disponibles otras fuentes de carbono, indicando que la capacidad de degradar las señales no es meramente una actividad metabólica dirigida a la

obtención de energía, sino una actividad enzimática expresada de forma constitutiva, incluso en presencia de otras fuentes de carbono, que probablemente les confiere una ventaja adaptativa sobre los competidores. Por el contrario, se observaron importantes diferencias en el aislamiento de cepas con actividad QQ dependiendo de la muestra utilizada. Las muestras con mayor porcentaje de aislamiento de cepas capaces de degradar AHLs fueron la de superficie de *F. vesiculosus* (39,4%) y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad (27,7 y 21,7% respectivamente), pudiéndose detectar una cierta correlación negativa entre el número de UFCs de la muestra y el porcentaje de aislados con actividad QQ.

El tipo de actividad de QQ de las cepas capaces reducir significativamente la actividad de C6 y C10-HSL en los bioensayos se analizó mediante HPLC-MS, análisis que permite detectar la degradación enzimática de las señales. La acidificación de los medios de cultivo tras el ensayo de degradación permitió también la identificación de posibles actividades lactonasa en las cepas, ya que el anillo lactona puede ser recircularizado a pHs bajos. De las 100 cepas analizadas, 19 fueron capaces de reducir significativamente la concentración de C4 y C12-HSL cuantificada por HPLC-MS, siendo identificadas mediante amplificación y secuenciación parcial de genes de ARN ribosómico 16S. Las muestras procedentes de comunidades bacterianas densas presentaron una mayor diversidad taxonómica y un mayor porcentaje de aislados activos de amplio espectro que las muestras de agua de mar. De éstos, siete procedieron de muestra de *F. vesiculosus* siendo identificados como *Hyphomonas* sp. (Cepa 2), *Stappia* sp. (Cepas 5 y 176), *Alteromonas* sp. (Cepa 168), *Oceanobacillus* sp. (Cepa 172), *Rhodococcus erythropolis* (Cepa 173) y una nueva especie próxima a la α -proteobacteria *Phaeobacter* (Cepa 177). Otros siete aislados de amplio espectro procedieron de sedimento de tanque: *Tenacibaculum discolor* (Cepa 20J), *Bacillus circulans* (Cepa 24), *Oceanobacillus* sp. (Cepas 30 y 97-2), *Halomonas taeanensis* (Cepa 33), *Rhodococcus erythropolis* (Cepa 50) y *Stappia* sp. (Cepa 97-1). Se aisló una sola cepa con actividad de amplio espectro de la muestra de biopelícula de tanque de agua de mar, siendo identificada como *Roseovarius aestuarii* (Cepa 61). En cuanto a las cuatro cepas con actividad de amplio espectro aisladas de muestras de agua, tres de ellas procedían de agua de océano de 10 metros de profundidad, siendo identificadas como *Salinicola salarii* (Cepas 131 y 160) y como una nueva especie próxima a *Maribacter*

(Cepa 139). Por último, la única cepa con este tipo de actividad aislada de agua de mar de estuario fue identificada como *Olleya marilimosa* (Cepa 138E). Casi todos los aislados marinos activos de amplio espectro pertenecen a géneros exclusivamente marinos, excluyendo un posible origen terrestre de las cepas, a pesar del carácter costero de algunas de las muestras. Únicamente tres de los aislados pertenecen a géneros (*Bacillus* y *Rhodococcus*) en los que habían sido descritos previamente representantes terrestres con actividad QQ.

La metodología de búsqueda de actividad QQ utilizada en este trabajo evitó el uso de cultivos de enriquecimiento, basados en la capacidad de crecimiento de los aislados en medios con AHLs como única fuente de carbono y nitrógeno, que han sido usados en la mayoría de estudios precedentes. Esta metodología permitió no sólo estimar la prevalencia y significación ecológica de los procesos de QQ en las muestras marinas seleccionadas, sino que además, se pudo obtener un aislado bacteriano con posible actividad inhibidora de AHLs no mediada por actividad enzimática (cepa 147).

En contraste con la alta actividad QQ encontrada entre las cepas marinas cultivables, la búsqueda en los metagenomas marinos disponibles reveló una sorprendente baja abundancia de secuencias homólogas a las acilasas y lactonasas conocidas cuando se aplicaron los porcentajes de homología más restrictivos (50% de similitud para el 70% del tamaño de la secuencia). La diferencia entre las actividades QQ en los aislados marinos y la frecuencia obtenida en genes de metagenomas marinos se explicaría por el número limitado de secuencias de las que disponemos para enzimas degradadoras de AHLs. Existe además una baja homología entre las secuencias de las enzimas de QQ de una misma familia, lo que hace necesario reducir los porcentajes de similitud en las búsquedas en genomas bacterianos para englobar todas las especies cuyos enzimas han sido clonados. La reducción de los parámetros restrictivos en la búsqueda produce un importante incremento en la cantidad de secuencias con posible actividad acilasa o lactonasa en las colecciones metagenómicas, disminuyéndose la discrepancia con los resultados de actividad obtenidos en las bacterias cultivables.

Otro resultado significativo derivado del análisis de metagenomas marinos es la clara divergencia encontrada entre la distribución espacial de lactonasas y acilasas. Las lactonasas presentan homología con la familia de β -lactamasas pero parecen ser enzimas altamente específicas sin o con baja actividad sobre otras moléculas, aunque en

algún caso su presencia ha sido relacionada con el metabolismo de γ -butirolactonas (GBLs), como en *Agrobacterium tumefaciens*. Por otro lado, las acilasas presentan homología con acilasas de cefalosporinas, hidrolasas *N*-terminales (Ntm) y en algunos casos son capaces de catalizar la hidrólisis de Penicilina G, como la acilasa AhIM de *Streptomyces* sp. Debido a estas diferencias de especificidad entre los dos tipos procariontes de enzimas degradadoras de AHLs descritos hasta la actualidad, se puede hipotetizar con que la mayor abundancia de las acilasas, degradadoras de AHLs en las muestras de metagenomas costeros, es el reflejo de un ambiente más rico y complejo en el que las acilasas podría actuar como interceptadores de QS mediado por AHLs, así como con otras funciones como defensa contra la producción de antibióticos por competidores.

La búsqueda de genes de QQ en los genomas bacterianos secuenciados disponibles en las bases de datos con la metodología menos restrictiva (30% de similitud para el 70% del tamaño de la secuencia), reveló la presencia de secuencias homólogas en varias de las especies con QQ identificadas en este trabajo. En algunos casos, como en las cepas de *Stappia* sp., que presentaron una clara actividad lactonasa, la secuencia obtenida de los genomas del género secuenciados coincidió con los resultados preliminares del análisis por HPLC-MS. Por el contrario, en el caso de *Oceanobacillus* spp., los análisis por HPLC-MS indicaron la presencia de actividad tipo lactonasa, mientras que sólo se detectó una secuencia homóloga a acilasas conocidas en el genoma. La clonación de las enzimas responsables de la actividad QQ en estos nuevos aislados extenderá muy probablemente nuestro conocimiento sobre la variabilidad y modos de acción de estas enzimas y permitirá una interpretación ecológica más completa de los procesos de QQ, incluyendo las bacterias marinas no cultivables, derivada de búsquedas más precisas en metagenomas. Además, una caracterización profunda de estos aislados y de sus actividades podría conducir al desarrollo de herramientas biotecnológicas para el tratamiento y prevención de infecciones en las que intervienen procesos de QS mediados por AHLs, especialmente en el campo de la acuicultura.

Aunque gran parte de las bacterias con actividad QQ de amplio espectro identificadas en las muestras marinas analizadas eran interesantes, para un estudio en mayor profundidad se seleccionó la cepa *T. discolor* 20J por su rápido crecimiento y por

degradar completamente las cinco AHLs testadas inicialmente (C4, C6, C10, C12 y OC12-HSL). Esta cepa fue aislada a partir de la muestra de sedimento de tanque de cultivo de peces en medio TSA-I. La capacidad de crecer en este medio la excluiría de la especie *T. discolor* debido a que el único miembro descrito de esta especie crece en medios con sales marinas pero no en medios con NaCl solamente. Esta característica hizo esta cepa aún más interesante pues la hace aplicable a medios terrestres. Aunque la temperatura de aislamiento fue relativamente baja, 15°C, *T. discolor* 20J puede crecer a temperatura ambiente e incluso a 37°C. Otra característica interesante de este aislado es que pertenece al phylum Bacteroidetes, en el que no había sido descrito actividad QQ previamente y por tanto presentaba más probabilidades de poseer un nuevo tipo de actividad degradadora de AHLs.

La actividad QQ de *T. discolor* 20J fue altamente inespecífica, siendo capaz de degradar AHLs de tamaño muy diferente y con sustituciones en el tercer carbono de su cadena lateral. La acidificación de sobrenadantes tras degradación permitió recuperar en parte las señales cortas lo que indica la presencia de una lactonasa en *T. discolor* 20J. Esta lactonasa no parece presentar homología con las metalo- β -lactamasas, puesto que no fue posible obtener amplificación específica por PCR con cebadores degenerados con homología para las secuencias conservadas de estas enzimas. Solo se registró actividad lactonasa para AHLs cortas debido a que no se detectó recuperación de señales largas tras acidificación, lo que indica la presencia de una doble actividad degradadora AHLs. Las diferencias en las cinéticas de degradación de ambos tipos de AHL parecen apoyar esta hipótesis, siendo la actividad sobre AHLs largas más rápida. La actividad QQ en *T. discolor* 20J se encuentra principalmente ligada a las células, aunque también se produjo degradación de AHLs por sobrenadantes filtrados de la bacteria, sin embargo esta actividad fue mayor sobre AHLs cortas lo que podría indicar que la bacteria libera la lactonasa al medio extracelular. La localización extracelular de enzimas de QQ no es común, pues la mayoría de las lactonasas y acilasas conocidas han sido descritas como citoplásmicas. La degradación mayoritaria de AHLs cortas por la lactonasa de *T. discolor* 20J es consistente con la capacidad de estas enzimas de degradar un amplio rango de señales, incluida C4-HSL, mientras que las acilasas muestran mayor preferencia por sustrato, siendo generalmente activas únicamente sobre AHLs largas (C10-HSL o mayores). Esta es la primera vez que un Bacteroidete marino

con actividad QQ es aislada, identificada y se caracteriza su actividad degradadora de AHLs.

Cuando se ensayaron otros miembros del género *Tenacibaculum* se observó que todos presentaban actividad QQ tanto para AHLs largas como cortas, lo que indica que la capacidad degradadora de AHLs está conservada en este género. La excepción fue *T. maritimum* NCIMB 2154^T que sólo degrada AHLs largas. Tras acidificación a pH 2 no se recuperaron las AHLs por lo que en esta especie la actividad lactonasa parece estar ausente. Además, no se detectó actividad degradadora en los sobrenadantes de cultivos de esta bacteria lo que apoya la liberación extracelular de una lactonasa en *T. discolor* 20J. Una posible función de los enzimas de QQ presentes en *Tenacibaculum* podría estar relacionada con el control y regulación de procesos dependientes de QS mediado por AHL. Debido a que se ha descubierto la presencia de C4-HSL en sobrenadantes de todas las especies del género *Tenacibaculum* analizadas, la actividad QQ en estas bacterias estaría relacionada con la automodulación de los niveles de señal así como un bloqueo de señales externas que pudieran interferir con la comunicación de estos Bacteroidetes. La producción de la señal C4-HSL en las especies de *Tenacibaculum* analizadas, incluidas distintas cepas de *T. maritimum*, indica que los mecanismos de QS están conservados en este género. El máximo de concentración de C4-HSL en muestras de 48 horas alcanzó los 3,5 nM. Estos niveles, aunque bajos, fueron detectables por biosensor lo que indica que están dentro del rango de producción de AHLs descritos en la bibliografía (entre 0,4 y 400 nM). Debido a que varias de las especies de *Tenacibaculum* analizadas son patógenas de peces y en el caso de *T. discolor* DSM 18842 el sistema de quorum sensing mediado por C4-HSL fue funcional *in vivo* en juveniles de rodaballo, es posible que la producción de AHLs controle la colonización de tejidos y patogénesis en la tenacibaculosis. Los niveles de producción de AHL observados en los peces también se encuentran dentro de los rangos normales de producción descritos para otros patógenos. Aunque los procesos fisiológicos bajo control de QS en *Tenacibaculum* deben ser investigados en mayor profundidad, la producción de C4-HSL en este género junto con la reciente detección de AHLs en aislados de biopelícula marina pertenecientes a CFB, extiende el paradigma de sistemas de QS mediado por AHLs más allá de Proteobacterias.

Por primera vez ha sido demostrada simultáneamente en miembros del phylum Bacteroidetes, la producción de AHL y presencia de actividad QQ, incluidos representantes patógenos. Debido a la importancia ecológica de este clúster, especialmente en el ambiente marino, el descubrimiento de procesos de QS mediados por AHL en sus miembros permitirá avanzar en la comprensión de las interacciones microbianas en estos complejos ecosistemas. Además, los fenómenos de comunicación bacteriana deberán ser considerados en otros hábitats en los que los Bacteroidetes también juegan un papel importante, como la flora intestinal o la placa dental. En el caso de las cepas patógenas, el descubrimiento de estos procesos abre una nueva vía para el tratamiento de estas enfermedades.

“Isolation of marine bacteria capable of intercepting bacterial communication mediated by *N*-acylhomoserine lactone (AHLs) signals”

The term Quorum sensing (QS) was coined to describe the ability of bacteria to perceive and respond to population density for the collective regulation of gene expression, allowing social coordinated behaviors. Bacteria communicate using small chemicals called autoinducers (AIs) or pheromones. The QS systems can control many important biological functions such as: antibiotic biosynthesis, virulence, plasmid conjugal transfer, swarming, endospores formation or biofilm differentiation.

The best studied QS signaling system involves *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), that are constituted by an acyl chain *N*-bound to a homoserine lactone ring (HSL). These signals differ in the acyl side chain, which usually contains between 4 and 18 carbons in length, with or without saturation or C3 oxo- or hydroxy- substitutions. AHLs have been described as being exclusively produced by a relatively small number of α -, β - and γ -Proteobacteria, but recently the production of these signals has been also reported for the colonial cyanobacterium *Gloeotheca* and for several members of the phylum Bacteroidetes, which may reinforce the role of QS systems in the natural bacterial populations.

Since bacterial communication plays a key role in the control of many physiological functions in bacteria, including virulence on plants and animals, there is great interest in the design and implementation of systems to inactivate QS, a process also called Quorum quenching (QQ), that could function as a new antipathogenic strategy. One of the major interests of the QQ approach is that it blocks the expression of the virulence factors but it does not exert selective pressure as it does not affect the pathogen survival, therefore avoiding the appearance of resistances. Although the inactivation of all QS systems is equally interesting, the QQ of AHLs is the best known to date. The blockage of AHL-mediated QS systems can be achieved by either a) interfering with the biosynthesis of AHLs, b) interfering with the signal dissemination or c) antagonize AHL reception. The most studied of these strategies are the interference with the dissemination of the signals and the antagonism of AHL reception.

The interference with the signal dissemination can be achieved by enzymatic degradation of AHL signals. The chemical structure of AHLs suggests that the degradation of such molecules may occur in four different ways. Two of them lead to

the degradation of the HSL ring mediated by a lactonase or decarboxylase. Two other pathways would cause cleavage of AHL to HSL ring and a free fatty acid and would be mediated by an acylase or a deaminase. Only two groups of AHL-degrading enzymes of the four mentioned above have been identified so far: lactonases and acylases. These enzymes have been described in Gram-negative and positive bacteria from different phyla.

The QS signal transduction can be also blocked by receptor antagonists, which compete with AHL and/or interfere with the union of the signal and receptor. Competitive antagonists are structurally similar to AHLs being able to bind the receptor but do not elicit the subsequent biological response. In fact, some AHLs can act as competitive antagonists by binding a non-cognate receptor. Non-competitive antagonists are not structurally related to AHLs and would bind to different sites of the receptor. Both types of antagonists have been already described in bacteria and eukaryotes.

Although QS and QQ processes were both discovered in marine organisms, little attention has been paid so far to their ecological significance in the marine environment. The low bacterial population encountered in the open sea and the low chemical stability of AHLs in seawater have led to the suggestion that the AHL-mediated QS activity may be concentrated in specific micro-habitats such as biofilms, marine snow and eukaryotic niches. However evidence is beginning to accumulate on the importance of AHL-mediated QS processes in the sea. Almost 60% of the α -Proteobacteria isolated from different marine samples, including free-living and algae-associated strains, were able to activate AHL sensor strains. AHLs also seem to have an important role in the eukaryotic-prokaryotic interactions in the marine environment, as demonstrated by the importance of the presence of AHLs for selection of surface sites with bacterial biofilm for permanent attachment of zoospores of the green alga *Ulva*, for spores liberation of the red alga *Acrochaetium* sp. and for some initial larval settlement behaviours in the polychaete *Hydroides elegans*. Moreover, the production of AHLs is common among marine fish pathogenic bacteria including: *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* or *Edwardsiella tarda*. Due to the prevalence of QS systems amongst these pathogens, the possibility of the use of the inhibition of QS processes to control infection has been proposed as an alternative to the use of antibiotics in aquaculture.

The main objectives of this work were:

- a) The study of the presence and frequency of cultivable bacteria capable of interfering with AHL mediated QS systems either enzymatically or through the production of antagonists in different marine environments.
 - Marine bacterial communities obtained from sites with high organic load: sediment from a fish culture tank, biofilm from a filtered seawater reservoir tank (25.000 L) and marine algae *Fucus vesiculosus*.
 - Marine water samples from estuary and ocean at different depths (0 and 10 meter).
- b) Characterization of the obtained isolates with high QQ activity against AHLs in order to evaluate its biotechnological potential.

Marine bacteria were isolated at 15 and 22°C for screening of QQ activity against AHLs. The solid media used for the bacterial isolation included rich media with high organic nutrient concentration such as Triptone soy agar 1% NaCl (TSA-I) and Marine Agar (AM). But also formulations with low organic load such as Marine agar diluted 1/100 with seawater (AM 1/100), filtered autoclaved seawater medium (FAS) supplemented with 1 g/L casaminoacids (FAS-CAS) and FAS medium supplemented with 0.5 g/L polymers: agarose, quitin and starch (FAS-POL). For QQ activity detection, AHLs of different size; *N*-Hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) and *N*-Decanoyl-L-homoserine lactone (C10-HSL) were exposed separately to each isolate. The remaining activity of each signal molecule was measured with the biosensor strains *Chromobacterium violaceum* CV026 and VIR07 in solid plate assays. Then, the AHL degradation activity of AHLs was checked for each positive isolate with HPLC-MS, using the signals C4 and C12-HSL.

A total of 630 isolates were obtained from the selected marine environments for QQ screening. 166 strains were obtained from dense marine bacterial communities: 85 strains from the sediment of a fish culture tank, 48 from a biofilm from a filtered seawater reservoir tank and 33 from *F. vesiculosus*. Among water isolates, 132 strains were obtained from estuarine marine water, 166 from oceanic water at 0 meter depth and 166 from 10 meter depth. Around half of the isolates used for QQ screening were obtained from richer media, TSA-I and MA, due to the higher variability of colonies observed.

The *C. violaceum* CV026 solid plate assay permitted the identification of 109 (24 belonging to dense bacterial communities and 85 to seawater samples) strains with QQ activity against C6-HSL, which represents a 17.3% of the isolated strains. This percentage is much higher than the percentages of QQ activity reported for soil and plant isolates (around 2%), which indicates that QQ may be a common process among marine cultivable bacteria isolated from different marine environments. Among the 109 QQ positive strains against C6-HSL, 100 showed activity against C10-HSL in the bioassay with *C. violaceum* VIR07 (15 from dense bacterial communities and 85 from seawater samples). Fifty per cent of the active strains were isolated at 22°C and therefore the effect of isolation temperature was not statistically significant. Although a strong effect of the culture media used for isolation on the number of QQ active isolates was expected, such effect could not be confirmed as no statistically significant effect of the culture media used for the isolation was found on the percentage of strains with QQ activity. One of the more striking results is that all the isolates actively degraded the AHLs even in highly organic media (Marine Broth), in which other carbon sources are more readily available. Therefore, the capacity of AHL degradation is not merely a metabolic activity directed to obtaining energy, but an enzymatic ability that is expressed constitutively and probably confers some kind of adaptive advantage over competitors. On the contrary an important effect of the origin of the sample on the percentage of strains with QQ activity was found. The samples with higher percentage of isolation of AHL degradation activity were the surface of *F. vesiculosus* (39.4%) and open ocean at 0 and 10 meter depth (27.7 and 21.7% respectively). A negative correlation between the number of CFUs of the sample and the percentage of isolates with QQ activity was observed.

The type of QQ activity of the strains that significantly reduced the activity of C6 and C10-HSL in the bioassays was analyzed with HPLC-MS to determine the enzymatic degradation of signals. The acidification of the culture media after the degradation assay allowed the identification of a possible lactonase activity in the strains, since the lactone ring is recovered at low pH. 19 isolates out of the 100 analysed were able to significantly reduce the concentration of C4 and C12-HSL measured by HPLC-MS and were identified by amplification and partial sequencing of RNAr 16S gene. Besides being more frequent, isolates with wide spectrum activity obtained from

dense microbial communities presented a higher taxonomic diversity than those obtained from sea-water. From those, seven were obtained from the alga *F. vesiculosus* and were identified as *Hyphomonas* sp. (strain 2), *Stappia* sp. (strains 5 and 176), *Alteromonas* sp. (strain 168), *Oceanobacillus* sp. (strain 172), *Rhodococcus erythropolis* (strain 173) and a new species related to the α -Proteobacterium *Phaeobacter* (strain 177). Another seven isolates with wide spectrum activity were obtained from the fish tank sediment: *Tenacibaculum discolor* (strain 20J), *Bacillus circulans* (strain 24), *Oceanobacillus* sp. (strains 30 and 97-2), *Halomonas taeanensis* (strain 33), *Rhodococcus erythropolis* (strain 50) and *Stappia* sp. (strain 97-1). A single species with wide spectrum QQ activity was isolated from the seawater tank biofilm and was identified as *Roseovarius aestuarii* (strain 61). Regarding the four strains isolated from water samples, three of them were obtained from oceanic water at 10 m depth and were identified as *Salinicola salarii* (strains 131 and 160) and a new species close to the Bacteroidete *Maribacter* (strain 139). Finally, the only strain with this type of activity isolated from estuarine water was identified as *Olleya marilimosa* (strain 138E). Almost all the identified isolates with wide spectrum QQ activity belong to genera that are exclusively marine, excluding a possible terrestrial origin of the strains despite the coastal character of some of the samples. Only three of the strains belong to genera (*Bacillus* y *Rhodococcus*) for which terrestrial isolates with QQ activity had been described before.

The QQ screening procedure used in this work avoided the use of enrichment cultures, based on the ability of growing with AHLs as sole source of carbon and nitrogen that have been used in many studies, in order to obtain a wide picture of the prevalence and ecological significance of QQ activities in the selected marine samples. Moreover, this methodology allowed the detection of an isolate with putative AHL-antagonist activity not mediated by enzymatic degradation of the signal (strain 147), although this result still needs to be confirmed.

In contrast with the high QQ activity found among cultivable coastal strains, the search in the available marine metagenomes revealed a surprising low abundance of homologous of known acylases or lactonases, when the strict sequence homology criterion was applied (50% identity for 70% of the length of the sequence). The difference between QQ activity in marine isolates and the frequency of the retrieved

genes in the marine metagenome collections would be related to the limited number of sequences available so far for AHL degradation enzymes. Moreover, QQ enzymes from the same family show low homology, which requires the decrease of the percentages of identity in genomic searches in order to be able to retrieve all the known lactonase and acylase sequences. The decrease of the restriction parameters in metagenomic searches resulted in an important increase in the amount of sequences with putative acylase or lactonase activity, narrowing the discrepancy with the results obtained for QQ activity among cultivable bacteria.

Another significant feature derived from the marine metagenome analysis is the clear divergence in the spatial distribution between lactonases and acylases. AHL-lactonases show homology to the β -lactamase family but seem to be highly specific enzymes showing no or little activity to other chemicals, although these enzymes have been related with the metabolism of γ -butyrolactones (GBLs) in the case of *Agrobacterium tumefaciens*. On the other hand, acylases show homologies with cephalosporin acylases, *N*-terminal (Ntm) hydrolases and AhlM, the AHL-acylase from *Streptomyces* sp. has been shown to catalyse the hydrolysis of penicillin G. On the basis of this difference of specificity between the two types of prokaryotic AHL-degrading enzymes described so far, one can hypothesize that the higher abundance of AHL-acylases in the coastal metagenomic samples is reflecting a more complex and rich environment in which acylases could act as quenchers of AHL-mediated QS as well as defenders against antibiotic production by competitors or other unknown functions.

A search of QQ genes in the available bacterial sequenced genomes, with the less strict sequence homology criterion (30% identity for 70% of the length of the sequence), revealed the presence of QQ putative sequences in several of the species with QQ activity identified in this work. In some cases, such as the *Stappia* strains, the retrieved lactonase sequence is consistent with the type of AHL degradation revealed by the preliminary HPLC-MS analysis. On the contrary, in the case of the *Oceanobacillus* spp., the HPLC analysis indicated a lactonase-like activity, while only an acylase sequence could be found in the genome with significant homology to known QQ enzymes. The cloning of the enzymes responsible for the QQ activity in these novel species will surely extend our knowledge on the variability and modes of action of these enzymes. The availability of new QQ sequences will allow a better understanding of the

ecological significance of QQ processes, including non-cultivable marine bacteria, derived from metagenomic searches. Moreover, further characterization of these marine isolates and their activity may drive to the development of biotechnological applications for the treatment and prevention of infections controlled by AHL-mediated QS processes, especially in the field of aquaculture.

Even though all QQ-active bacteria identified in the marine samples analysed were of interest, *T. discolor* 20J was selected for further characterisation due to its fast growth and for its ability to degrade completely all the five AHLs that were initially tested (C4, C6, C10, C12 y OC12-HSL). This strain was isolated in TSA-I from the fish tank sediment sample, a feature that would exclude the strain as *T. discolor*, since this species is characterized for the requirement of marine salts but cannot grow in media formulated with NaCl as the only salt. This characteristic increased the interest of *T. discolor* strain 20J, since it can also be grown in non-marine media. Although the temperature at which the strain was isolated was low, 15°C, it can also grow at room temperature and even at 37°C. An additional interesting characteristic of this isolate was that it belongs to the phylum Bacteroidetes, for which no QQ activity had been described before, and thus the possibility of finding a new type of AHL degrading activity was expected to be higher.

T. discolor 20J QQ activity resulted very unspecific, being able to degrade AHLs of different sizes including those with substitutions in the third carbon of the acyl chain. The acidification of the supernatants following signal degradation allowed the recovery of part of the initial concentration for short signals. This indicates the presence of a lactonase in *T. discolor* 20J that would be unrelated to the described family of metallo- β -lactamases, as it was not possible to obtain a specific PCR amplification using degenerated primers homologous to the conserved sequences of those enzymes. Lactonase activity was present only for short AHLs, since no recovery of the concentration of long AHL was observed after acidification, which indicates that two separate AHL degrading activities could be present in this strain. Differences in the degradation kinetics of both types of AHLs would also support this hypothesis.

T. discolor QQ activity was mainly cell-associated, even though AHL degradation was also observed in filtered culture media, that was higher for short AHLs, which could indicate that strain 20J secretes a lactonase to the extracellular medium.

The extracellular location of QQ enzymes is not common since the majority of the known lactonases and acylases have been described as cytoplasmatic enzymes. Degradation of short AHLs by a lactonase in *T. discolor* 20J is consistent with the wide spectrum activity reported for those enzymes, including C4-HSL, whereas the acylases show a greater substrate specificity, being mostly active against large AHLs (C10-HSL or longer). For the first time a marine Bacteroidete with QQ activity was isolated, identified, and its AHL-degrading activity characterised.

When other *Tenacibaculum* members were assayed, short and long AHL degradation activity was found in all of them, which indicates that the QQ activity is conserved in this genus. The exception was *T. maritimum* NCIMB 2154^T, which could only degrade long AHLs. After acidification to pH 2, no recovery of the AHLs was observed indicating an absence of lactonase activity in this strain. Moreover no QQ activity was detected in the bacterial supernatants which supports the extracellular localization of *T. discolor* 20J lactonase. Since C4-HSL was detected in supernatants of all the *Tenacibaculum* species tested, the QQ activity present in this genus could be related with the control and regulation of QS-dependent functions. The QQ enzymes would modulate the signal levels and/or block external signals that could interfere with intercellular communication in this group. C4-HSL production by all strains of *T. maritimum* and other *Tenacibaculum* species analysed indicates that QS is conserved in this genus. The maximum C4-HSL concentration was 3.5 nM in 48 h supernatants, high enough for biosensor detection and within the range of AHL concentrations described in the literature (between 0.4 and 400 nM). Since the C4-HSL-mediated QS in *Tenacibaculum* is also present in pathogenic species and in the case of *T. discolor* DSM 18842 the AHL could be detected *in vivo* in turbot juveniles, it is possible that QS controls tissue colonization and pathogenesis in tenacibaculosis. AHL levels found in infected fishes are also within the normal ranges observed for other fish pathogenic bacteria. Even though the physiological features under the control of QS in *Tenacibaculum* remains to be investigated, the production of C4-HSL in this genus, together with the recent detection of AHLs in Bacteroidetes isolated from marine biofilms, extends the paradigm of AHL-mediated QS beyond the Proteobacteria.

For the first time the production of AHL-type QS signals and QQ activity has been demonstrated simultaneously in Bacteroidetes, including pathogenic members of

this group. Due to the ecological significance of Bacteroidetes, especially in the marine environment, the discovery of AHL-mediated QS processes among their members will advance our understanding of the microbial interactions in complex ecosystems. Moreover, cell-to-cell communication phenomena should be reconsidered in other habitats in which the Bacteroidetes play an important role, such as intestinal flora or dental plaque. The discovery of QS processes in pathogenic members of the group may represent a new strategy for the treatment of infections.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Atkinson, S., Williams, P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface* 6: 959-978.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J. L., Toranzo, A. E. 2004. Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Dis. Aquat. Org.* 58: 1-8.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., Magariños, B. 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis. Aquat. Org.* 71: 255-266.
- Barber, C. E., Tan, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Down, J. M., Williams, P., Daniels, M. J. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24: 555-566.
- Bassler, B. L. 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421-424.
- Bassler, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 582-587.
- Bassler, B. L., Losick, R. 2006. Bacterially Speaking. *Cell* 125: 237-246.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., Silverman, M. R. 1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*-sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9: 773-786.

Bibliografia

- Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Ugur, A., Ceylan, O. 2007. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Curr. Microbiol.* 55: 114-118.
- Borchardt, S. A., Allain, E. J., Michels, J. J., Stearns, G. W., Kelly, R. F., McCoy, W. F. 2001. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3174-3179.
- Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F. 2009. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 1-19.
- Brandão, P. F. B., Clapp, J. P., Bull, A. T. 2003. Diversity of nitrile hydratase and amidase enzyme genes in *Rhodococcus erythropolis* recovered from geographically distinct habitats. *Appl. Environ. Microb.* 69: 5754-5766.
- Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buch, C., Larsen, J. L., Gram, L. 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Org.* 65: 43-52.
- Bruns, A., Cypionka, H., Overmann, J. 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3978-3987.
- Buch, C., Sigh, J., Nielsen, J., Larsen, J. L., Gram, L. 2003. Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 338-349.
- Burton, E. O., Read, H. W., Pellitteri, M. C., Hickey, W. J. 2005. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4906-4909.

- Cámara, M., Daykin, M. M., Chhabra, S. R. 1998. Detection, purification and synthesis of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules. *Methods Microbiol.* 27: 319-330.
- Cam, D. T. V., Hao, N. V., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. Novel approach of using homoserine lactone degrading and poly- β -hydroxybutyrate accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 291: 23-30.
- Carlier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y., Faure, D. 2004. The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the *N*-acyl-homoserine lactone signal. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 951-957.
- Carlier, A., Faure, D., Latour, X., Uroz, S., Fray, R., Smadja, B., Dessaux, Y. 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.
- Carpentier, B., Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 499-511.
- Case, R. J., Labbate, M., Kjelleberg, S. 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2: 345-349.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540-552.
- Chan, W. C., Coyle, B. J., Williams, P. 2004. Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive *AgrC* antagonists as quorum sensing inhibitors. *J. Med. Chem.* 47: 4633-4641.

Bibliografia

- Charlton, T. S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., Kjelleberg, S. 2000. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ. Microbiol.* 2: 530-541.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassier, B., Hughson, F. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* 415: 545-549.
- Chhabra, S. R., Stead, P., Bainton, N. J., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Williams, P., Bycroft, B. W. 1993 Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Antibiot. (Tokyo)* 46: 441-454.
- Chowdhary, P. K., Keshavan, N., Nguyen, H. Q., Peterson, J. A., Gonzales, J. E., Haines, D. C. 2007. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry* 46: 14429-14437.
- Christensen, S., Rasmussen, L., Leick, V., Wheatley, D. N. 1998. Signalling in unicellular eukaryotes: regulation of cell survival, proliferation, differentiation, mating, chemosensory behaviour, and programmed cell death. *Int. Rev. Cytol.* 177: 181-253.
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J., Greenberg, E. P. 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3587-3590.
- Cicirelli, E. A., Williamson, H., Tait, K., Fuqua, C. 2008. Acylated homoserine lactone signaling in marine bacterial systems. In *Chemical communication among bacteria*. Winans, S. C., Bassler, B. L. (eds). Washington DC: ASM Press, pp. 251-272.

- Cirou, A., Uroz, S., Chapelle, E., Latour, X., Orange, N., Faure, D., Dessaux, Y. 2009. Quorum sensing as a target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium*. In Recent developments in management of plant diseases. Gisi, U., Chet, I., Gullino, M. L. (eds). New York: Springer Dordrecht Heidelberg London, pp. 121-131.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5116-5122.
- 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.
- 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.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y. 2005. Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7: 1796-1808.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104:1675-1684.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.

Bibliografia

- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., Verstraete, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240: 69-88.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminiscent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotech.* 25: 472-479.
- 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.
- de Kievit, T. R., Iglewski, B. H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68: 4839-4849.
- De la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C., Ventosa, A. 2010. Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 963-971.
- Delalande, L., Faure, F., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P., Dessaux, Y. 2005. N-hexanoyl-l-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 13-20.
- DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N. U., Martinez, A., Sullivan, M. B., Edwards, R., Brito, B. R., Chisholm, S. W., Karl, D. M. 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* 311: 496-503.

- Dobretsov, S., Teplitski, M., Paul, V. 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* 25: 413-427.
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., Zhang, L. H. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1754-1759.
- 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.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Zhang, L. H. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1201-1211.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. 2000. AiiA, an enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3526-3531.
- Dong, Y. H., Zhang, L. H. 2005. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J. Microbiol.* 43: 101-109.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Xu, J. L., Zhang, L. H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 954-960.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B. N. 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46: 1239-1247.

Bibliografia

- Ducklow, H. 2000. Bacterial production and biomass in the oceans. En *Microbial ecology of the oceans*. Kirchman, D. L. (ed). New York: Wiley-Liss, pp. 85-120.
- Dworkin M., Kaiser, D. 1985. Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science* 230: 18-24.
- Eddy, S. R. 2008. A probabilistic model of local sequence alignment that simplifies statistical significance estimation. *PLoS Comput. Biol.* 4: e1000069.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Egan, S., Thomas, T., Kjelleberg, S. 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 219-225.
- Federle, M. J., Bassler, B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 112: 1291-1299.
- Ferguson, R. L., Buckley, E. N., Palumbo, A. V. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 49-55.
- Finch, R. G., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W., Williams, P., Stewart, G. S. A. 1998. Quorum sensing: a novel target for anti-infective therapy. *J. Antimicrobial. Chem.* 42: 569-571.
- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., Denny, T. P. 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel aureoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanaceum*. *Mol. Microbiol.* 26: 251-259.

- Freeman, J. A., Bassler, B. L. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a twocomponent response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* 31: 665-677.
- Fuqua, C., Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Rev.* 3: 685-695.
- Fuqua, W. 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.
- Gantner, S. 2006. *In situ* quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent *N*-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 188-194.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J. B., Bauer, W. D. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 827-834.
- Gauthier, M. J., Breittmayer, V. A. 1992. The Genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. En *The Prokaryotes*, 2nd edn. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (eds). New York: Springer-Verlag, pp. 3046-3070.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153: 1424-1431.
- Gilson, L., Kuo, A., Dunlap, P. V. 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* 177: 6946-6951.
- Giovannoni, S. J., Stingl, U. 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343-348.

Bibliografia

- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. 1996. Eukaryotic interference with homoserinelactone-mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol.* 178: 6618-6622.
- Goodfellow, M., Maldonado, L. A., 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. En *The Prokaryotes*, 3rd edn. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (eds). New York: Springer, pp. 843-888.
- Gram, L., Grossart, H. P., Schlingloff, A., Kjørboe, T. 2002. Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by *Roseobacter* Strains Isolated from Marine Snow. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4111-4116.
- Heithoff, D., Mahan, M. 2004. *Vibrio cholerae* biofilms: stuck between a rock and a hard place. *J. Bacteriol.* 186: 4835-4837.
- Hentzer, M., Givskov, M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112: 1300-1307.
- Hmelo, L., Van Mooy, B. A. S. 2009. Kinetic constraints on acylated homoserine lactone-based quorum sensing in marine environments. *Aquat. Microb. Ecol.* 54: 127-133.
- Holden, M. T. G., Chhabra, S. R., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S., Williams, P. 1999. Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33: 1254-1266.

- Holmstrom, C., Kjelleberg, S. 2000. Bacterial interactions with marine fouling organisms. En *Biofilms: recent advances in their study and control*. Evans, L.V. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 101-116.
- Horikawa, M., Tateda, K., Tuzuki, E., Ishii, Y., Ueda, C., Takabatake, T., Miyairi, S., Yamaguchi, K., Ishiguro, M. 2006. Synthesis of *Pseudomonas* quorum-sensing autoinducer analogs and structural entities required for induction of apoptosis in macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2130-2133.
- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H., 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.
- 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.
- Huang, Y. L., Dobretsov, S., Ki, J. S., Yang, L. H., Qian, P. Y. 2007. Presence of acyl-homoserine lactone in subtidal biofilm and the implication in larval behavioral response in the polychaete *Hydroides elegans*. *Microb. Ecol.* 54: 384-392.
- Huang, Y. L., Ki, J. S., Case, R. J., Qian, P. Y. 2008. Diversity and acyl-homoserine lactone production among subtidal biofilm-forming bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 52: 185-193.
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T., Yoshikawa, S. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.* 2: 267-271.
- Jafrá, S., Przysowa, J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P., van der Wolf, J. M. 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Can. J. Microbiol.* 52: 1006-1015.

Bibliografia

- Jones, P. R., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L., Dexter, S. C. 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb. Ecol.* 53: 153-162.
- Kang, B. R., Lee, J. H., Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, J. S., Cho, B. H., Kim, Y. C. 2004. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Can. J. Microbiol.* 50: 935-941.
- Kaplan, H. B., Greenberg, E. P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163: 1210-1214.
- Khan, S. R., Farrand, S. K. 2008. The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 191: 1123-1125.
- Khersonsky, O., Tawfik, D. S. 2005. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 44: 6371-682.
- Kim, J. S., Kim, Y. H., Seo, Y. W., Park, S. 2007. Quorum sensing inhibitors from the red alga, *ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 308-311.
- Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C., Lee, S.-T. 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 675-681.
- Kim, S. Y., Lee, S. E., Kim, Y. R., Kim, C. M., Ryu, P. Y., Choy, H. E., Chung, S. S., Rhee, J. H. 2003. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Mol. Microbiol.* 48: 1647-1664.

- Kjelleberg, S., Steinberg, P. D. 2002. Defenses against bacterial colonization of marine plants. En *Phyllosphere Microbiology*. Lindow, S. E., Hetch-Poinar, E. I., Elliot, V. J. (eds). American Phytopatol. Soc., pp. 157-172.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., de Vos W. M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and twocomponent signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895-904.
- Kubaneck, J., Snell, T. W. 2008. Quorum sensing in rotifers. En *Chemical communication among bacteria*. Winans, S. C., Bassler, B. L. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 453-461.
- Labrenz, M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Schumann, P., Hirsch, P. 1999. *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll a production from hypersaline Ekho Lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 137-147.
- 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. *Microbiol.* 146: 2469-2480.
- Lazazzera, B. A., Solomon, J. M., Grossman, A. D. 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* 89: 917-25.
- Leadbetter, J. R., Greenberg, E. P. 2000. Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182: 6921-6926.

Bibliografía

- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., Lee, J. K. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3919-3924.
- Lee, S. Y., Park, S., Oh, T. K., Yoon, J. H. 2010. Description of *Olleya aquimaris* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of the genus *Olleya* Mancuso Nichols et al., 2005. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 887-891.
- Lerat, E., Moran, N. A. 2004. The evolutionary history of quorum-sensing systems in Bacteria. Mol. Biol. Evol. 21: 903-913.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., 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.
- 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.
- Losick, R., Kaiser, D. 1997. Razón y mecanismo de la comunicación bacteriana. Investigación y Ciencia 247: 6-12.
- Mäe, A., Montesano, M., Koiv, V., Palva, E. T. 2001. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 1035-1042.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiol. 145: 283-291.

- Manefield, M., Turner, S. L. 2002. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiol.* 148: 3762-3764.
- Martens, T., Heidrom, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B. J., Brinkoff, T. 2006. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al., 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al., 1995) Uchino et al., 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1293-1304.
- Martin-Cuadrado, A. B., Lopez-Garcia, P., Alba, J. C., Moreira, D., Monticelli, L., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Rodríguez-Valera, F. 2007. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS ONE* 2: e914.
- Martinez-Murcia, A. J., Rodríguez-Valera, F. 1994. The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) to develop taxa specific DNA probes of known sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 124: 265-269.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., Defago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88: 678-684.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Cámara, M., Daykin, M., Lamb, J. 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-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143: 3703-3711.
- McLean, R.J., Pierson, L.S., Fuqua, C. 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Methods* 58:351-360.

Bibliografia

- Michaels, A. F., Knap, Ah, Dow, Rl, Gundersen, K, Johnson, Rj, Sorensen, J, Close, A, Knauer, Ga, Lohrenz, Se, Asper, Va, Tuel, M, Bidigare, R. 1994. Seasonal patterns of ocean biogeochemistry at the U.S. JGOFS Bermuda Atlantic time-series study site. *Deep-Sea Res.* 41: 1013-1038.
- Miller, M. B., Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.
- Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., Hughson, F. M. 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol. Cell* 15: 677-687.
- Milton D. L., Chalker V. J., Kirke D., Hardman A., Cámara 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.
- Milton, D. L., Hardman, A., Cámara, M., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the vanI/R locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 179: 3004-3012.
- Mohamed, N. M., Cicirelli, E. M., Kan, J., Chen, F., Fuqua, C., Hill, R. T. 2008. Diversity of quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environ. Microbiol.* 10: 75-86.
- Molina, L., Rezzonico, F., Defago, 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.

- Morohoshi, T., Inaba, T., Kato, N., Kanai, K., Ikeda, T. 2004. Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. J. Biosci. Bioeng. 98: 274-281.
- 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.
- 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.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., Foster, K. R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. PLoS Biol. 6: e14.
- Nealson, K. H. 1977. Autoinduction of bacterial luciferase: occurrence, mechanism and significance. Arch. Microbiol. 112: 73-79.
- Nealson, K. H., Hastings, J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol. Rev. 43: 496-518.
- Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminiscent system. J. Bacteriol. 104: 313-322.
- Nichols, M., Bowman, J. P., Guezennec, J. 2005. *Olleya marilimosa* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the Southern Ocean. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1557-1561.
- Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B. 2009 Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. Med. Res. Rev. 29: 65-124.

Bibliografia

- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., Horinouchi, S. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* 34: 102-111.
- Okada, M., Sato, I., Cho, S. J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D., Sakagami, Y. 2005. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nat. Chem. Biol.* 1: 23-24.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. L., Olsen, G. J. 1986. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Adv. Microbiol. Ecol.* 9: 1-55.
- Pappas, K., Weingart, C. L., Winans, S. C. 2004. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signaling. *Mol. Microbiol.* 53: 755-769.
- Park, S. Y., Kang, H. O., Jang, H. S., Lee, J. K., Koo, B. T., Yum, D. Y. 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* 71: 2632-2641.
- Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149: 1541-1550.
- Park, S. J., Park, S. Y., Ryu, C. M., Park, S. H., Lee, J. K. 2008. The role of AiiA, a quorum-quenching enzyme from *Bacillus thuringiensis*, on the rhizosphere competence. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1518-1521.
- Park, S. Y., Hwang, B. J., Shin, M. H., Kim, J. A., Kim, H. K., Lee, J. K. 2006. N-acylhomoserine lactonase-producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 261: 102-108.

- Parsek, M. R., Greenberg, E. P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8789-8793.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. J., Greenberg, E. P. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4360-4365.
- Pazos, F., Santos, Y., Macias, A. R., Núñez, S., Toranzo, A. E. 1996. Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish. Dis.* 19: 193-197.
- Pechere, J. C. 2001. New perspectives on macrolide antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1: S93-S97.
- Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skindersø, M. E., Givskov, M., Nielsen, J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org. Biomol. Chem.* 3: 253-262.
- Pesci, E. C., Iglewski, B. H. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. En *Cell-cell signaling in Bacteria*. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 147-155.
- Peters, L., König, G. M., Wright, A. D., Pukall, R., Stackebrandt, E., Eberl, L., Riedel, K. 2003. Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3469-3475.
- Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y. 2008. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum galaicum* sp. nov. Isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 21-25.

Bibliografía

- Poindexter, J. S. 2006. Dimorphic prosthecate bacteria: the genera *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas*, and *Thiodendron*. En The Prokaryotes, 3rd edn. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (eds). New York: Springer, pp. 72-90.
- Quadri, L. E. 2002. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 133-145.
- Railkin, A. I. 2004. Marine biofouling: colonization processes and defenses. 1^a ed., CRC Press LLC..
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W. J., Ekmann, S. K., 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). *System. Appl. Microbiol.* 27: 350-359.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* 187: 1799-1814.
- Redfield, R. 2002. Is quorum sensing a side effect of difusión sensing?. *Trends Microbiol* 10: 365-370
- Riaz, K., Elmerich, C., Raffoux, A., Moreira, D., Dessaux, Y., Faure, D. 2008. Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 73: 3-6.
- Rice, S. A., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. 1999. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 23-31.

- Riemann, L., Steward, G. F., Azam, F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 578-587.
- Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., Otero, A. 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.
- 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.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J. A., Hoffman, J. M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J. E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J. F., Utterback, T., Rogers, Y.-H., Falcón, L. I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L. E., Karl, D. M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M. R., Strausberg, R. L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M., Venter, J. C. 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol.* 5: e77.
- Sakuragi, Y., Kolter, R. 2007. Quorum-Sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189: 5383-5386.
- Schaefer, A. L., Taylor, T. A., Beatty, J. T., Greenberg, E. P. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J. Bacteriol.* 184: 6515-6521.

Bibliografia

- 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.
- Schut, F., De Vries, E. J., Gottschal, J. C., Robertson, B. R., Harder, W., Prins, R. A., Button, D. K. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 7: 2150-2160.
- Sharif, D. I., Gallon, J., Smith, C. J., Dudley, E. 2008. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *ISME J.* 2008: 1-12.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. K., Rinehart, L., Farrand, S. K. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6036-6041.
- Shih, P. C., Huang, C. T. 2002. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 309-314.
- Shiner, E. K., Terentyev, D., Bryan, A., Sennoune, S., Martinez-Zaguilan, R., Li, G., Gyorke, S., Williams, S. C., Rumbaugh, K. P. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol.* 8: 1601-1610.
- Shi, Y., Tyson, G. W., DeLong, E. F. 2009. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column. *Nature* 459: 266-269.

- Siehnell, R., Traxler, B., An, D. D., Parsek, M. R., Schaefer, A. L., Singh, P. K. 2010. A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 7916-7921.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., Quax, W. J. 2006. Quorum quenching by an *N*-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* 74: 1673-1682.
- 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.
- Smith, K. M., Bu, Y., Suga, H. 2003. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol.* 10: 81-89.
- Smith, R. A., Iglewski, B. H. 2003. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 56-60.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C., Eberl, L. 2001. Visualization of *N*-Acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5761-5770.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Gay, P. 1983. Genetic analysis of SacB, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Marburg. Mol. Gen. Genet.* 191: 138-144.
- Stevens A. M., Greenberg, E. P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* 179: 557-562.

Bibliografia

- Stoltz, D. A., Ozer, E. A., Ng, C. J., Yu, J. M., Reddy, S. T., Lusic, A. J., Bourquard, N., Parsek, M. R., Zabner, J., Shih, D. M. 2007. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292: L852-L860.
- Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Salmond, G. P. C., Williams, P. 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 45: 199-270.
- Swift, S., Karlyshev, A. V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Williams, P., Macintyre, S., Stewart, G. S. A. B. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* 179: 5271-5281.
- Swift, S., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. 1999. *N*-acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. En *Cell-cell signalling in Bacteria*. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology., pp. 291-313.
- Taga, M. E., Bassler, B. L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 14549-14554.
- Tait, K., Joint, I., Daykin, M., Milton, D. L., Williams, P., Cámara, M. 2005. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 7: 229-240.
- Tait, K., Williamson, H., Atkinson, S., Williams, P., Cámara, M., Joint, I. 2009. Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling. *Environ. Microbiol.* 11: 1792-1802.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., Standiford, T. J., Ishiguro, M., Yamaguchi, K. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 71: 5785-5793.
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J. C., Kohler, T., Yamaguchi, K., Delden, C. V. 2001. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1930-1933.
- 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.
- Teplitski, M., Robinson J. B., Bauer, W. D. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 637-648.
- Tinh, N. T., Asanka Gunasekara, R. A., Boon, N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2007. *N*-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 45-53.
- Tinh, N. T. N., Yen, V. H. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2008. An acyl-homoserine lactone-degrading community improves the survival of first feeding turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 285: 56-62.

Bibliografia

- Toranzo, A. E., Barja, J. L. 1993. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 13: 30-32.
- Toth, I. K., Newton, J. A., Hyman, L. J., Lees, A. K., Daykin, M., Ortori, C., Williams, P., Fray, R. G. 2004. Potato plants genetically modified to produce *N*-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot erwiniae. Mol. Plant-Microbe Interact. 17: 880-887.
- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. 1996. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. Fish Pathol. 31: 25-31.
- Tringe, S. G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen K., Chang H. W., Podar, M., Short, J. M., Mathur, E. J., Detter, J. C., Bork, P., Hugenholtz, P., Rubin, E. M. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. Science 308: 554-557.
- Ulrich, R. L. 2004. Quorum quenching: enzymatic disruption of Nacylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6173-6180.
- 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. Microbiol 151: 3313-3322.
- Uroz, S., Dangelo, C., Carlier, A., Faure, D., Petit, A., Oger, P., Sicot, C., Dessaux, Y. 2003. Novel bacteria degrading *N*-acyl homoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing regulated functions of plant pathogenic bacteria. Microbiol. 149: 1981-1989.

- 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.
- Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Dessaux, Y. 2007. N-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain D1. *Arch. Microbiol.* 187: 249-256.
- 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.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H. O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Wagner-Dobler, I., Biebl, H. 2006. Environmental Biology of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 255-280.
- Wagner-Dobler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., Ebner, S., Hennig, A., Pukall, R., Schulz, S. 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6: 2195-2206.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H., Zhang, L. H. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* 279: 13645-13651.
- Wang, Y. J., Leadbetter, J. R. 2005. Rapid acyl-homoserine lactone quorum sensing signal biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1291-1299.

Bibliografía

- Weaver, R. S., Kirchman, D. L., Hutchins, D. A. 2003. Utilization of iron/organic ligand complexes by marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 31: 227-239.
- Weinberger, F., Beltran, J., Correa, J. A., Lion, U., Pohnert, G., Kumar, N., Steinberg, P., Kloareg, B., Potin, P. 2007. Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. *J. Phycol.* 43: 235-241.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., Salmond, G. P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
- Williams, P., Cámara, M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 182-191.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1119-1134.
- Williamson, L. L., Borlee, B. R., Schloss, P. D., Guan, C., Allen H. K., Handelsman, J. 2005. Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6335-6344.
- Winans, S. C., Bassler, B. L. 2002. Mob Psychology. *J. Bacteriol.* 184: 873-883.
- Winans, S. C., Zhu, J., Moré, M. I. 1999. Cell density-dependent gene expression by *Agrobacterium tumefaciens* during colonization of crown gall tumors. En *Cell-cell signaling in bacteria*. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 117-128.
- Wilson, M. 2001. Bacterial biofilms and human disease. *Sci. Prog.* 84: 235-254.

- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. lett.* 163: 185-192.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., Hoiby, N. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob. Chemother.* 53: 1054-1061.
- Xavier, K. B., Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 191-197.
- Xavier, J. B., Foster, K. R. 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 876-881.
- Xu, F., Byun, T., Deussen, H. J., Duke, K. R. 2003. Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.* 101: 89-96.
- 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: 5635-5646.
- Yoon, H. S., Golden, J. W. 1998. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282: 935-938.

Bibliografia

- You, J. L., Xue, X. L., Cao, L. X., Lu, X., Wang, J., Zhang, L. X., Zhou, S. N. 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1137-1144.
- Zhang, H. B., Wang, L. H., Zhang, L. H. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4638-4643.
- Zhang, L. H. 2003. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant. Sci.* 8: 238-244.
- Zhang, L. H., Dong, Y. H. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.
- Zimmermann, S., Wagner, C., Muller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., Hansch, G. M. 2006. Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect. Immun.* 74: 5687-5692.
- Zmasek, C. M., Eddy, S. R. 2001. A simple algorithm to infer gene duplication and speciation events on a gene tree. *Bioinformatics* 17: 821-828.

ANEXOS/ANNEXES

Anexo 1. Secuencias de genes de ARNr 16S

Cepa 2. *Hyphomonas* sp. DG895 99% ID

GTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTCACTACGGAATAGCTCTTGGAAACGAGTGGTAATAC
 CGTATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGTGAAAGATCGGCCCGCTTAGATTAGC
 TAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
 CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATC
 TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGCCTTAGGG
 TTGTAAAATTCTTTTCGCTAGGGATGATAATGACAGTACCTAGTAAAGAAGCCCCGGCTA
 ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCG
 GAACTGCATTTGAAACTGGAAGTCTAGAGACCAGGAGAGGTTAGCGGAATACCGAGTGT
 AGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGTGGAAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTAACTGGACT
 GGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCACACCGTAAACGATGAGAGCTAGTTGTTGGCAGGCATGCCTGTCCGGTGACGCAGCTA
 ACGCATTAAGCTCTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTA AAACTCAAAGAAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGCAGAACCTT
 ACCTACCCTTGACATACCGATCGCGGTTTCCAGAGATGGATTCTTTCAGTTAGGCTGGA
 TCGGATACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCATCCTTAGTTGCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAG
 GAACTGCCGGTGGTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTT
 ACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTAAATCCCCAAAACT
 GTCTCAGTTTCGGATTGTTCGTCTGCAACTCGACGGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATC
 GTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAT
 CATGGGAATTGGTTC

Cepa 5. *Stappia* sp. 98% ID

GACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCTTTTCGGTACGGAACAACAGTTGGAAACGAC
 TGCTAATACCGTATACGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTGGCCCCGCT
 TAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGA
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAGCGAGGAGGATAATGACGTTACTCGCAGAAGAAG
 CCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGA
 ATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGTCAGTTAGGGGTGAAATCCCAGAGC
 TCAACTCTGGAAGTGCCTTTAATACTGCCAGTCTTGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGGAAC
 TCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
 CACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTCAGGTTGCATGCAATTTGGTG
 GCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCG
 CAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATTTGGTGCTACATCCAGAGATGGATGTTCCCTTCG
 GGGACGCCAGGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTA
 GGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCC
 CTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAACC CGG
 AGGGTGAGCTAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGC
 ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGTAAGGCGCTGCGCT
 AACCCGCAAGGGAGGCAGGCGACC

Cepa 20J. *Tenacibaculum discolor* 99% ID

GCAAGTCGAGGGGTAACAGGGAAAAGCTTGCTTTTTTTGCTGACGACCGGCGAACGGGTG
CGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTGTACAGGAGGATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAAT
ACTCCATAATGTTGAGAGATGGCATCATCTTTTAATTAAAGATTTATCGGTACAAGATG
ACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCATGGCAACGATAGGTAG
GGGGTCTGAGAGGATTATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGC
AGGAAGACTGCCCTATGGGTGTAAACTGCTTTTATACAGGAAGAACTTAGTTACGTG
TAACTAACTGACGGTACTGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGCAGGCCGT
CAATTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAAGTGCCTTTGATACTGGTT
GACTTGAGTTATACGGAAAGTAGATAGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATAT
TACTTAGAATACCGATTGCGAAGGCAGTCTACTACGTATATACTGACGcCTCATGGACG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATKAGATAACCCTGGTAGTtCCACGCCGTAAWCGATgGA
CACTAGTTGTTGGGATTATTCTCAGTGACTAAaGCGAAAGTGATAAGTGTcCCCACCTG
GGGAGTACGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTTtAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGAG
TGACAGACTGAGAGATCGGTTTTTCTTCGGACACTTTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCTG
TCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCCATAACGAGCGCAACCCCTATCGTTA
GTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCAAACCGCGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGTATGGACAATGAGCAGCCACTATGCGAATAGGAGCGAATCTATAAACCATATCACAG
TTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATC
AGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCCTCAAGCCATGGA
AGCTGGGGGTGCCTGAAGTCGGTTACCGCAAGGAGCTG

Cepa 24. *Bacillus circulans* X3 98% ID

CAAGTCGAGCGGACTTTAAAAGCTTGCTTTTTAAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT
AATCCTTTTTCNACTCATGTGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTACAGATG
GGCCCCGCGCGCANTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTA
ACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG
GCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAC
TGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACNAGCGCAAC
CCTTGATCTTANTTGCCAGCATTAAANTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGANGAANGGTGGGGATGACGTCAAATCATCNTGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGNATGGTACAAAGGGCAN

Cepa 30. *Oceanobacillus* sp. YIM DH3 99% ID

AGTCGAGCGCAGGAAATAAACAGAACCCTTCGGGGTGATGTTTTATGGAATGAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACTCGCGGAAACGTG
 AGCTAATACCGGATAACACTTTTCATCTCATGGTGAGAAGATAAAAAGACGGTTTCNGCT
 GTCACCTACAGATGGGCCCGCGGCANTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAA
 CAAGTTGGGTAGTAACCTGACCCAACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGCGCTCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTTAACCGTGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAG
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
 AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTA
 ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAATTGA
 CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
 ACCAGGTCTTGACATCCTCTGATACCTCTAGAGATAGAGTTTTTCCCTTCGGGGACAGAG
 TGACAGGTGGTGATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGAAGCGAACCCGCGAGGTCAAGCC
 AATCCATAAAACCATTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG
 GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTANCCT

Cepa 33. *Halomonas taeanensis* BH539 99% ID

AAGTCGAGCGGAAACGATCCTAGCTTGCTAGGAGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTA
 ATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACGTGGGGAAACTCACGCTAATACCGC
 ATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAGCCTAT
 GTCGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCT
 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
 AGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAAGGCCTGACGGTTAATACCTGT
 CAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTT
 GATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGGAACCTGTCAGG
 CTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCG
 GGAGGAATAACAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAA
 GCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT
 AGCCGTTGGGAGCCTCGAGTTCTTAGTGGCGCAGTTAACGCAATAAGTCGACCGCCTGG
 GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTCTTGACATCGTGCGA
 ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTATCCTT
 ATTTGCCAGCGAGTAATGTGCGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
 GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA
 TGGCAGGTACAAAGGTTGCAAGACGGCGACGTGGAGCTAATCCATAAAGCCTGCCTC
 AGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAA

TCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCTTAACCTTCGGGGGAGCGATCACCACG

Cepa 50. *Rhodococcus erythropolis* MM30 99% ID

AGCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGG
GAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCCTGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGATTT
ATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTACGACGGGACGAA
GCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGTTTCTAGGCGGTT
TGTCGCGTCTGTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAG
ACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAACGAA
AGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGC
TAGGTGTGGGTTCCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCT
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGC
GGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTACATATAACC
G

Cepa 61. *Roseovarius aestuarii* SMK-122 99% ID

TGCAAGTTCGAGCGCACCTTCGGGTGAGCGGCGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTA
CCCTTTTCTACGGAATAGCCATTGGAAACGATGAGTAATACCGTATACGCCCTTCGGGG
GAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGG
CCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAG
CCTGATCTAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGGCCCTTAGGGTTCGTAAAGCTCTTTTCGCC
AGGGATGATAATGACAGTACCTGGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGGTTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGC
GGATTAGAAAGTTAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTCTAAAACCTA
CTAGTCTAGAGTTTCGAGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA
TATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTA
CGAAAGTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGA
ATGCCAGTCGTCGGGTAGTATACTATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCGCG
CTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCTTGACATCCT
GATCGCGTTAAGAGAGATCTTTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCC
ACATCCCTAGTTGCCAGCAGTTTCGGCTGGGCACTCTATGGAACTGCCCGTGATAAGCG
GGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCCAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGT
CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTTACCC
GAAGGCCGTGCGCCAACCTTTCGAGGGGGCAGCGGACCACGGTAAGCTC

Cepa 97-1. *Stappia* sp. 98% ID

TGCAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGGCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACAT
ACCTTTCGGTACGGAACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGTATACGCCCTATGGG

GGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTGGCCCCGCTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
 GCTCACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCA
 CGAGGAGGATAATGACGTTACTCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGG
 CGGATTGGTCAGTTAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTAATACT
 GCCAGTCTTGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAG
 ATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
 GAAGCTAGCCGTCAGGTTGCATGCAATTTGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCG
 CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATTT
 GGTGCTACATCCAGAGATGGATGGTTCCTTCGGGGACGCCAGGACAGGTGCTGCATGG
 CTGTTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
 CCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCAAAAAGCCGT
 CTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGC
 GTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCCGCAAGGGAGGCAGGCGACC

Cepa 97-2. *Oceanobacillus* sp. YIM DH3 99% ID

TGCAGTCGAGCGCAGGAAATAAACAGAACCCTTCGGGGTGATGTTTATGGAATGAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACTCGCGGAAAC
 GTGAGCTAATAACCGGATAACACTTTTCATCTCATGGTGAGAAGATAAAAAGACGGTTTCG
 GCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTTGGGTAGTAACTGACCCAACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTTAACCGT
 GGAGGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACCGTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
 TGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAG
 TTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAAGAA
 TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 ACTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGATACCTCTAGAGATAGAGTTTTTCCCTTCGGGGACA
 GAGTGACAGGTGGTGATGTTGTCGTGAGTCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGAAAGCGAACCCGCGAGGTCAA
 GCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT
 TGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGAAC

Cepa 168. *Alteromonas* sp. BCw156 99% ID

AGTCGAACGGAAACATGTCTAGCTTGCTAGATGATGTCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCTTGGGAACTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCA
TAATGTCTTTCGGACCAAACGGGGCTTCGGCTCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAGAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGA
AGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGT
GACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGC
TAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACGGTCATTTAGAACTGGCAGACTAGAGT
CTTGGAGAGGGGAGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAA
CATCAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGG
TAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTT
TGTGACTTTAAGTCGTGAGTAGCGAAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATGTTGAGAAGTTACC
AGAGATGGTTTCGTGCCTTCGGGAACTCAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCT
CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCC
AGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATA
CAGAGGGATGCGAGACAGTGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGTATGTCTGAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGAATAC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGAT
GCAAAGAAGTAGTTAGTTTAACTTCGGGAGAACG

Cepa 172. *Oceanobacillus* sp. YIM DH3 99% ID

GTCCGAGCGCAGGAAATAAACAGAACCCTTCGGGGTGATGTTTATGGAATGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACTCGCGGAAACGTGA
GCTAATACCGGATAAACTTTTCATCTCATGGTGAGAAGATAAAAGACGGTTTTCGGCTG
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTTGGGTAGTAACTGACCCAACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCTCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTTAACCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTACASAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAA
CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGATACCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAGAGT
GACAGGTGGTGCATGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGAAGCGAACCCGCGAGGTCAAGCCA
ATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG

AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGCCCCTCACACCACGAGAGTTGGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGG
 GCCAGCCGCCGAAGGTGGAAC

Cepa 173. *Rhodococcus erythropolis* PR4 100% ID

TCGAGCGGTAAGGCCTTTTCGGGGTACACGAGCGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTG
 ATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTC
 AGGTTGCATGACTTGGGGTGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCA
 GCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
 ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
 GGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCA
 CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAAT
 TACTGGGCGTAAAGAGTTTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTC
 AACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT
 CTGGGCAGTAACCTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCTTCCACGGAATCCGTG
 CCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG
 AGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCG

Cepa 176. *Stappia* sp. 98% ID

TGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGGCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACA
 TACCTTTCGGTACGGAACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGTATAACGCCCTATGG
 GGGAAAGATTTATCGCCGAGAGATTGGCCCCGCTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT
 GGCTCACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA
 AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCA
 GCGAGGAGGATAATGACGTTACTCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTA
 GCGGATTGGTCAGTTAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACCTGCCTTTAATAC
 TGCCAGTCTTGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
 GATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGG
 TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
 GGAAGCTAGCCGTGAGTTGCATGCAATTTGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCC
 GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATT
 TGGTGCTACATCCAGAGATGGATGGTTCCCTTCGGGGACGCCAGGACAGGTGCTGCATG
 GCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTC
 GCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGC
 TACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCAAAAAGCCG
 TCTCAGTTCCGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG
 CGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACC
 ATGGGAGTTGGTTTTACCCGTAAGGCGCTGCGCTAACCCGCAAGGGAGGC

Cepa 177. *Phaeobacter* sp. NH52F 96% ID. Existen secuencias de 16S de “no cultivables” con mayor identidad

CACATGCAAGTCGAGCGCTTCACTTCGGTGAGGAGCGGCGGACGGGTTAGTAACGCGTG
GGAACATAACCTTTTCTAAGGAATAGCCACTGGAAACGGTGAGTAATACCTTATACGCC
CTTCGGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATTGGCCCGCGTTAGATTAGATAGTTGGTGG
GGTAATGGCCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAGAGGATGATCAGCAACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTAGACAATG
GGCGCAAGCCTGATCTAGCGATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTCGTAAAGCT
CTTTCGCCAAGGATGATAATGACAGTACTTGGTAAAGAAGTCCCGGCTAACTCCGTTCC
AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGACTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGTAGGCGGATCAGAAAGTATGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAACCTGCCTC
ATAAACTCCTGGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAA
TTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACG
CTGAGGTGCGAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTA
AACGATGAATGCCAGTCGTCGGATAGCATGCTATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAG
CATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTT
GACATCCTGTGCTACATCCAGAGATGGATGGTTCCCTTCGGGGACGCAGTGATCAGGTG
CTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGT

Cepa 131. *Salinicola salarius* M27 98,4% ID

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACGTGGGGAAACCC
ACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCGGAGGATCTTCGGACTTCGCGCTAT
CGGATGAGCCTATGTTCGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGAT
CCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC
GCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAAAGCCTGGT
GGTTAATAACCCATCAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGTGGCTTGGCACGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGC
CGGAACGGCCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGCCTGACACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTTCGACTAGCCGTTGGGACCTTAAAGGACTTAGTGCGCAGTTAACCGGATAA
GTTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCT
TGACATCCTGCGAATTTGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTG
CTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGT

Cepa 138E. *Olleya marilimos*a CAM030 99,9% ID

CATGCAAGTCGAGGGGTAGCAGGGAGCTTGCTCCGCTGACGACCGGCGAACGGGTGCGT
AACGCGTATAGAATCTACCTCTTACTAAGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATATC
TTATAGTATACAGACCTGGCATCAGGATTGTATTAAGGTTACGGTAAGAGATGACTAT
GCGTCTATTAGCTAGATGGTGTGGTAACGGCACACCATGGCTACGATAGGTAGGGGCC
CTGAGAGGGGGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGAGGAATATTGGACAATGGAGGCAACTCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAA
GACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTTATACAGGAAGAAACACTCTCACGTGTGAGA

GCTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGTGGATGATT
 AAGTCAGAGGTGAAATCCTGCAGCTCAACTGTAGAATTGCCTTTGATACTGGTTGTCTT
 GAGTTATTATGAAGTAGTTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACAT
 AGAATACCAATTGCGAAGGCAGATTACTAATAATATACTGACACTGATGGACGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGTCACTAGC
 TGTTTCGGACTTCGGTTTGAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTGACCCACCTGGGGAGTA
 CGTTTCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
 TGGTTTAATTTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGATTGACAGGT
 TTAGAAATAGACTTTTCTTCGGACAATTTACAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGC

Cepa 139. *Maribacter ulvicola* KMM3951 94,7% ID

CATGCAAGTCGAGGGGCAGCATTTCAGCTTGCTGGAAGATGGCGACCGGCGCACGGGT
 GCGCACCGCGTATGGAACCTACCTTGTACAGGGGAATAGCCAGGGAACTTGGATTAA
 TGCCCCGTGGTACCGGCTAACAGCATTGTTTACCGGTTAAAGCCTTCGGGCGGTACAAG
 ATGGCCATGCGTCCCATTAGCTCGATGGTAGGGTAACGGCCTACCATGGCTACGATGGG
 TAGGGGCCCTGAGAGGGGGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGAGGAGACTCTGATCCAGCCATGCCGCG
 TGCAGGAAGAATGCCCTATGGGTAGTAACTGCTTTTATACGGGAAGAAAAGGGCCAC
 GTGTGGCCTGTTGACGGTACCGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGC
 GGGCGTTTAAAGTCAGTGGTGAAAGTCTGCAGCTCAACTGTAGAATTGCCTTTGATACTG
 AACGTCTTGAGTCATGGTGAAGTTGGCGGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGA
 TATTACATAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTGACTAACCATGTACTGACGCTGATGGA
 CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGG
 AACTAGCTGTCCGGGTCCTTGAGACCTGGGCGGCCAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCA
 CCTGGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGCA
 TTTTTCGAGGGGTGGAGACACCTTTTCTTCGGGCAATTTGCAAGGTGCTGCATGGTTG
 TCGTCAGC

Cepa 160. *Salinicola salarius* M27 99,9% ID

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACGTGGGGAAACCCACGCTAAT
 ACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCGGAGGATCTTCGGACTTCGCGCTATCCGATGAG
 CCTATGTCCGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCCGTAGCT
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
 GAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAAAGCCTCTGGGTTAATA
 CCCCAGAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGT
 GGCTTGGCACGCCGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGG
 CCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGCCTGACACTGACACTGAGGTG
 CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
 CGACTAGCCGTTGGGACCTTTAAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCG
 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCC

AGAGAAGTTGGCAGAGATGCCTTCGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAG

Anexo 2. Publicaciones y patentes derivadas

2.1 High abundance of bacteria with quorum quenching activity in dense marine coastal microbial communities (Submitted in ISME Journal).

1 **High abundance of bacteria with quorum quenching activity in dense marine**
2 **coastal microbial communities**

3

4 **Running title: Quorum quenching in marine bacteria**

5

6 **Manuel Romero, Ana-Belen Martin-Cuadrado*, Arturo Roca-Rivada, Ana María Cabello and Ana**
7 **Otero**

8

9 Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS, Universidad de Santiago
10 de Compostela, Spain.

11 *Evolutionary Genomics Group, Departamento Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel
12 Hernández, San Juan de Alicante, Spain.

13

14 **Corresponding author:** Ana Otero, Dep. Microbiología y Parasitología, Fac. Biología-CIBUS, Univ. de
15 Santiago de Compostela, 15782 Santiago, Spain. Tel. +34 981563100 ext 16913, Fax: +34 981 528006.

16 E-mail: anamaria.otero@usc.es

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 **Abstract**

32 Acyl-homoserine lactone (AHLs) mediated quorum-sensing processes seem to be common in the marine
33 environment and among marine pathogenic bacteria, but no data are available on the prevalence of
34 bacteria capable of interfering with QS in the sea, a process that has been generally termed “quorum
35 quenching” (QQ). In a first approach to the characterization of QQ activity in the marine environment,
36 166 strains isolated from different marine dense microbial communities, including the surface of the
37 brown alga *Fucus vesiculosus*, a biofilm from a marine water reservoir tank and the sediment from a fish
38 culture closed circuit, were screened for their ability to interfere with AHL activity. A 14,5% of the
39 isolated strains were able to eliminate or significantly reduce *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-
40 HSL) activity as detected by the biosensor strain *Chromobacterium violaceum* CV026, a much higher
41 percentage than that reported for soil isolates. The percentage of active isolates was even higher (40%)
42 among those obtained from *F. vesiculosus*. Fifteen strains were also able to inhibit *N*-decanoyl-L-
43 homoserine lactone (C10-HSL) activity and their capacity to degrade AHLs was further characterized by
44 HPLC, confirming that all of them enzymatically inactivated the AHL signals. Active isolates belonged to
45 nine different genera of prevalently or exclusively marine origin, including members of the α - and γ -
46 *Proteobacteria* (8), *Actinobacteria* (2), *Firmicutes* (4) and *Bacteroidetes* (1) and only three of them
47 belonged to genera in which soil isolates have been previously described to have QQ activity. Whether
48 the high frequency and diversity of cultivable bacteria with QQ activity found among those isolated from
49 near-shore marine derived samples reflects their prevalence among pelagic marine bacterial communities
50 deserves further investigation in order to understand the ecological importance of AHL-mediated QS and
51 QQ processes in the marine environment.

52

53 **Keywords**

54 Quorum sensing/Quorum quenching/AHL/Lactonase/Acylase/Marine bacteria

55

56

57

58

59

60 Introduction

61 Many bacterial species respond to environmental changes using a community genetic regulation
62 mechanism that has become known as “quorum sensing” (QS) (Fuqua et al, 1994). This phenomenon
63 constitutes a bacterial communication system based on the production and secretion of small signal
64 molecules called autoinducers that accumulate in the culture media when high cell densities are reached.
65 Once a threshold intracellular concentration is attained, the signalling molecule triggers synchronous
66 expression of multiple genes in the population. Using QS bacterial populations can coordinate important
67 biological functions such as plasmid conjugal transfer, motility, swarming, aggregation, luminescence,
68 antibiotic biosynthesis, virulence, symbiosis, siderophore production or biofilm maintenance and
69 differentiation (Swift et al, 2001; Waters & Bassler, 2005; Williams et al, 2007). While several
70 chemically distinct families of QS signal molecules have now been described (Ryan & Dow, 2008), the
71 best characterized QS signalling system involves *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), a family of
72 molecules consisting of a homoserine lactone ring which is *N*-acylated with a fatty acyl
73 group at the α -position. AHLs differ in the acyl side chain, which usually contains between 4 and 18
74 carbons in length, with or without saturation or C3 hydroxy- or oxo- substitutions (Whitehead et al,
75 2001). These signals have been initially described as being exclusively produced by a relatively small
76 number of proteobacteria (Whitehead et al, 2001; Fuqua & Greenberg, 2002; Williams et al, 2007), but
77 recently the production of these signals has been also reported for the colonial cyanobacterium
78 *Gloeotheca* (Sharif et al, 2008) and different marine Bacteroidetes (Huang et al, 2008; Romero et al,
79 2010) which may reinforce the role of QS systems in the natural populations/environment.
80 As bacterial species that employ QS are expected to have competitive advantages in the ubiquitous
81 interactions with other prokaryotes and eukaryotes, it is rational that competitors have evolved
82 mechanisms to disarm their QS systems. The mechanisms causing the inactivation of QS communication
83 systems have been generally termed as “quorum quenching” (QQ) (Dong et al, 2001; Dong et al, 2007),
84 although some authors prefer to restrict this term to the enzymatic degradation of the AHL signals
85 (Kjelleberg et al, 2008). QQ mechanisms described so far in nature include the production of inhibitors or
86 antagonists of signal reception by marine algae and invertebrates (Givskov et al, 1996; Kim et al, 2007;
87 Skindersoe et al, 2008), terrestrial plants (Gao et al, 2003) and bacteria (Teasdale et al, 2009) and the
88 enzymatic inactivation of signals found in mammalian cells (Xu et al, 2003; Chun et al, 2004), plants
89 (Delalande et al, 2005) and in different bacteria (reviewed by Dong & Zhang, 2005). Two groups of

90 AHL-degradation enzymes have been identified so far. The acylases that cleave the AHL amide bond
91 generating the corresponding free fatty acid and homoserine lactone (HSL) ring (Dong et al, 2007), have
92 been described in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp., *Rhodococcus*
93 *erythropolis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Shewanella* sp. and *Variovorax paradoxus* (Leadbetter &
94 Greenberg, 2000; Lin et al, 2003; Park et al, 2005; Uroz et al, 2005; Huang et al, 2006; Sio et al, 2006;
95 Morohoshi et al, 2008a; Romero et al, 2008). The lactonases hydrolyse the HSL ring of the AHL
96 molecule to produce corresponding acyl homoserines. Lactonase activity has been identified in
97 *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* and several strains of the genus *Bacillus* but is also present in some gram-
98 negative bacteria such as *Klebsiella* and *Agrobacterium* (Dong & Zhang, 2005; Dong, et al, 2007). An
99 additional mechanism of inactivation of AHLs based on the enzymatic production of the oxidized halogen
100 HOBr, that reacts specifically with 3-oxo-acyl HSLs, has been described for the brown alga *Laminaria*
101 *digitata* (Borchardt et al, 2001). However, the specificity of these enzymes as signal quenchers has been
102 questioned recently as AHL-lactonases have been related to the catabolism of γ -butyrolactone (Khan &
103 Farrand, 2009) and show homology to the β -lactamases family (Dong et al, 2007). Also, AHL-acylases
104 show homologies with cephalosporin acylases and other N-terminal (Ntm) hydrolases (Dong et al, 2007)
105 and AhlM, the AHL-acylase from *Streptomyces* sp. has been shown to catalyse the hydrolysis of
106 penicillin G (Park et al, 2005).

107 Although QS and QQ processes were both discovered in marine organisms (Nealson et al, 1970; Givskov
108 et al, 1996) little attention has been paid so far to their ecological significance in the marine environment.
109 Evidence is beginning to accumulate on the importance of AHL-mediated QS processes in the sea.
110 Almost 60% of the α -proteobacteria isolated from different marine samples, including free-living and
111 algae-associated strains, were able to activate AHL sensor strains, although the presence of AHLs could
112 not be confirmed in all of them (Wagner-Dobler et al, 2005). The low bacterial population encountered in
113 the open sea and the low chemical stability of AHLs in seawater have lead to the suggestion that the
114 AHL-mediated QS activity may be concentrated in specific micro-habitats such as biofilms, marine snow
115 and eukaryotic niches (Cicirelli et al, 2008; Hmelo & Van Mooy, 2009). Indeed, the search for
116 homologues of the LuxI and LuxR proteins, that are the AHL signal generators and sensors respectively,
117 in the available marine metagenomes produced a low number of candidates probably because mainly
118 free-living bacteria are represented in marine metagenomes (Case et al, 2008). On the contrary, a high
119 percentage of AHL producing strains was reported for isolates from subtidal biofilms (Huang et al, 2008)

120 and sponges (Mohamed et al, 2008), although a much lower frequency was found among marine snow
121 and microalgal isolates (Gram et al, 2002). AHLs also seem to have an important role in the eukaryotic-
122 prokaryotic interactions in the marine environment, as demonstrated by the importance of the presence of
123 AHLs for selection of surface sites with bacterial biofilm for permanent attachment of zoospores of the
124 green alga *Ulva* (Tait et al, 2005), for spores liberation of the red alga *Acrochaetium* sp. (Weinberger et
125 al, 2007) and for some initial larval settlement behaviours in the polychaete *Hydroides elegans* (Huang et
126 al, 2007). Moreover, the production of AHLs is common among marine fish pathogenic bacteria
127 including *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio*
128 *vulnificus*, *Vibrio harveyi*, or *Vibrio anguillarum* (Freeman & Bassler, 1999; Swift et al, 1999; Croxatto et
129 al, 2002; Buch et al, 2003; Kim et al, 2003; Bruhn et al, 2005), controlling the expression of important
130 virulence factors (Defoirdt et al, 2004). Due to the prevalence of QS systems amongst these pathogens,
131 the possibility of the use of the inhibition of QS processes to control infection has been proposed as an
132 alternative to the use of antibiotics (Dong & Zhang, 2005; Dong et al, 2007; Defoirdt et al, 2004) and the
133 feasibility of this approach has been already demonstrated (Rasch et al, 2004).

134 Information on QQ processes in the marine environment is still scarce; although some indirect evidence
135 exists that indicate that these phenomena could be frequent. AHL signals degrade more rapidly in natural
136 seawater than in artificial seawater, an observation that has been related to the presence of QQ enzyme
137 activity (Hmelo & Van Mooy, 2009). Moreover, the addition of AHLs to the culture media enhanced the
138 cultivation efficiency in marine natural populations, which may indicate that AHLs are readily available
139 in the marine environment (Bruns et al, 2002). Despite this, no studies have been done neither on the
140 presence of QQ activity among marine bacteria nor on its ecological significance. In contrast, many
141 studies describe the presence of QQ activity in soil samples, including soil metagenome screenings
142 (Williamson et al, 2005; Riaz et al, 2008; Schipper et al, 2009), that have allowed the isolation of several
143 strains/genes capable to degrade AHLs and the establishment of the prevalence of QQ processes in soil
144 samples (Leadbetter & Greenberg, 2000; Park et al, 2003; Uroz et al, 2003; Wang & Leadbetter, 2005).

145 Recently, Tinh et al (2007) have successfully applied AHL enrichment cultures to demonstrate the
146 capability of bacterial communities from the gut of farmed shrimp to degrade the signals, although neither
147 the marine bacteria responsible for that activity have been identified nor the type of activity characterised.
148 The marine bacterium *Halobacillus salinus* has been also described to produce secondary metabolites that
149 are able to antagonize the action of AHLs (Teasdale et al, 2009) and You et al (2007) working with

150 marine *Streptomyces* found activity against AHLs signals although the kind of activity was also not
151 discerned.

152

153 The aim of this work was to study the presence of cultivable bacteria capable of interfering with AHL
154 mediated QS systems among isolates from marine coastal bacterial communities. Bacteria were isolated
155 from 3 different marine samples characterized by their high organic and microbiological load: the marine
156 algae *Fucus vesiculosus*, a diatom-dominated loosely attached biofilm from a filtered seawater reservoir
157 tank and the sediment from an inland fish culture tank. The enrichment culture technique in which AHLs
158 are the only source of carbon and/or nitrogen used in many studies (Leadbetter & Greenberg, 2000; Park
159 et al, 2003; Uroz et al, 2003; Tinh et al, 2007) was avoided, since it does not allow the establishment of
160 the prevalence of QQ activity in a particular environment. Moreover, the use of enrichment cultures is
161 focused on the isolation of enzyme producing bacteria, obliterating the possibility of the isolation of
162 inhibitors or antagonists producers.

163

164 **Materials and methods**

165 **Bacterial quantification and strains isolation**

166 Three different samples were taken with sterile laboratory material from different marine origins in June
167 2007 for bacterial isolation and screening for QQ activity against AHLs. Sample sites were selected for its
168 high microbial density . Two of the samples were obtained in a natural coastal environment in Illa de
169 Arosa (N 42°33' .45.32" W 8°53' .08.23" Spain): one from the diatom-dominated biofilm loosely
170 attached to the wall of an outdoor concrete tank (25,000 L), that was used as reservoir of filtered seawater
171 for an aquaculture facility and the other from the brown seaweed *F. vesiculosus* harvested from the rocks
172 of the intertidal zone close to it. The third sample was obtained from the sedimentation tank of a marine
173 closed fish culture circuit at the University of Santiago (Spain).

174 The solid media used for the bacterial isolation included rich media with high organic nutrient
175 concentration such as Triptone soy agar (TSA) 1% NaCl and Marine Agar (MA) suitable for eutroph
176 bacteria as well as formulations with low organic load such as Marine agar diluted 1/100 with seawater
177 (MA 1/100), filtered autoclaved seawater medium (FAS) supplemented with 1 g/L casaminoacids (FAS-
178 CAS) (Schut et al, 1993) and FAS medium supplemented with 0.5 g/L polymers: agarose, quitin and
179 starch (FAS-POL) (Bruns et al, 2002). Different ten-fold dilutions were prepared in sterilized sea water

180 for each of the samples and plated in the above mentioned culture media. Sediment and biofilm samples
181 were collected below the water level using a 50-mL sterile pipette and therefore contained a significant
182 amount of water. Samples were vigorously vortexed in order to obtain a homogeneous suspension for
183 dilutions. One gram of strained and sliced *F. vesiculosus* was added to 10 mL of sterilized sea water,
184 vigorously vortexed and used for dilutions. Plates were incubated at 15 and 22°C for 15 days. For the
185 estimation of colony forming units plates with 30-300 colonies were selected. A total of 166 colonies
186 were picked up and isolated on the bases of its different colour and morphology and used for QQ
187 screening. The 166 strains obtained were able to grown in MA at 22°C and therefore these culture
188 conditions were selected as standard for laboratory manipulation.

189 **QQ screening**

190 The 166 isolated strains were tested for their QQ activity in solid plate assays carried out with the AHL
191 biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al, 1997). The marine strains isolated were
192 grown in 1 mL of MB at 22°C and 200 rpm, after 24 hours 40 µL of a stock solution of *N*-hexanoyl-L-
193 homoserine lactone *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) were added to achieve a final
194 concentration of 2 µg/mL (10 µM), and incubated for further 24 hours. In order to detect the inhibition of
195 C6-HSL activity, 50 µL of the supernatants were spotted in duplicate in wells made in LB plates overlaid
196 with 5 mL of a 1/100 dilution of an overnight culture of *C. violaceum* CV026 in soft LB (8% agar) and
197 diluted with 50 µL of sterile distilled water. Sterile MB and MB plus the same amount of C6-HSL were
198 used as controls in all plates. In order to check the spectrum of substrates of the QQ activity, positive
199 strains were further analysed for their capacity to eliminate *N*-Decanoyl-L-homoserine lactone (C10-
200 HSL) activity from the culture medium using the biosensor strain *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi et al,
201 2008b) and the same methodology. The capacity to interfere with *N*-Oxododecanoyl-L-homoserine
202 lactone (OC12-HSL) was tested with the lux-based biosensor strain *E. coli* JM109 pSB1075 (Winson et
203 al, 1998). OC12-HSL was added to 1 mL of an overnight culture of the marine QQ strains in MB (final
204 concentration 2 µg/mL) and incubated for 24 hours at 22°C. The remaining AHL activity in the culture
205 media was evaluated in LB plates overlaid with 5 mL of semi-solid LB agar seeded with 50 µL of an
206 overnight culture at 37°C 200 rpm of *E. coli* JM109 pSB1075. 50 µL of culture supernatants were loaded
207 in wells. Sterile MB and MB plus OC12-HSL were set as controls. Plates were incubated for 3 hours at
208 37°C and the production of light derived from AHL activity was examined.

209 Statistical analysis for of the effect of temperature, culture media and origin of the sample on the number
210 of QQ active strains recovered was carried out using Fisher test and Pearson Chi square tests at
211 significance level $\alpha=0.05$, with SPSS statistics V17.0 (SPSS, inc.) program.

212 **Confirmation of AHL degradation activity by HPLC-MS**

213 In order to determine whether the 15 stains presenting QS inhibition activity against C6 and C10-HSL in
214 the plate bioassays were producing an AHL inhibitor/antagonist or were enzymatically degrading the
215 signal, the final concentration of AHL in the culture media was evaluated using HPLC-MS. *N*-butyryl-L-
216 homoserine lactone (C4-HSL) and *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C12-HSL) were added to 1 mL
217 of 24 hours cultures of the selected strains at a final concentration of 50 μ M and incubated for another 24
218 hours at 22°C and 200 rpm. 500 μ L of spent culture media obtained after centrifugation (2000g, 5 min)
219 were directly extracted while another 500 μ L were acidified with HCl to a pH of 2 and incubated for 24
220 hours at 25 °C prior to extraction in order to facilitate the recovery of the AHL activity derived from the
221 hydrolysis of the lactone ring derived from the action of lactonases (Yates et al, 2002). Culture
222 supernatants were extracted 3 times with an equal volume of ethyl-acetate, evaporated under flux of
223 nitrogen and re-suspended in 200 μ L of acetonitrile for HPLC-MS analysis and quantification. MB
224 samples supplemented with the same amount of C4 or C12-HSL were processed and extracted in the
225 same way and used as controls.

226 Analysis were carried out with a HPLC 1100 series (Agilent USA) equipped with a C8 precolumn
227 (2.1x12.5 mm, 5 μ m particle size) and a ZORBAX Eclipse XDB-C18 2.1 x 150 mm (5 μ m particle size)
228 column that was maintained at 45°C. The mobile phase was built by 0.1% formic acid in water (A), and
229 0.1% formic acid in acetonitrile (B) (Ortori et al, 2007). The flow rate was 0.22 mL/min. The elution
230 conditions were as follows: 0 min 35%B, linear gradient to 60%B in 10 min and then a linear gradient
231 from 60% to 95% B over 5 min, then 5 min 95%B and then ramped back to starting conditions in 9 min.
232 The column was re-equilibrated for a total of 5 min. A 2 μ L volume was injected onto the column. The
233 MS experiments shown were conducted on an API 4000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied
234 Biosystem, CA, USA) equipped with a TurboIon source using positive ion electrospray, multiple reaction
235 monitoring (MRM) mode. The MRM signals were used to generate relative quantification information by
236 comparison with a calibration curve constructed for molecular ion abundance, using each of the
237 appropriate AHL synthetic standards (Milton et al, 2001).

238 16S-based Bacterial identification and phylogenetic analysis

239 The identification of the strains was carried out by amplifying and partial sequencing of the 16S rRNA
240 gene (approximate length of the amplicons of 1300 bp). Genomic DNA from the different isolates were
241 extracted (Puregene Tissue Core Kit B) and bacterial 16S rRNA gene was amplified using the universal
242 primers ANT1 (forward, position 8-27) (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG) and S (reverse, position
243 1491-1509) (5' GGTTACCTTGTTACGACTT) (Martinez-Murcia & Rodriguez-Valera, 1994). PCR
244 reactions were carried out under the following standard conditions: 35 cycles (denaturation at 94°C for
245 15 s, annealing at 50°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min) preceded by 2 min denaturation at 94°C and
246 followed by 7 min extension at 72°C. PCR products were partially sequenced, revised and corrected with
247 BioEdit Sequence Alignment Editor program (v. 7.0.9.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).
248 A total of fifteen 16S rDNA sequences were identified and compared with 16S rRNA gene sequences
249 available in the GenBank using NCBI BLAST (Altschul et al, 1997) and the Ribosomal Database Project
250 (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). 16S rRNA gene sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004)
251 with their closest relatives in databases as identified by BLAST and those isolates with an acylase or
252 lactonase previously identified or with known QQ activity. In order to eliminate gaps and unambiguously
253 aligned positions, Gblocks was used (Castresana, 2000) yielding 649 positions available for constructing
254 the tree. Phylogenetic analysis was then performed using the MEGA4 phylogenetic tool software package
255 (Zmasek & Eddy, 2001; Kumar et al, 2004) using the default parameters.

256 The sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers to XXXX. XXXXX.

257

258 Results**259 Bacterial growth and isolation**

260 As expected, very different results in the number of colony forming units (CFUs) were obtained
261 depending on the culture medium and growth temperature for each of the samples (Figure 1). The sample
262 with a highest bacteria population was that obtained from the sediment from the fish culture tank,
263 reaching 3×10^6 CFUs mL⁻¹. Highest CFUs obtained from the water tank biofilm were one order of
264 magnitude lower, while the number of viable bacteria isolated from *Fucus vesiculosus* was low, reaching
265 30000 CFUs mL⁻¹ at best. Growth temperature and more importantly the culture media used for isolation
266 also had a great influence on the number of viable bacteria isolated. Higher temperature (22°C) allowed
267 the growth of a higher number of colonies in almost all cases. Diluted Marine Agar (MA 1/100) and FAS-

268 CAS were most effective for CFU recovery in the sediment and biofilm samples, while in the *F.*
269 *vesiculosus* sample, Marine Agar and FAS-POL were equally effective at high temperature, yielding 3
270 times more CFUs than the other culture media (Figure 1).

271 A total of 166 isolates were obtained from the selected marine environments for QQ screening on the
272 basis of distinct colony morphology, 85 strains from the tank sediment sample, 48 from tank biofilm and
273 33 from *F. vesiculosus* (Table 1). It should be noted that since the same species may present different
274 colony morphologies in different culture media, the technique applied does not preclude the multiple
275 isolation of the same strain from different plates. Despite the higher CFU/mL obtained with oligotrophic
276 culture media in the first two samples (Figure 1), around half of the isolates used for QQ screening were
277 obtained from richer media, TSA 1% NaCl and MA, due to the higher variability of colonies observed. In
278 the case of the sediment sample more than 70% of the isolates came from these rich culture media while
279 in the biofilm sample most strains were isolated from the FAS culture media (Table 1). The number of
280 strains isolated at the two different temperatures used was very similar: 91 strains were isolated from
281 plates maintained at 22°C and 75 strains were isolated from plates maintained at 15°C (data not shown).

282 **Bioassay-based detection of quorum sensing inhibition activity**

283 Initially the screening for QQ activity was carried out using a liquid assay in microtiter plates with two
284 lux-based *E. coli* biosensor strains (Winson et al, 1998). This assay produced numerous false positives
285 since it did not allow distinguishing growth inhibition from QQ (data not shown). A solid plate assay was
286 then carried out using the violacein-producing reporter strain *C. violaceum* CV026 that allowed the
287 detection of the inhibition of C6-HSL activity. This assay enabled us to directly differentiate the strains
288 presenting growth-inhibition activity from those with a real QQ activity. The *C. violaceum* CV026 solid
289 assay permitted the identification of 24 strains with QQ activity, which represents a 14.5% of the isolated
290 strains (Table 1). No statistically significant effect of the culture media used for the isolation was found
291 on the percentage of strains with QQ activity (Table 1, Chi square test, $p>0.05$). Fifty per cent of the
292 active strains were isolated at 22°C and therefore the effect of isolation temperature was not statistically
293 significant (Fisher exact test, $p>0.05$). On the contrary an important effect of the origin of the sample on
294 the percentage of strains with QQ activity was found (Table 1, Chi square test, $p<0.05$). While strains
295 isolated from the tanks presented a percentage of QQ activity between 6 and 9% (Table 1), almost a 40%
296 of the strains isolated from the *F. vesiculosus* were active against C6-HSL (Table 1).

297 The capacity to interfere with C10-HSL and OC12-HSL of the 24 strains being able to inactivate C6-HSL
 298 was further tested using the biosensor strains *C. violaceum* VIR07 and *E. coli* JM109 pSB1075
 299 respectively. Among them only 15 were able to completely eliminate the activity of both C10-HSL as
 300 detected by *C. violaceum* VIR07 within 24 hours (Figure 2) and therefore these strains were selected for
 301 further characterization of QQ activity and identification. These strains were isolated from *F. vesiculosus*
 302 (7), fish tank sediment (7) and water tank biofilm (1) (Table 2). Ten out of these 15 strains were also able
 303 to completely suppress the OC12 activity detectable to the biosensor (Table 2), indicating that a wide
 304 range of AHLs can be inactivated by these strains.

305 **Characterization of QQ activity by HPLC-MS analysis**

306 All 15 strains being able to eliminate the activity of C6 and C10-HSL in the plate bioassay were able to
 307 significantly reduce the concentration of C4 and C12-HSL as measured by HPLC-MS (Figure 3). The
 308 final pH of cultures after the 24 hours degradation assay was lower than 7 in all cases and therefore the
 309 spontaneous lactonization of the AHLs due to high pH values can be disregarded. This result indicated the
 310 presence of enzymatic degradation activity in all the strains.

311 The recovery of AHL concentration derived from acidification of the spent culture media to pH 2, that
 312 drives spontaneous reformation of the lactone ring opened by lactonase activity, was more frequent for
 313 C4-HSL (Figure 3). Only strain 177, a novel species of α -Proteobacteria related to *Phaeobacter*; strain 2,
 314 identified as *Hyphomonas* sp.; strain 168, identified as *Alteromonas* sp., and strain 24, identified as
 315 *Bacillus circulans* produced an almost complete degradation of both AHLs that could not be significantly
 316 recovered by acidification, indicating an enzymatic activity different from lactonase. Several strains such
 317 as strain 20J (identified as a *Tenacibaculum discolor*) present a different degradation profile for short and
 318 long AHLs indicating more than one type of enzymatic activity, while others belonging to the genera
 319 *Stappia* (strains 5, 176 and 97-1), *Oceanobacillus* (strains 172, 30 and 97-2) and *Halomonas* (strain 33)
 320 seem to present a wide-spectrum lactonase activity, since the amount of AHL is partially recovered after
 321 acidification of the spent culture media (Figure 3).

322 **Bacteria identification and database search**

323 The sequences of the 16S rRNA gene of the 15 selected isolates were obtained and used for a BLAST
 324 search against sequences in GenBank in order to assess their taxonomic affiliation. The nearest isolate
 325 identification is shown in Table 2. Of the 15 isolates, two of them belonged to γ -proteobacteria (33 and

326 168), six to the α -Proteobacteria (5, 97-1, 176, 2, 61 and 177), six to Firmicutes (24, 30, 97-2 and 172),
327 two to the Actinobacteria (50 and 173) and one to the Bacteroidetes (20J).

328 Among the 15 characterized isolates only three of them: strain 24 (*Bacillus circulans* 98% identity) and
329 strains 50 and 173, (*R. erythropolis*, 99% and 100% identity respectively) belong to genera in which
330 terrestrial isolates had been previously described to have QQ activity (Dong et al, 2002; Uroz et al, 2003).

331 Although the presence of *Bacillus* species is not uncommon in marine samples (Ivanova et al, 1999),
332 strain 24 was isolated from the sediment of an inland fish culture system and therefore a terrestrial origin
333 cannot be excluded. Two isolates obtained from different sources, strain 24 from fish tank sediment and
334 strain 173 from *F. vesiculosus*, were identified as *R. erythropolis* (Table 2), indicating that this species is
335 also a common representant in the marine QQ bacterial communities. The genus *Rhodococcus* is widely
336 distributed in aquatic and terrestrial habitats and several species of this genus are able to degrade AHLs,
337 all of them of terrestrial origin (Uroz et al, 2008).

338 All the new isolates presenting QQ activity belong to genera typical of marine environments despite many
339 of them were able to grow in TSA-1 (Table 2). The α -proteobacteria *Stappia* sp. (strains 5, 176 and 97-1),
340 a genus that comprises several marine species formerly classified as belonging to *Agrobacterium*, and the
341 firmicute *Oceanobacillus* sp. (strains 172, 30 and 97-2), a genus comprising many facultative alkaliphilic
342 and marine species, seem to be abundant and ubiquitous since representatives from both genera could be
343 isolated several times from samples of very different origin (*F. vesiculosus* and fish tank sediment).

344 Among the strains isolated from *F. vesiculosus*, *Hyphomonas* sp. (strain 2) belongs to the group of marine
345 prosthecate bacteria that are typical algal epibionts (Poindexter, 2006), while *Alteromonas* sp. (strain 168)
346 is a genus of marine γ -proteobacteria frequently isolated from diverse marine environments, including
347 algae (Gauthier & Breittmayer, 1992). Both species were unable to grow in TSA-1 (NaCl 1%) indicating
348 its strict marine origin (Table 2). Finally, strain 177 represents a new species of α -Proteobacteria that is
349 related (ID 96%) to *Phaeobacter* sp. a genus of marine bacteria proximate to the *Roseobacter* clade
350 (Martens et al, 2006; Figure 4), although more close relatives have been described among non cultivable
351 bacteria (Jones et al, 2007).

352 Among the isolates obtained from the fish tank sediment, strain 20J presented a 99% identity with the fish
353 pathogen *Tenacibaculum discolor*. The genus *Tenacibaculum* belongs to the *Cytophaga-Flavobacterium-*
354 *Bacteroides* cluster (CFB), also known as Bacteroidetes, which constitutes one of the dominant
355 heterotrophic bacterial groups in aquatic habitats and includes several species causing the marine fish

356 “gliding bacterial disease” or tenacibaculosis/flexibacteriosis. Surprisingly, strain 20J was isolated in
357 TSA-NaCl 1%, a characteristic that would exclude its classification as a member of this species (Piñeiro-
358 Vidal et al, 2008). Strain 33 was identified as a member of the genus *Halomonas* (ID 99%), a group of
359 mainly marine γ -proteobacteria that includes several moderately halophilic strains.
360 The only active strain isolated from the surface biofilm of the water tank -strain 61- was identified as
361 *Roseovarius aesturarii* (ID 99%), a genus of strictly marine α -Proteobacteria (Labrenz et al, 1999). This
362 species belongs to the *Roseobacter* lineage that is estimated to comprise 20 to 30% of the 16S rRNA gene
363 sequences in the photic zone of marine environments (Wagner-Dobler & Biebl, 2006).
364 The relationships among the 15 strains sequenced and other 16S-rRNA gene sequences from other
365 isolates with QQ activity (Carrier et al, 2003; Kang et al, 2004; Uroz et al, 2007) are shown in the
366 dendrogram of Figure 4 (*Delftia* sp. A317 and *Ochrobactrum* sp. A44, which have QQ activity, were not
367 included in the analysis due to the short read 16S sequence).

368

369 **Discussion**

370 This study reveals that quorum quenching (QQ) is a common feature among cultivable bacteria isolated
371 from dense marine bacterial communities. The percentage of isolated strains being able to eliminate
372 AHL-activity obtained in this study, 14.4% (Table 1), is much higher than the percentages obtained so far
373 in soil and plant isolates. In the pioneer study that enabled the cloning of the first lactonase from the
374 genus *Bacillus* (Dong et al, 2000), only 24 out of 500 strains (4.8%) isolated from soil were active against
375 AHLs. The percentages of active strains obtained in later studies for soil samples were even lower, being
376 only slightly higher than 2% (Dong et al, 2002; D’Angelo-Picard et al, 2005). A screening of more than
377 10,000 clones of a soil metagenomic library produced a single clone being able to degrade AHLs (Riaz et
378 al, 2008), while the screening of more than 7000 soil metagenomic clones allowed the identification of 3
379 clones with lactonase activity (Schipper et al, 2009). These low percentages of activity may not be
380 representative of the real QQ activity present in soil due to the intrinsic difficulties of recovering
381 enzymatic activity from fosmid-based metagenomic libraries. On the contrary, 2 out of 16 isolates of a
382 biofilm from a water-treatment system presented QQ activity (Lin et al, 2003), indicating already the high
383 activity present in highly organic aquatic environments.
384 The QQ screening procedure used in this work avoided the use of enrichment cultures based on the ability
385 of grow with AHLs as sole source of carbon and nitrogen that have been used in many studies (Leadbetter

386 & Greenberg, 2000; Park et al, 2003; Uroz et al, 2003; Park et al, 2006), in order to obtain a wide picture
387 of the prevalence and ecological significance of QQ activities in these marine coastal samples. One of the
388 more striking results is that all the isolates actively degraded the AHLs even in highly organic media, in
389 which other carbon sources are more readily available. Therefore, the capacity of AHL degradation is not
390 merely a metabolic activity directed to obtaining energy, but an enzymatic ability that is expressed
391 constitutively and probably confers some kind of adaptive advantage over competitors. The adequate
392 selection of the screening method was crucial in order to detect this high number of active strains. The
393 assays based on *C. violaceum* CV026 and VIR07 resulted much more robust than the lux-based *E. coli*
394 bioassays, permitting the identification of a high number of false positives produced by the *E. coli*
395 bioassay that inhibited the growth of the biosensor.

396 Although a strong effect of the culture media used for isolation on the number of QQ active isolates was
397 expected, such effect could not be confirmed. On the contrary, a strong effect of the origin of the sample
398 on the number of strains with QQ activity was found. Almost 40% of the strains isolated from *F.*
399 *vesiculosus* were able to degrade AHLs. The *Fucus* and the water tank biofilm samples were exposed to
400 the same coastal water; on the contrary, the fish tank sediment was obtained from an inland recirculating
401 culture system and was exposed to a much higher organic load, as reflected by the high CFU values
402 obtained for this sample. Therefore, no direct correlation between organic load and quorum quenching
403 activity can be concluded. The extremely high percentage of QQ activity obtained in *Fucus* isolates
404 sustains the existence of strong microbial interactions in the eukaryotic-prokaryotic boundary that
405 promote unique biological activities (Gao et al, 2003; Egan et al, 2008).

406 Besides the higher abundance, the diversity reported for AHL-degrading bacteria isolated from the marine
407 samples is much higher than that reported from soil and plant isolates. Members of 9 different genera
408 belonging to the α and γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes (Figure 4) were
409 isolated from our marine samples and a novel species related to *Phaeobacter* has been identified (strain
410 177). Almost all the active isolates belong to genera prevalently or exclusively marine, excluding their
411 terrestrial origin despite the coastal character of the samples. Only three of the isolates belong to genera
412 (*Bacillus* and *Rhodococcus*) in which terrestrial isolates had been previously described to have QQ
413 activity (Dong et al, 2002; Uroz et al, 2003). In contrast, in a screening of 800 soil strains, all the
414 characterized isolates with strong activity belonged to the genus *Bacillus* (Dong et al, 2002). In a separate
415 study AHL-degraders belonging to both *Bacillus* sp. and the α -proteobacteria could be isolated from

416 tobacco rhizosphere, but again only *Bacillus* species could be isolated from the same soil (D'Angelo-
417 Picard et al, 2005).

418 Although the high concentration of AHL used in the inhibition bioassays almost excluded that positive
419 strains selected were producing a competitive inhibition of the AHL receptor by the production of other
420 AHLs or AHL-like substances, the enzymatic activity of the 15 selected strains was confirmed using
421 HPLC-MS techniques (Figure 3). The HPLC results demonstrated that all 15 selected strains actively
422 degraded both, C4-HSL and C12-HSL. The acidification of the culture media after the degradation assay
423 allowed the identification of a possible lactonase activity in the strain, since the lactone ring is recovered
424 at low pH (Yates et al, 2002). Lactonase activity seems to be widespread in the genus *Bacillus* (Dong et
425 al, 2002) but the acidification of the media after AHL degradation in our *B. circulans* isolate did not allow
426 the recovery of any of the C12-HSL activity and only a little of C4-HSL (Figure 3) indicating a type of
427 enzymatic activity different from the lactonase described so far for this genus. It remains to be confirmed
428 if a possible AHL-oxidase as that reported for *B. megaterium* (Chowdhary et al, 2007; Cirou et al, 2009)
429 is responsible for the QQ capacity of our marine *B. circulans* isolate (strain 24).

430 *R. erythropolis* strain W2 is a peculiar strain since it has been demonstrated to be able to inactivate a wide
431 range of AHLs using three diverse enzymatic mechanisms: a lactonase, an amidohydrolase -or acylase-
432 and an oxidoreductase activity that reduces 3-oxo-N-AHLs to their hydroxylated equivalents (Park et al,
433 2006; Uroz et al, 2008). This unique combination could not be found in other terrestrial *R. erythropolis*
434 strains, in which only lactonolysis seem to be active for degrading AHLs (Uroz et al, 2008). Although a
435 more detailed study on the enzymatic activities present in our marine *R. erythropolis* isolates is required,
436 the HPLC analysis of the degradation of C12-HSL demonstrated that the peak could not be recovered
437 after acidification of the culture media (Figure 3) and therefore an enzymatic activity other than
438 lactonolysis should be active in both isolates. On the contrary C4-HSL could be partially recovered after
439 acidification (Figure 3), and therefore a complex enzymatic activity as that reported for *R. erythropolis*
440 W2 is proposed for these marine strains, that may deserve further characterization.

441 Two of the isolates obtained from the fish tank sediment, strain 20J, identified as *Tenacibaculum*
442 *discolor* (99%) and strain 33, identified as *Halomonas* sp. (99%) and the only active isolate obtained from
443 the water tank biofilm, identified as *Roseovarius aestuarii* (99%) belong to genera that have been
444 previously described as being AHL producers (Llamas et al, 2005, Wagner-Dobler et al, 2005; Romero et
445 al, 2010). *R. aestuarii* belongs to the abundant marine Roseobacter lineage that has been proposed as the

446 numerically dominant AHL producers in the marine environment, at least among the cultivable groups
447 (Cicirelli et al, 2008). The production of C4-HSL has been recently described for the fish pathogen
448 *Tenacibaculum maritimum* (Romero et al, 2010) and some *Halomonas* strains seem to promote larval
449 settlement (Holmstrom & Kjelleberg, 2000), a feature that could be related to the production of AHLs
450 reported for some polysaccharide-producing species of the genus (Llamas et al, 2005). The possible
451 differences in AHL production and degradation in these genera constitute a good experimental tool for the
452 study of the importance of AHLs in biofilm formation and biofouling processes in the marine
453 environment (Dobretsov et al, 2009).

454 The search in the available genomes of the QQ active species revealed the presence of QQ sequences in
455 several of them (Table 2). In some cases, such as the *Stappia* strains, that present a clear lactonase
456 activity, the retrieved sequence is consistent with the type of AHL degradation revealed by the
457 preliminary HPLC-MS analysis. On the contrary, in the case of the *Oceanobacillus* spp., the HPLC
458 analysis indicates a lactonase-like activity, while only an acylase sequence could be found in the genome
459 with significant homology to known QQ enzymes. The cloning of the enzymes responsible for the QQ
460 activity in these novel species will surely extend our knowledge on their variability and modes of action.
461 Moreover, further characterization of these marine isolates and their activity may drive to the
462 development of biotechnological applications especially in the field of aquaculture (Defoirdt et al, 2007).

463 The high percentage of QQ strains isolated in the present study seem to indicate that QQ is a usual
464 strategy adopted in the marine media to achieve competitive advantages, at least in the nutrient-rich
465 coastal environments. This was especially true for the bacteria isolated from *F. vesiculosus*, indicating
466 strong bacterial interactions in the surface of algae. More detailed studies on the presence of QQ activity
467 in cultivable bacteria in the open ocean would probably add useful information in order to elucidate the
468 ecological importance of AHL-mediated QS and QQ processes in the marine environment.

469

470 **Acknowledgements**

471 This work was financed by a grant from Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia
472 PGIDIT06PXIB200045PR. Manuel Romero was supported by a FPU fellowship from the Spanish
473 Ministry of Science and Education and a predoctoral fellowship from Diputación de A Coruña. Ana-
474 Belen Martin-Cuadrado was supported by a Juan de la Cierva scholarship, from the Spanish Ministerio de
475 Ciencia e Innovación. We would like to thank Noemi Ladra for her support on the LC-MS analysis. C.

476 *violaceum* CV026 and VIR07 biosensor strains were kindly provided by Prof. M. Cámara from the
 477 University of Nottingham and Prof. T. Morohoshi from Utsunomiya University respectively.

478

479 **References**

- 480 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped
 481 BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*
 482 25:3389-3402.
- 483 Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF, McCoy WF. (2001). Reaction of acylated
 484 homoserine lactone bacterial signalling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl Environ*
 485 *Microbiol* 67:3174-3179.
- 486 Bruhn JB, Dalsgaard I, Nielsen KF, Buch C, Larsen JL, Gram L. (2005). Quorum sensing signal
 487 molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis Aquat Org*
 488 65:43-52.
- 489 Bruns A, Cypionka H, Overmann J. (2002). Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the
 490 cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol*
 491 68:3978-3987.
- 492 Buch C, Sigh J, Nielsen J, Larsen JL, Gram L. (2003). Production of acylated homoserine lactones by
 493 different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Syst Appl*
 494 *Microbiol* 26:338-349.
- 495 Carlier A, Faure D, Latour X, Uroz S, Fray R, Smadja B, Dessaux Y. (2003). The Ti plasmid of
 496 *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine
 497 lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* 69:4989-4993.
- 498 Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and
 499 function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345-349.
- 500 Castresana J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in
 501 phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540-552.
- 502 Chowdhary PK, Keshavan N, Nguyen HQ, Peterson JA, Gonzalez JE, Haines DC. (2007). *Bacillus*
 503 *megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*
 504 46:14429-14437.

- 505 Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas*
506 *aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 101:3587-3590.
- 507 Cicirelli EA, Williamson H, Tait K, Fuqua C. (2008). Acylated homoserine lactone signaling in marine
508 bacterial systems. In: Winans SC, Bassler BL (eds). Chemical communication among bacteria. ASM
509 Press: Washington DC, pp 251-272.
- 510 Cirou A, Uroz S, Chapelle E, Latour X, Orange N, Faure D, Dessaux Y. (2009). Quorum sensing as a
511 target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium*. In: Gisi U, Chet I, Gullino ML. (eds).
512 Recent developments in management of plant diseases. Springer Dordrecht Heidelberg London: New
513 York pp 121-131.
- 514 Croxatto A, Chalker VJ, Lauritz J, Jass J, Hardman A, Williams P, *et al.* (2002). VanT, a homologue of
515 *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio*
516 *anguillarum*. J Bacteriol 184:1617-1629.
- 517 D'Angelo-Picard C, Faure D, Penot I, Dessaux Y. (2005). Diversity of N-acyl homoserine lactone-
518 producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. Environ Microbiol 7:1796-1808.
- 519 Defoirdt T, Boon N, Bossier P, Verstraete W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an
520 unexplored strategy to fight infections in aquaculture. Aquaculture 240:69-88.
- 521 Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. (2007). Alternatives to antibiotics to control
522 bacterial infections: luminiscent vibriosis in aquaculture as an example. Trends in Biotech 25:472-479.
- 523 Delalande L, Faure F, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasri M, *et al.* (2005). N-hexanoyl-l-
524 homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability
525 and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. FEMS Microbiol Ecol 52:13-20.
- 526 Dobretsov S, Teplitski M, Paul V. (2009). Mini-review: quorum sensing in the marine environment and
527 its relationship to biofouling. Biofouling 25:413-427.
- 528 Dong YH, Zhang LH. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. J Microbiol 43:101-109.
- 529 Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl
530 homoserine lactonases from *Bacillus* species. Appl Environ Microbiol 68:1754-1759.
- 531 Dong YH, Wang LH, Zhang LH. (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and
532 implications. Phil Trans R Soc B 362:1201-1211.
- 533 Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. (2001). Quenching quorum sensing-
534 dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411:813-817.

- 535 Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine
536 lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc Natl Acad Sci
537 USA 97:3526-3531.
- 538 Edgar RC. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.
539 Nucleic Acids Res 32:1792-1797.
- 540 Egan S, Thomas T, Kjelleberg S. (2008). Unlocking the diversity and biotechnological potential of
541 marine surface associated microbial communities. Curr Opin Microbiol 11:219-225.
- 542 Freeman JA, Bassler BL. (1999). A genetic analysis of the function of LuxO, a two component response
543 regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Mol Microbiol 31:665-77.
- 544 Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR LuxI family of cell
545 density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 176:269-275.
- 546 Fuqua WC, Greenberg EP. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev
547 Mol Cell Biol 3:685-695.
- 548 Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. (2003). Production of substances by *Medicago truncatula*
549 that affect bacterial quorum sensing. Mol Plant Microbe In 16:827-834.
- 550 Gauthier MJ, Breittmayer VA. (1992). The Genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. In: Balows A, Trüper
551 HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. (eds). The Prokaryotes, 2nd edn. Springer-Verlag: New York,
552 pp 3046-3070.
- 553 Givskov M, De Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, *et al.* (1996). Eukaryotic
554 interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. J Bacteriol 178:6618-6622.
- 555 Gram L, Grossart HP, Schlingloff A, Kjørboe T. (2002). Possible Quorum Sensing in Marine Snow
556 Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by *Roseobacter* Strains Isolated from Marine
557 Snow. Appl Environ Microbiol 68:4111-4116.
- 558 Hmelo L, Van Mooy BAS. (2009). Kinetic constraints on acylated homoserine lactone-based quorum
559 sensing in marine environments. Aquat Microb Ecol 54:127-133.
- 560 Holmstrom C, Kjelleberg S. (2000). Bacterial interactions with marine fouling organisms. In: Evans, LV
561 (ed). Biofilms: recent advances in their study and control. Harwood Academic Publishers: Amsterdam, pp
562 101-116.

- 563 Huang JJ, Petersen A, Whiteley M, Leadbetter JR. (2006). Identification of QuiP, the product of Gene
564 PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Appl
565 Environ Microbiol 72:1190-1197.
- 566 Huang YL, Dobretsov S, Ki JS, Yang LH, Qian PY. (2007). Presence of acyl-homoserine lactone in
567 subtidal biofilm and the implication in larval behavioral response in the polychaete *Hydroides elegans*.
568 Microb Ecol 54:384-392.
- 569 Huang YL, Ki JS, Case RJ, Quian PY. (2008). Diversity and acyl-homoserine lactone production among
570 subtidal biofilm-forming bacteria. Aquat Microb Ecol 52:185-193.
- 571 Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, *et al.*
572 (1999). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. Int Microbiol 2:267-271.
- 573 Jones PR, Cottrell MT, Kirchman DL, Dexter SC. (2007). Bacterial community structure of biofilms on
574 artificial surfaces in an estuary. Microb Ecol 53:153-162.
- 575 Kang BR, Lee JH, Ko SJ, Lee YH, Cha JS, Cho BH, Kim YC. (2004). Degradation of acyl-homoserine
576 lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. Can J Microbiol 50:935-941.
- 577 Khan SR, Farrand SK. (2009). The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench
578 the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. J Bacteriol 191:1320-1329.
- 579 Kim JS, Kim YH, Seo YW, Park S. (2007). Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis*
580 *flabelliformis*. Biotechnol Bioprocess Eng 12:308-311.
- 581 Kim SY, Lee SE, Kim YR, Kim CM, Ryu PY, Choy HE, *et al.* (2003). Regulation of *Vibrio vulnificus*
582 virulence by the LuxS quorum-sensing system. Mol Microbiol 48:1647-1664.
- 583 Kjelleberg S, McDougald D, Rasmussen TB, Givskov M. (2008). Quorum-sensing inhibition. In: Winans,
584 SC, Bassler BL. (eds). Chemical communication among bacteria. ASM Press: Washington DC, pp 393-
585 416.
- 586 Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics
587 Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 5:150-163.
- 588 Labrenz M, Collins MD, Lawson PA, Tindall BJ, Schumann P, Hirsch P. (1999). *Roseovarius tolerans*
589 gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll a production from hypersaline
590 Ekho Lake. Int J Syst Bacteriol 49:137-147.
- 591 Leadbetter JR, Greenberg EP. (2000). Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals
592 by *Variovorax paradoxus*. J Bacteriol 182:6921-6926.

- 593 Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR, Zhang LH. (2003). Acyl-homoserine lactone
594 acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes.
595 Mol Microbiol 47:849-860.
- 596 Llamas I, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Gronquist M, Eberhard A, González JE. (2005). Quorum
597 sensing in halophilic bacteria: detection of *N*-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-
598 producing species of *Halomonas*. Extremophiles 9:333-341.
- 599 Martens T, Heidrom T, Pukall R, Simon M, Tindall BJ, Brinkhoff T. (2006). Reclassification of
600 *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al, 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov.,
601 description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al, 1995)
602 Uchino et al, 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera
603 *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. Int J Syst Evol Microbiol 56:1293-1304.
- 604 Martinez-Murcia AJ, Rodriguez-Valera F. (1994). The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) to
605 develop taxa specific DNA probes of known sequence. FEMS Microbiol Lett 124:265-269.
- 606 McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Cámara M, et al. (1997). Quorum sensing and
607 *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-
608 acyl homoserine lactones. Microbiol 143:3703-3711.
- 609 Milton D, Chalker V, Kirke D, Hardman A, Cámara M, Williams P. (2001). The LuxM homologue,
610 VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and
611 *N*-hexanoylhomoserine lactone. J Bacteriol 183:3537-3547.
- 612 Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT. (2008). Diversity of quorum-sensing
613 signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. Environ Microbiol 10:75-86.
- 614 Morohoshi T, Nakazawa S, Ebata A, Kato N, Ikeda T. (2008a). Identification and characterization of *N*-
615 acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. Biosci Biotechnol
616 Biochem 72:1887-1893.
- 617 Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T. (2008b). *N*-acylhomoserine lactone regulates
618 violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. FEMS Microbiol Lett
619 279:124-130.
- 620 Nealson KH, Platt T, Hastings JW. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial
621 luminiscent system. J Bacteriol 104:313-322.

- 622 Ortori CA, Atkinson S, Chlabra SR, Cámara M, Williams P, Barrett DA. (2007). Comprehensive
623 profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid
624 chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*
625 387:497-511.
- 626 Park SY, Hwang BJ, Shin MH, Kim JA, Kim HK, Lee JK. (2006). N-acylhomoserine lactonase-
627 producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol Lett* 261:102-108.
- 628 Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT, Yum DY. (2005). Identification of extracellular N-
629 acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl*
630 *Environ Microbiol* 71:2632-2641.
- 631 Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine
632 lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol* 149:1541-1550.
- 633 Piñeiro-Vidal M, Rianza A, Santos Y. (2008). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum*
634 *galaicum* sp. nov. Isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int*
635 *J Syst Evol Microbiol* 58:21-25.
- 636 Poindexter, JS. (2006). Dimorphic prosthecate bacteria: the genera *Caulobacter*, *Asticcacaulis*,
637 *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas*, and *Thiodendron*. In: Dworkin M, Falkow S,
638 Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn. Springer: New York, pp 72-
639 90.
- 640 Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann SK, Larsen JL, *et al.* (2004). An inhibitor of
641 bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,
642 Walbaum). *System Appl Microbiol* 27:350-359.
- 643 Riaz K, Elmerich C, Raffoux A, Moreira D, Dessaux Y, Faure D. (2008). Metagenomics revealed a
644 quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria. *Commun Agric Appl Biol Sci*
645 73:3-6.
- 646 Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, Cámara M, Otero A. (2010). Acyl homoserine lactone
647 production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga*-
648 *Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) division. *FEMS Microbiol Lett* 304:131-139.
- 649 Romero M, Diggle SP, Heeb S, Cámara M, Otero A. (2008). Quorum quenching activity in *Anabaena* sp.
650 PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett* 280:73-80.

- 651 Ryan RP, Dow JM. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiol*
652 154:1845-1858.
- 653 Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, Quitschau M, Grond S, Streit WR. (2009). Metagenome-derived
654 clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas*
655 *aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75:224-233.
- 656 Schut F, De Vries EJ, Gottschal JC, Robertson BR, Harder W, Prins RA., Button DK. (1993). Isolation of
657 typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under
658 laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol* 7:2150-2160.
- 659 Sharif DI, Gallon J, Smith CJ, Dudley E. (2008). Quorum sensing in cyanobacteria: *N*-octanoyl-
660 homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909.
661 *ISME J* 2:1171-1182.
- 662 Sio CF, Otten LG, Cool RH, Diggle SP, Braun PG, Bos R, *et al.* (2006). Quorum quenching by an *N*-
663 acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74:1673-1682.
- 664 Skindersoe ME, Ettinger-Epstein P, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, De Nys R, Givskov M. (2008).
665 Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar Biotechnol* 10:56-63.
- 666 Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC, Williams P. (2001). Quorum sensing
667 as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol* 45:199-270.
- 668 Swift S, Williams P, Stewart GSAB. (1999). *N*-acylhomoserine lactones and quorum sensing in
669 proteobacteria. In: Dunny GM, Winans S. (eds). *Cell-cell signalling in bacteria*. ASM Press: Washington
670 DC, pp 291-313.
- 671 Tait K, Joint I, Daykin M, Milton DL, Williams P, Cámara M. (2005). Disruption of quorum sensing in
672 seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol*
673 7:229-240.
- 674 Teasdale ME, Liu J, Wallace J, Akhlaghi F, Rowley DC. (2009). Secondary metabolites produced by the
675 marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit Quorum Sensing-controlled phenotypes in Gram-
676 negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 75:567-572.
- 677 Tinh NT, Asanka-Gunasekara RA, Boon N, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. (2007). *N*-acyl
678 homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut
679 and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. *FEMS Microbiol Ecol* 62:45-53.

- 680 Uroz S, Chhabra SR, Cámara M, Williams P, Oger P, Dessaux Y. (2005). *N*-acylhomoserine lactone
681 quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both
682 amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiol* 151:3313-3322.
- 683 Uroz S, D'Angelo-Picard C, Carlier A, Elasri M, Sicot C, Petit A, *et al.* (2003). Novel bacteria degrading
684 *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-
685 pathogenic bacteria. *Microbiol* 149:1981–1989.
- 686 Uroz S, Oger P, Chhabra SR, Cámara M, Williams P, Dessaux Y. (2007). *N*-acyl homoserine lactones are
687 degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain D1. *Arch Microbiol* 187:249-256.
- 688 Uroz S, Oger PM, Chapelle E, Adeline M-T, Faure D, Dessaux Y. (2008). A *Rhodococcus* *qsdA*-encoded
689 enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol*
690 74:1357-1366.
- 691 Wagner-Dobler I, Biebl H. (2006). Environmental Biology of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Annu*
692 *Rev Microbiol* 60:255-280.
- 693 Wagner-Dobler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, *et al.* (2005). Discovery of complex
694 mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine
695 alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6:2195-2206.
- 696 Wang YJ, Leadbetter JR. (2005). Rapid acyl-homoserine lactone quorum sensing signal biodegradation in
697 diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 71:1291-1299.
- 698 Waters CM, Bassler BL. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell*
699 *Dev Biol* 21:319-346.
- 700 Weinberger F, Beltran J, Correa JA, Lion U, Pohnert G, Kumar N, *et al.* (2007). Spore release in
701 *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. *J Phycol* 43:235-241.
- 702 Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC. (2001). Quorum-sensing in Gram-
703 negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:365-404.
- 704 Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. (2007). Look who's talking: communication and quorum
705 sensing in the bacterial world. *Phil Trans R Soc B* 362:1119-1134.
- 706 Williamson LL, Borlee BR, Schloss PD, Guan C, Allen HK, Handelsman J. (2005). Intracellular screen to
707 identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl Environ Microbiol*
708 71:6335-6344.

- 709 Winson MK, Swift S, Fisha L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, *et al.* (1998). Construction and
710 analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated
711 quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163:185-192.
- 712 Xu F, Byun T, Deussen HJ, Duke KR. (2003). Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial
713 quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol* 101:89-96.
- 714 Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, *et al.* (2002). *N*-acylhomoserine
715 lactones undergo lactonolysis in a pH-, Temperature-, and Acyl chain length-dependent manner during
716 growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70:5635-5646.
- 717 You JL, Xue XL, Cao LX, Lu X, Wang J, Zhang LX, Zhou SN. (2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm
718 formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1137-1144.
- 719 Zmasek CM, Eddy SR. (2001). A simple algorithm to infer gene duplication and speciation events on a
720 gene tree. *Bioinformatics* 17:821-828.
- 721

722 **Figure legends**

723

724 Figure 1. CFU/mL obtained for each of the culture media used for marine strains isolation in the three
725 marine samples selected at 15°C (green bars) and 22°C (red bars).

726

727 Figure 2. Picture of the solid plate assay to detect marine QQ strains with the AHL biosensors *C.*
728 *violaceum* CV026 (A) and *C. violaceum* VIR07 (B). Positive QQ strains degraded both AHLs (10 µM)
729 after 24 hours, eliminating the violacein production compared to control (central well). A strain of *Vibrio*
730 *anguillarum* was also used as negative control.

731

732 Figure 3. HPLC-MS analysis of C4-HSL and C12-HSL in the culture media of the 15 positive QQ
733 isolates after 24 hours. Initial AHL concentration was 50 µM. Spent culture media were acidified to pH 2
734 in order to allow the recovery of the lactone ring after lactonolysis.

735

736 Figure 4. Neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene, showing relationships among the marine
737 isolates characterized in this study –in red- and species with known lactonases and acylases or known QQ
738 activity. The number found after each taxon name is the accession number for the respective 16S rDNA
739 gene sequence. Bootstrap values over 50% from the neighbour-joining analysis are shown. Scale bar, 0.02
740 substitutions per nucleotide position.

741

742

743

744

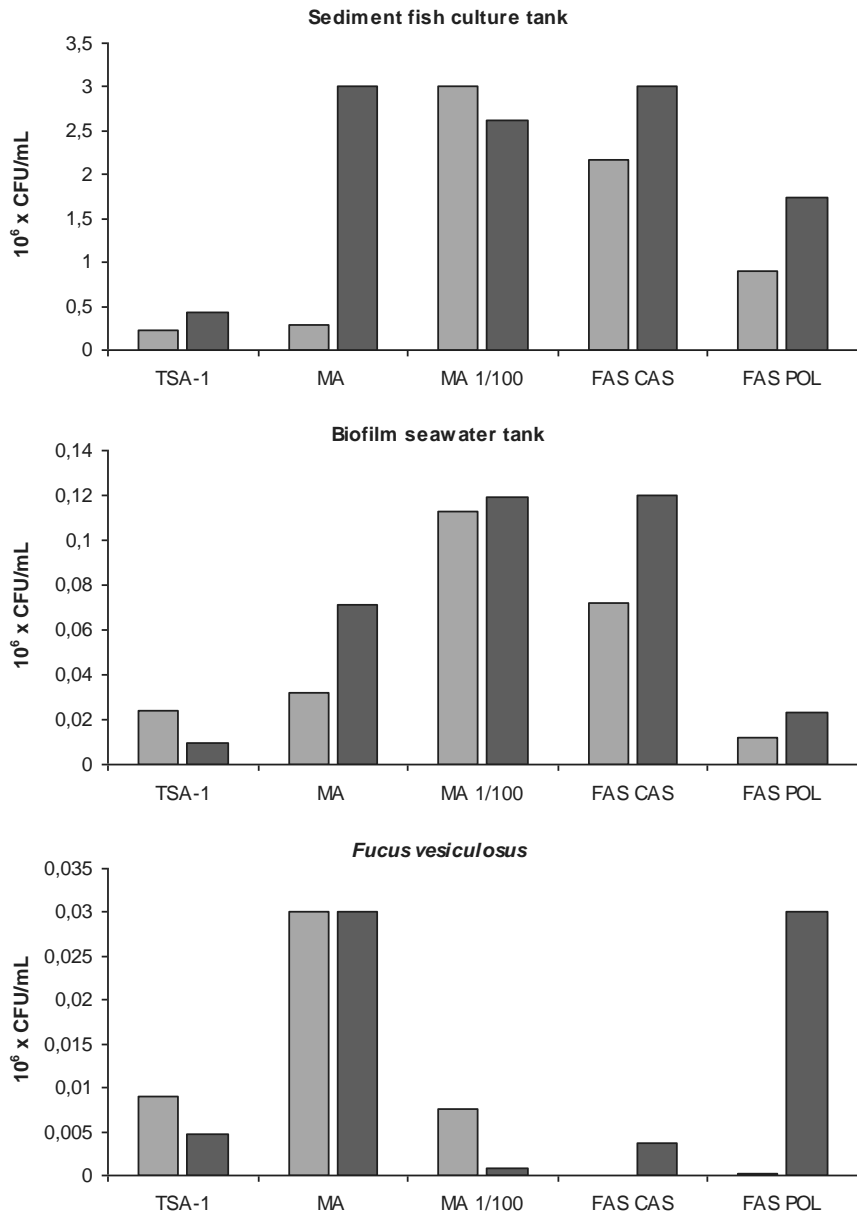
745

746

747

748

749 **Figure 1**



750

751

752

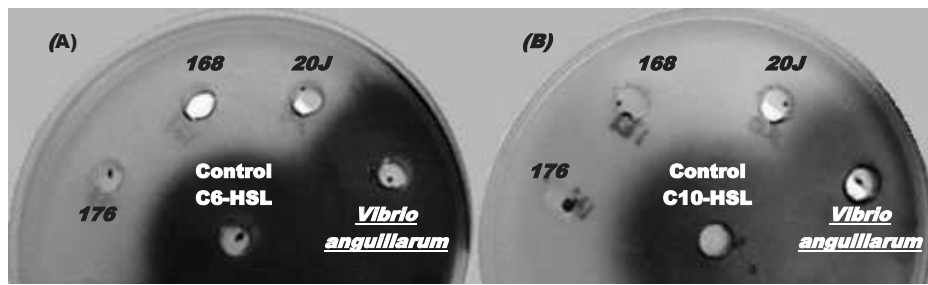
753

754

755

756

757 **Figure 2**



758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

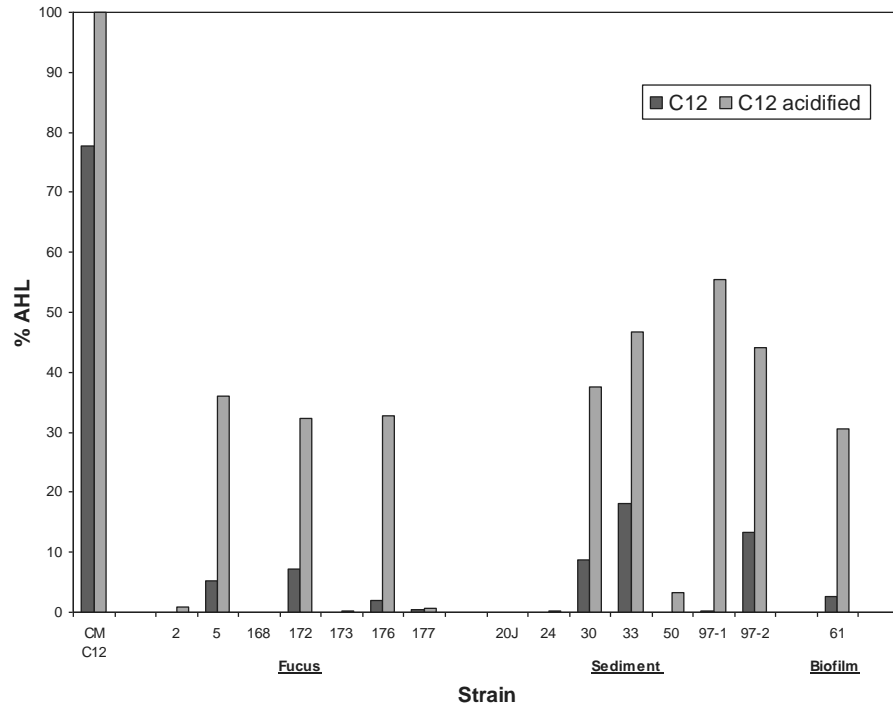
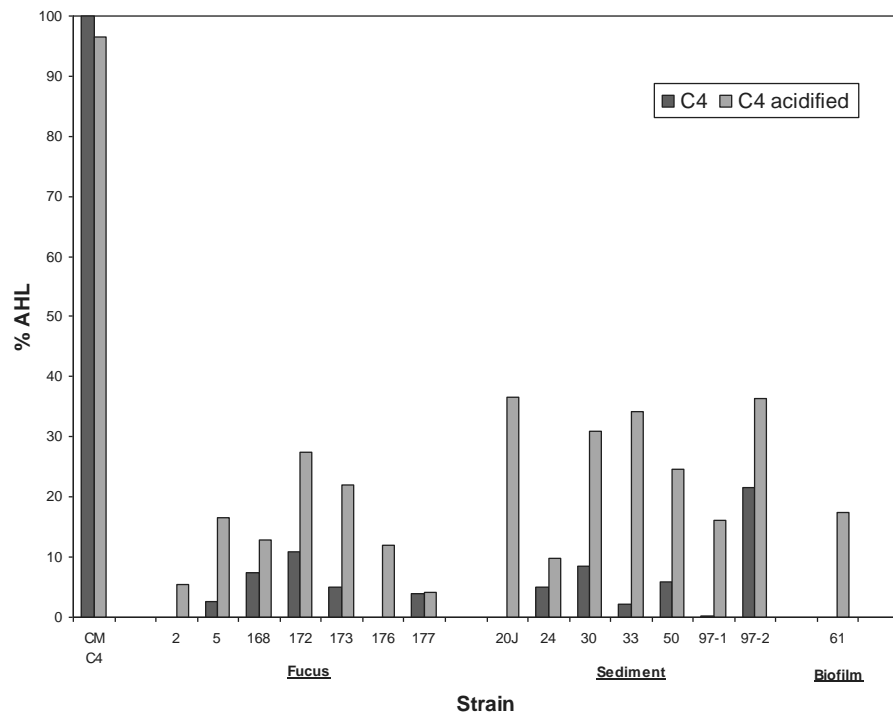
778

779

780

781

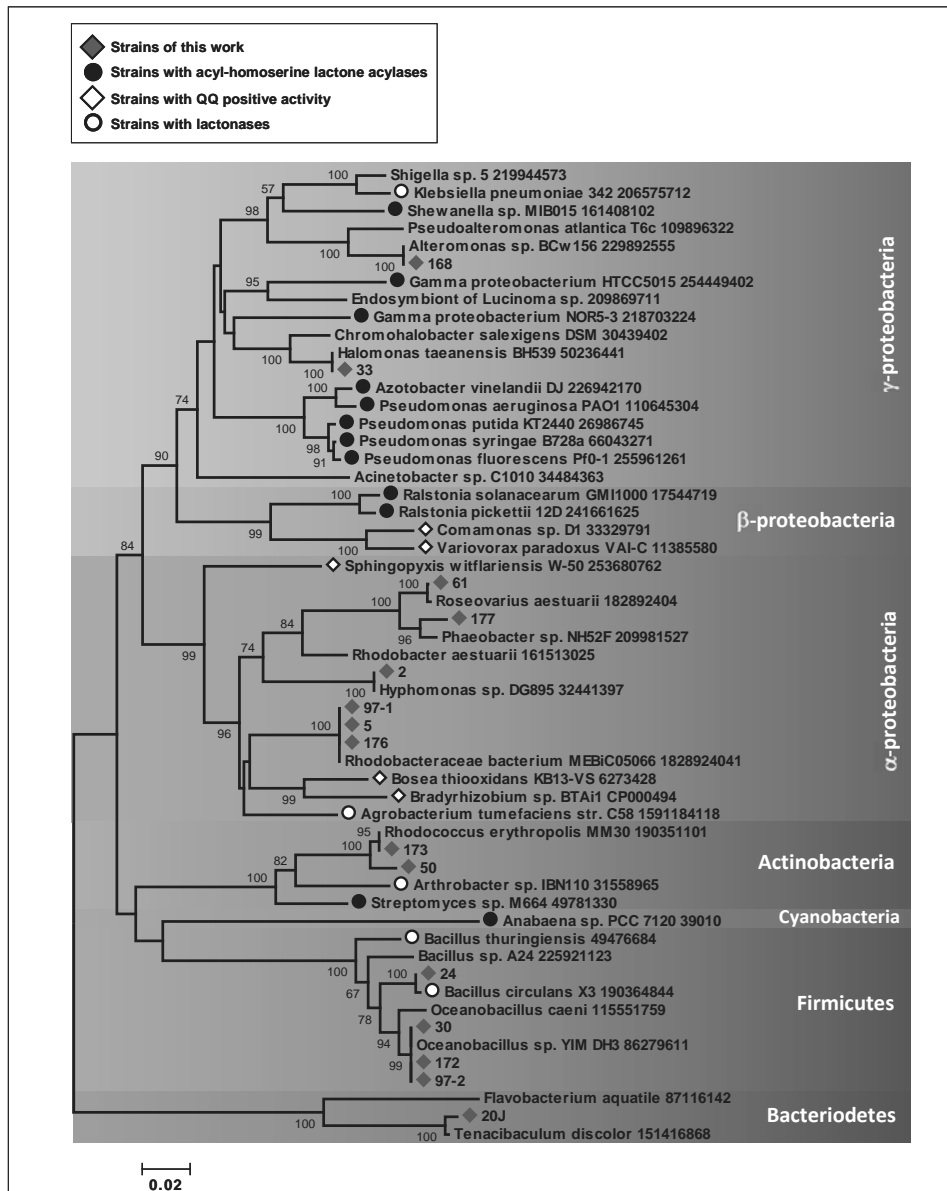
782 **Figure 3**



783

784

785 Figure 4



786

787

788

789

790

791 Tables

792 **Table 1.** Summary of isolated strains from different samples and culture media, showing number and
 793 percent of strains with QS inhibition activity against C6-HSL obtained using the solid plate *C. violaceum*
 794 CV026 assay. MA: Marine agar; MA 1/100: marine agar diluted 1/100 with seawater; FAS-CAS: Filtered
 795 autoclaved seawater supplemented with casaminoacids, FAS-POL: Filtered autoclaved seawater
 796 supplemented with polymers.

	N° of isolated strains	QQ strains	% QQ
Fish Tank			
Sediment			
TSA-1% NaCl	30	2	6.7
MA	31	4	12.9
MA 1/100	9	1	11.1
FAS-CAS	7	0	0
FAS-POL	8	1	12.5
Total	85	8	9.4
Water Tank			
Biofilm			
TSA-1% NaCl	9	0	0
MA	5	0	0
MA 1/100	7	0	0
FAS-CAS	17	2	11.8
FAS-POL	10	1	10.0
Total	48	3	6.3
<i>Fucus vesiculosus</i>			
TSA-1% NaCl	9	3	33.3
MA	9	2	22.2
MA 1/100	5	3	60.0
FAS-CAS	7	3	42.9
FAS-POL	3	2	66.7
Total	33	13	39.4
All samples			
TSA-1%NaCl	48	5	10.4
MA	45	6	13.3
MA 1/100	21	4	19.0
FAS-CAS	31	5	16.1
FAS-POL	21	4	19.0
Total	166	24	14.4

797

798

799 **Table 2.**

800 Identification of the 15 strains with Quorum Quenching activity on the basis of 16S rDNA sequence.

801 Capacity to grow in the absence of sea salts (TSA 1%, TSA medium with a NaCl concentration of 1 g L⁻¹)

802 and to degrade OC12-HSL are also shown, as well as the presence of putative sequences homologous to

803 known acylases and lactonases in the available sequenced genomes.

Origin	Strain	Closest cultivated bacteria	% Id at 16S rDNA locus	TSA 1%	OC12-HSL	Putative sequences
<i>Fucus vesiculosus</i>	2	<i>Hyphomonas</i> sp. DG895	99	-	+++	acylase/lactonase
	5	<i>Stappia</i> sp.	98	-	+	lactonase
	168	<i>Alteromonas</i> sp. BCw156	99	-	+++	acylase
	172	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	-	acylase
	173	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	100	+	+++	lactonase
	176	<i>Stappia</i> sp.	98	-	+++	lactonase
	177	<i>Phaeobacter</i> sp. NH52F	96	-	+++	
Fish Tank sediment	20J	<i>Tenacibaculum discolor</i> DSM 18842	99	+	+++	
	24	<i>Bacillus circulans</i> strain X3	98	+	+++	lactonase ⁽¹⁾
	30	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	-	acylase
	33	<i>Halomonas taeanensis</i> strain BH539	99	-	-	
	50	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MM30	99	+	+++	lactonase
	97-1	<i>Stappia</i> sp.	98	-	+++	lactonase
	97-2	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	-	acylase
Water tank biofilm	61	<i>Roseovarius aestuarii</i> SMK-122	99	-	+++	

804 (1) Based on the common presence of putative lactonases in the available genomes of species of the genus

805 *Bacillus*.

2.2 Acyl homoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group. FEMS Lett. 304: 131-139.



RESEARCH LETTER

Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides* (CFB) group

Manuel Romero¹, Rubén Avendaño-Herrera¹, Beatriz Magariños¹, Miguel Cámara² & Ana Otero¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología-CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago, Spain; and ²School of Molecular Medical Sciences, Centre for Biomolecular Sciences, University Park, University of Nottingham, Nottingham, UK

Correspondence: Ana Otero, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología-CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago, Spain. Tel.: +34 98 156 3100, ext. 16967; fax: +34 98 159 2210; e-mail: anamaria.otero@usc.es

Present address: Rubén Avendaño-Herrera, Departamento de ciencias biológicas, Facultad de ciencias biológicas, Universidad de Andrés Bello, Santiago, Chile.

Received 29 September 2009; revised 9 December 2009; accepted 15 December 2009. Final version published online February 2010.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01889.x

Editor: Craig Shoemaker

Keywords

quorum sensing; quorum quenching; acylhomoserine lactone; *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides*.

Introduction

Many bacterial species coordinate responses to environmental changes using complex cell–cell communication mechanisms in a cell-density-dependent manner. This phenomenon is known as quorum sensing (QS) and relies on the accumulation of signal molecules in the surrounding environment to threshold concentrations at which target structural genes are activated (Williams *et al.*, 2007). Several communication systems exist that use different signal molecules, also known as autoinducers (Waters & Bassler, 2005; Williams *et al.*, 2007). In Gram-negative bacteria, the most intensively studied QS systems rely on the use of *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), a family of signal molecules differing in the length and substituents of the acyl chain. The use of these molecules as QS signals has been well

Abstract

Tenacibaculum maritimum (formerly *Flexibacter maritimus*) is a filamentous, biofilm-forming member of the *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides* group (or *Bacteroidetes*), which causes the widely distributed marine fish disease tenacibaculosis. A search for *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) quorum-sensing (QS) signals in the culture media of nine representative strains of this species using different biosensor strains revealed the presence of short-type AHL activity in all of them. *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL) was identified in *T. maritimum* NCIMB2154^T by LC-MS. A degradation activity for long-acyl AHLs (C10-HSL) was subsequently demonstrated in *T. maritimum* NCIMB2154^T. The acidification of the culture medium after degradation did not allow the recovery of C10-HSL, which indicates a possible acylase-type degradation activity. Even though the physiological processes under the control of AHL-mediated QS in *T. maritimum* need to be further characterized, this discovery extends the paradigm of AHL-mediated QS signalling beyond the *Proteobacteria* and reinforces its ecological significance.

established, and their role in the control of important physiological processes such as bioluminescence, biofilm formation, plasmid conjugation, production of exoenzymes and virulence factors, swarming, etc., has been shown in a number of *Proteobacteria*, including several important animal and plant pathogens (Williams *et al.*, 2007). The production of AHLs has so far been limited to a few genera within the *Proteobacteria* (Williams *et al.*, 2007), which has raised questions with regard to the ecological significance of these molecules (Manefield & Turner, 2002). Outside *Proteobacteria*, the production of AHLs has been recently demonstrated for the colonial cyanobacterium *Gloeothece* PCC6909 and for several strains of *Bacteroidetes* isolated from marine biofilms, although the physiological processes under the control of the QS system were not completely elucidated (Sharif *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). AHL-like

activity was also found in the haloalkalophilic archaeon *Natronococcus occultus* (Paggi *et al.*, 2003), but the biochemical nature of the signal has not been confirmed. Short-chain AHL-type activity was also found in *Flavobacterium* sp., a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) cluster, but the presence of AHL could not be confirmed by GC-MS (Wagner-Döbler *et al.*, 2005).

QS seems to be of special significance in the marine environment. AHL signal molecules are produced by more than half of the marine *Alphaproteobacteria* isolated from various marine habitats (Wagner-Döbler *et al.*, 2005). Moreover, the production of AHLs is common among marine and fish pathogenic *Proteobacteria* (Bruhn *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2005), controlling the expression of key virulence factors (Defoirdt *et al.*, 2005). Because of the prevalence of QS systems among these pathogens, the inhibition of these processes has been proposed as an alternative to the use of antibiotics in aquaculture (Defoirdt *et al.*, 2004). The inhibition of AHL-mediated QS processes was first described in the marine alga *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996) and has now been described in several eukaryotes and bacteria of terrestrial origin (reviewed by Dong & Zhang, 2005). The isolation and characterization of marine bacterial strains capable of inhibiting QS, a process known as quorum quenching (QQ), either enzymatically or through the production of inhibitors or antagonists may help to develop new biotechnological tools. Several results indicate the viability of this approach for the treatment of infections in aquaculture (Rasch *et al.*, 2004).

The marine bacteria *Tenacibaculum maritimum* (formerly *Flexibacter maritimus*) (Suzuki *et al.*, 2001) is a filamentous member of the CFB group causing the fish 'gliding bacterial disease' or tenacibaculosis/flexibacteriosis (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004). *Tenacibaculum maritimum* belongs to the CFB cluster, which is also known as *Bacteroidetes* (Ludwig &

Klenk, 2001), and constitutes one of the dominant heterotrophic bacterial groups in aquatic habitats. The fact that *T. maritimum* shifts abruptly from a biofilm to a planktonic mode of growth, a characteristic that could be related to a QS-controlled process (Rice *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2005), led us to investigate the possible production and degradation of AHLs by this fish pathogen.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The *T. maritimum* strains NCIMB2154^T, NCIMB2153 and NCIMB2158 were obtained from The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd (Aberdeen, UK). In addition, six strains isolated in our laboratory from fish farm disease outbreaks from Spain and Portugal were used. These strains belong to the main serotypes and clonal lineages described within this pathogen (Table 1) (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004, 2006), and were confirmed as *T. maritimum* by PCR-based analysis (Toyama *et al.*, 1996). The strains were routinely cultured at 20 °C on *F. maritimus* medium (FMM) agar or broth (Pazos *et al.*, 1996) and on marine broth (MB, Difco) for some of the experiments. Liquid cultures were inoculated with a 10% volume of a 24-h liquid culture and maintained in a shaker at 100 r.p.m. Cultures were double-checked for purity on Marine Agar (Difco) and FMM before and after each experiment.

Three *lux*-based *Escherichia coli* JM109 AHL biosensor strains that respond to AHLs with different side chain lengths were used for the detection of AHL production (Swift *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1998). The biosensor strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth or agar supplemented with the adequate antibiotics.

Table 1. AHL activity in acidified culture media extracted with dichloromethane (1 : 1 v/v) of nine different isolates of *Tenacibaculum maritimum* as detected by TLC using the *lux*-based reporter strain *Escherichia coli* JM109 pSB536 (specific for short-length AHLs)

Bacterial isolate	Host species	Origin	Serotype*	AHL activity (sensor <i>Escherichia coli</i> pSB536)	
				24 h	48 h
NCIMB2154 ^T	<i>Pagrus major</i>	Japan	O1/O2 (O2)	+	++
NCIMB2158	<i>Solea solea</i>	UK	O2	++	+
ACR104.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	Spain	O2	+++	+
PC424.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	Spain	O2	+	++
NCIMB2153	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Japan	O1/O2 (O1)	++	+
PC503.1	<i>Solea senegalensis</i>	Spain	O1	++	+++
PC538.1	<i>Sparus aurata</i>	Spain	O1	++	+
LgH35-O3	<i>Solea senegalensis</i>	Spain	O3	–	+++
ACC6.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	Portugal	O3	+	++

Samples were extracted 24 and 48 h after inoculation. Activity was evaluated in comparison with the intensity of the spots obtained for the type strain *Tenacibaculum maritimum* NCIMB2154^T (Fig. 1).

*Serotypes follow the typing schema of Avendaño-Herrera *et al.* (2006).

Additionally, the AHL biosensor strains *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997) and *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi *et al.*, 2008) were used for the AHL-degradation assays in solid plates as explained below (McClellan *et al.*, 1997). These strains were routinely cultured on LB medium supplemented with kanamycin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 30°C .

Sampling and AHL extraction

Samples (100 mL) from cultures of nine different strains of *T. maritimum* grown in liquid FMM were obtained 24 and 48 h after inoculation, acidified to pH 2 with HCl 1 M in a shaker at 200 r.p.m. for 12 h at 20°C , to ensure the absence of any AHL lactonolysis products, and extracted with dichloromethane as described previously (Yates *et al.*, 2002). Dried extracts were reconstituted in 1 mL ethyl acetate and stored at -20°C until further analysis.

Thin-layer chromatography (TLC) detection assays of extracted samples

Two microlitres of the ethyl acetate extracts obtained from the spent culture media were run on reversed-phase hydrocarbon-impregnated C18 silica gel plates using methanol: water 60:40 v/v as the mobile phase (Shaw *et al.*, 1997). Two microlitres of synthetic AHLs (Sigma, stock concentration $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) were run as controls: *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) for *E. coli* JM109 pSB401, *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL) for *E. coli* JM109 pSB536 and *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C12-HSL) for *E. coli* JM109 pSB1075 (Winson *et al.*, 1998). Plates were dried and overlaid with 3 mL of semi-solid LB medium (8% agar) inoculated with $30 \mu\text{L}$ of an overnight culture of the corresponding sensor strain. Plates were incubated at 37°C and every hour, radiographic plates were laid over them to detect the emission of bioluminescence.

LC-MS AHL identification

LC-MS analyses were carried out simultaneously in the laboratories in Nottingham and Santiago using different equipment and slightly different conditions to confirm the presence of AHLs unequivocally. In Nottingham, a Shimadzu series 10AD VP equipped with binary pumps, a vacuum degasser and an SIL-HTc autosampler and column oven (Shimadzu, River Drive, MD) was used as the LC system. As column a Phenomenex Gemini C18, $150 \times 2 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$ particle size), at 45°C was used. The mobile phase was built by 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The flow rate was 0.45 mL min^{-1} . The elution conditions were as follows: 1 min 0% B, linear gradient to 50% B for 0.5 min and then a linear gradient from 50% to 90% B over 4 min, then 2.5 min 99% B over

2 min, then ramped back to the starting conditions in 0.2 min. The column was re-equilibrated for a total of 4 min. Samples were redissolved in $50 \mu\text{L}$ acetonitrile before use and a $10\text{-}\mu\text{L}$ volume was injected onto the column (Ortori *et al.*, 2007). Parallel analyses were carried out using an HPLC 1100 series (Agilent, Santa Clara, CA) equipped with a C8 precolumn ($2.1 \times 12.5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ particle size) and a ZORBAX Eclipse XDB-C18 $2.1 \times 150 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$ particle size) column. Temperature and mobile phases were the same as above, but the flow rate was set at 0.22 mL min^{-1} . In this equipment, the elution conditions were as follows: 0 min 35% B, linear gradient to 60% B in 10 min and then a linear gradient from 60% to 95% B over 5 min, then 5 min 95% B and then in 1 min, ramped back to the starting conditions in 9 min. The column was re-equilibrated for a total of 5 min. A $2\text{-}\mu\text{L}$ volume was injected onto the column.

The MS experiments shown were conducted in Santiago on an API 4000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a TurboIon source using positive ion electrospray, multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MRM signals were used to generate relative quantification information and to trigger subsequent quality product ion spectra (product ion PI, MS₂). The conditions for the generation of the MRM-triggered spectra were as follows: DP ramped from 35 to 57, CE 14-28, CXP 8. Analyses were confirmed on a 4000 QTRAP hybrid triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with a TurboIon source used in positive ion electrospray, MRM mode. In this case, the conditions for the generation of the MRM-triggered spectra were as follows: DP ramped from 25 to 50, CE 15-45, CXP 12.

AHL with or without a 3-oxo or a 3-hydroxy substitution and with an acyl side chain length of 4 (C4-HSL, 3-oxo-C4-HSL and 3-hydroxy-C4-HSL), 6 (C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL and 3-hydroxy-C6-HSL), 7 (C7-HSL), 8 (C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL and 3-hydroxy-C8-HSL), 10 (C10-HSL, 3-oxo-C10-HSL and 3-hydroxy-C10-HSL), 12 (C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL), 13 (C13-HSL, 3-oxo-C13-HSL and 3-hydroxy-C13-HSL) or 14 (C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL and 3-hydroxy-C14-HSL) were used as standards. Acyl-HSLs were identified and confirmed by comparing both the elution time and the spectra from any peaks obtained with those of the standards.

AHL-degradation activity assay

Chromobacterium violaceum-based solid plate assays (McClellan *et al.*, 1997) were carried out to detect AHL degradation activity in *T. maritimum* NCIMB2154^T. Two different sensor strains were used to detect AHL degradation. *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*,

1997) was used to measure the degradation of C6-HSL and *C. violaceum* VIR07 was used to measure the degradation of C10-HSL (Morohoshi *et al.*, 2008). Twenty microlitres of stock solutions of C6-HSL or C10-HSL were added to 500 μ L of an overnight culture of *T. maritimum* NCIMB2154^T in MB (final concentration 2 μ g mL⁻¹) and incubated for 24 h at 20 °C. The same amount of AHL was added to 500 μ L of spent culture medium obtained from a 24-h-old culture by filtration through 0.22 μ m. The amount of remaining AHL in the culture media of *T. maritimum* was evaluated in LB plates overlaid with 5 mL of semi-solid LB agar seeded with 500 μ L of overnight cultures of *C. violaceum* CV026 for C6-HSL or *C. violaceum* VIR07 for C10-HSL. Fifty microlitres of culture supernatants were loaded in wells and adjusted to 100 μ L with distilled water. Sterile MB and MB plus C4 or C10-SHLs were set as controls. The same experiment was carried out in FMM broth (data not shown). Plates were incubated for 12–24 h and the production of violacein was examined.

To evaluate the possible type of AHL degradation activity, two flasks with 15 mL of FMM were supplemented with C10-HSL to a final concentration of 2 μ g mL⁻¹. One of them was inoculated with 1 mL of a 48-h culture of *T. maritimum* NCIMB2154^T and the other was maintained as control. Flasks were incubated in a shaker at 22 °C under soft agitation (110 r.p.m.). After 24 h, 500 μ L of normal and acidified culture media were extracted three times with ethyl acetate, dehumidified onto MgSO₄, evaporated under nitrogen flux and resuspended in acetonitrile for LC-MS analysis as described above. Before inoculation, 500 μ L of FMM+C10-HSL were also extracted and the value of C10-HSL obtained was used to calculate the percentage of degradation.

Results and discussion

The presence of AHLs was investigated in ethyl-acetate extracts of acidified culture media of the type strain *T. maritimum* NCIMB2154^T obtained at 24 and 48 h using the three *E. coli* JM109 *lux*-based biosensor strains carrying pSB536, pSB401 or pSB1075 to detect a wide range of AHLs differing in the length of their acyl chain. TLC analysis revealed the presence of short-chain AHLs using the *E. coli* JM109 pSB536 biosensor (Fig. 1). A search for AHL-type QS signals in extracts obtained from the culture media of another eight representative isolates of *T. maritimum* using the same technique revealed the presence of short-chain AHL activity in all of them, although differences were recorded in relation to their peak in activity (Table 1). LC-MS analysis confirmed the presence of *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL) in the culture media of *T. maritimum* NCIMB2154^T grown in both FMM (Fig. 2) and MB (data not shown). This AHL was unequivocally identified by

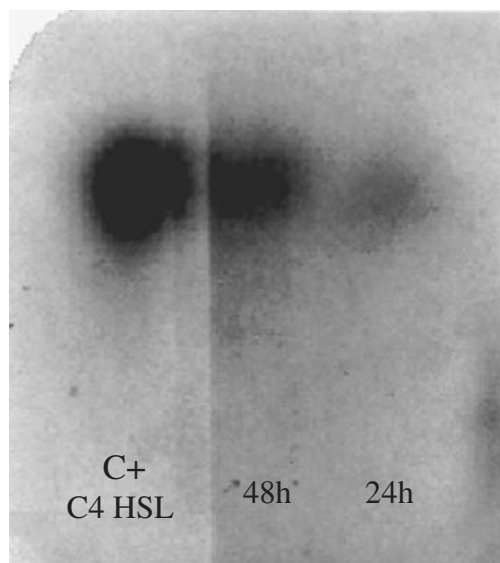


Fig. 1. Detection of AHL activity in the culture media of *Tenacibaculum maritimum* NCIMB2154^T with the TLC assay. TLCs of ethyl acetate extracts of acidified culture media obtained after 24 and 48 h were covered with the *lux*-based sensor strains, followed by exposure to X-ray films. Positive results were obtained with the sensor strain *Escherichia coli* JM109 pSB536, specific for the detection of short-length AHLs. Control (C+): C4-HSL.

comparison of its mass spectra with those of pure standards (Fig. 3). As this is the first description of the production of AHLs by a pathogenic member of the CFB cluster, the analyses were carried out simultaneously in both laboratories using different chromatographic conditions. The results confirmed unequivocally the presence of the C4-HSL.

So far, no physiological role other than as QS signals has been assigned to AHLs, except as a chelator, for tetramic acid (a derivative of 3-oxo-C12) or antibiotic activity for both 3-oxo-C12-HSL and tetramic acid (Kaufmann *et al.*, 2005; Schertzer *et al.*, 2009). In addition, a role as biosurfactant has been attributed to long-chain AHLs (Daniels *et al.*, 2006). Therefore, even though the physiological features under the control of these molecules in *T. maritimum* remain to be investigated, the production of C4-HSL by *T. maritimum* strains extends the paradigm of AHL-mediated QS beyond the *Proteobacteria*. As the physiological processes under the control of AHL-mediated QS have so far been described for a limited number of genera of the *Alpha*-, *Beta*- and *Gammaproteobacteria*, many of them human or plant pathogens (Williams *et al.*, 2007), the ecological significance of AHL-mediated QS has been questioned as a key switch controlling gene expression within bacterial populations in nature (Manefield & Turner, 2002). The fact

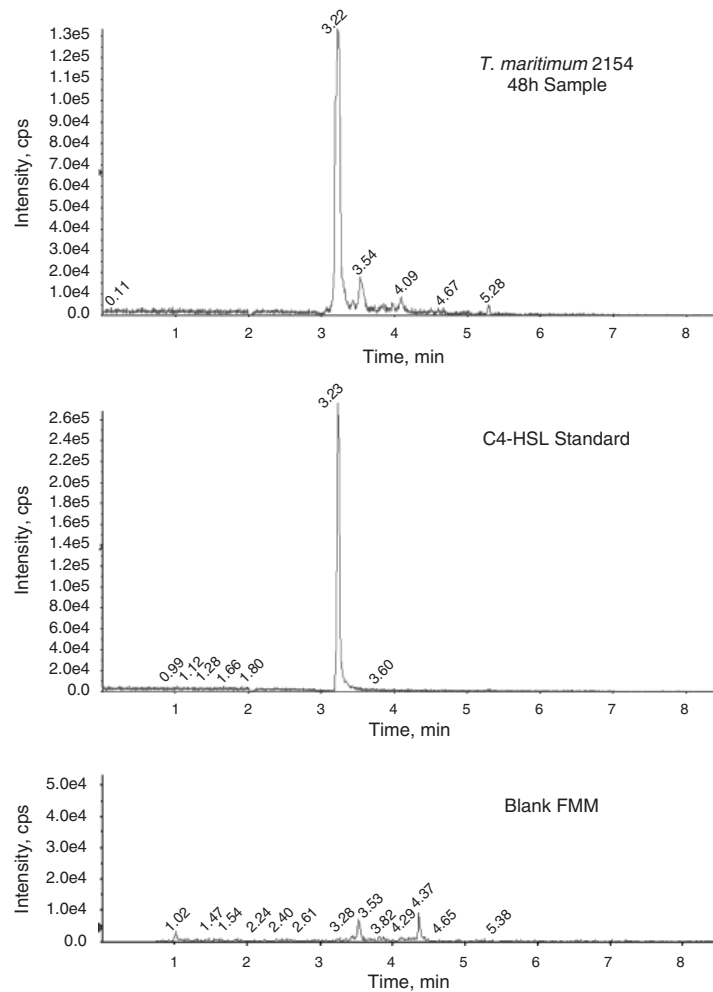


Fig. 2. Extraction ion chromatograms of the MRM transition 172.1 > 102.1 (C4 HSL) of extracts of acidified culture media of *Tenacibaculum maritimum* NCIMB2154^T (48-h sample), C4-HSL standard and FMM broth.

that genera outside the *Proteobacteria* produce the same signal molecules, and that AHL-degrading activity has been found in Gram-positive, Gram-negative and *Cyanobacteria* (Dong & Zhang, 2005; Romero *et al.*, 2008) and in mammalian cells (Chun *et al.*, 2004), reinforces the ecological significance of AHL-mediated QS processes. The presence of AHL-mediated QS beyond the *Proteobacteria* is not surprising, as a phylogenetic study based on the LuxI/LuxR genes suggested that QS mechanisms were established very early in the evolution of bacteria, although horizontal transfer may have also played an important role in the distribution of QS genes, at least within this group (Lerat & Moran, 2004). The cloning of genes responsible for the synthesis and detection of AHLs in *T. maritimum* will undoubtedly provide new insights into the evolutionary history of QS.

The production of AHLs was demonstrated for all isolates of *T. maritimum* analysed (Table 1), therefore being a conserved trait within this species, which is not the case in some other marine pathogens such as *Aeromonas salmonicida* (Bruhn *et al.*, 2005). Some contradictory results have been published previously regarding the production of AHLs by the genus *Flavobacterium* belonging to the *Bacteroidetes* group. While AHL-like activity was detected in a planktonic isolate of *Flavobacterium* sp. using *E. coli* MT102 carrying the biosensor plasmid pJBA132 based on the luxR gene from *Vibrio fischeri*, the presence of AHLs could not be demonstrated by GC-MS (Wagner-Döbler *et al.*, 2005). Furthermore, no AHL activity was found in different pathogenic strains of *Flavobacterium psychrophilum* using the sensor strains *C. violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (Bruhn *et al.*, 2005). The differences in the

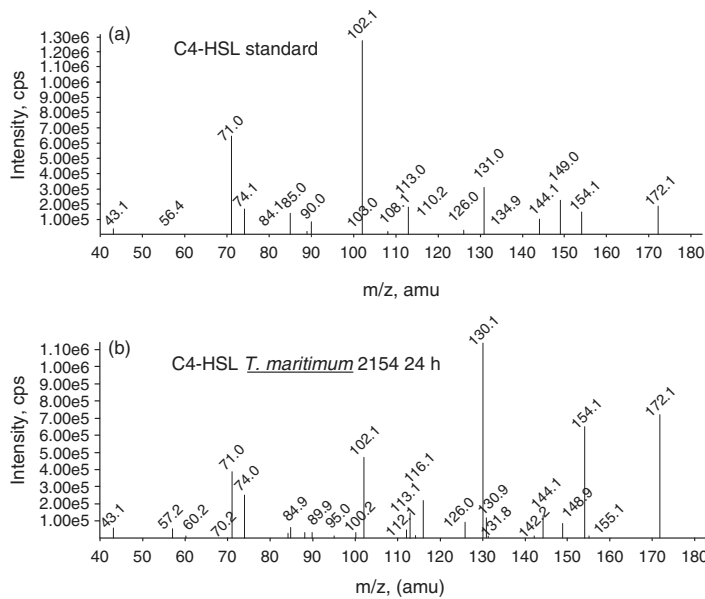


Fig. 3. Product ion spectrum of synthetic C4-HSL (a) and the corresponding peak (b) in the chromatograms of extracts of spent culture medium of *Tenacibaculum maritimum* NCIMB2154^T.

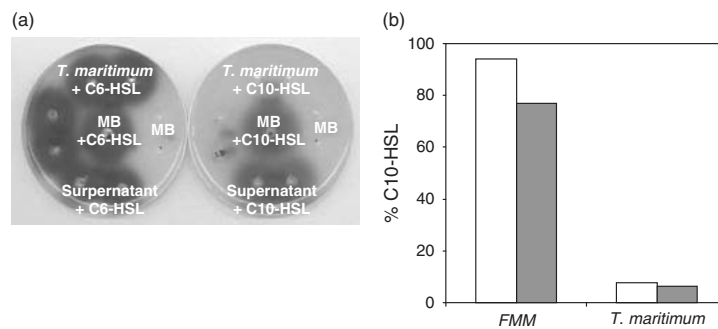


Fig. 4. Agar plate assay for the detection of AHL degradation activity in *Tenacibaculum maritimum* NCIMB2154^T. (a) Complete degradation of C10-HSL (right) and no degradation of C6-HSL (left) was found after 24 h of exposure. The degradation of C10-HSL was monitored using *Chromobacterium violaceum* VIR07 (right), and the degradation of C6-HSL was monitored using the biosensor strain *C. violaceum* CV026 (left). As negative controls, AHL incubated in culture media were used (central wells). (b) HPLC quantitation of C10-HSL after 24 h in FMM and FMM inoculated with *T. maritimum* NCIMB2154^T. Spent culture media (open bars) and acidified spent culture media (grey bars) were extracted. Data are expressed as the percentage of the initial C10-HSL concentration ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

AHL activity described probably depend on the assay conditions and the sensor strain utilized. In our experience, data based on the direct evaluation of culture media of marine bacteria, usually MB, should be interpreted with caution, as the media composition could result in inhibition of growth or bioluminescence production by the sensor strain (unpublished data). On the other hand, due to the ability of different compounds to activate the AHL biosensors (Holden et al., 1999), the results should be viewed with caution unless the presence of AHLs can be confirmed by analytical chemical methods. On the basis of our results and as the

detection of the QS activity is strongly dependent on the biosensor strain used and on the culture conditions, it is possible that AHL-based QS systems are more widespread than described so far (Wagner-Döbler et al., 2005).

An *in vivo* degradation assay was carried out using two biosensor strains of *C. violaceum*. *Chromobacterium violaceum* CV026 was used to detect degradation of short AHLs (C6-HSL), and *C. violaceum* VIR07 was used to detect degradation of long AHLs (C10-HSL). Complete degradation of C10-HSL was observed after 24 h, but no changes in C6-HSL activity were observed (Fig. 4a). The activity should

be cell bound, as no significant degradation was obtained when the C10-HSL was added to cell-free spent culture medium (Fig. 2a). HPLC analysis of the degradation of C10-HSL revealed that 90% of the AHL was degraded after 24 h of exposition to *T. maritimum* cultures, and no recovery of the AHL could be achieved by medium acidification, which may discard a lactonase-type degrading enzyme (Fig. 4b). Further analyses are required to confirm an acylase-type activity. The presence of AHL degradation enzymes has been described in Gram-negative bacteria, possibly as a mechanism to outcompete Gram-positive neighbours (Roche *et al.*, 2004). In Gram negatives, these enzymes can be used for the self-modulation of the level of the signals as already found in *A. tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002). In the case of the bacteroidete *T. maritimum*, the presence of a QQ enzyme for long AHLs may represent an exclusion mechanism to interfere with the QS systems of competitors (Dong & Zhang, 2005).

Evidence is beginning to accumulate indicating that QS and QS inhibition processes, including enzymatic degradation of the signal or QQ, are important in the marine environment. Besides the well-characterized phenomenon of the production of furanones by the red alga *D. pulchra* to avoid surface colonization by Gram-negative biofilm formers (Givskov *et al.*, 1996), QS systems mediated by AHLs have been found in many species of marine pathogenic bacteria (Bruhn *et al.*, 2005). AHLs also seem to play an important role in the eukaryotic–prokaryotic interactions in the marine environment, as demonstrated by the importance of the production of AHLs by marine biofilms for the surface selection and permanent attachment of zoospores of the green alga *Ulva* (Tait *et al.*, 2005), for spore release of the red alga *Acrochaetium* sp. (Weinberger *et al.*, 2007), and for some initial larval settlement behaviours in the polychaete *Hydroides elegans* (Huang *et al.*, 2007). As most of the isolates involved in algal morphogenesis belong to the CFB group (Hanzawa *et al.*, 1998; Matsuo *et al.*, 2003), the discovery of the production and degradation of AHLs by members of this group provides the possibility of new interactions between bacteria and eukaryotes in the marine environment.

For the first time, the production of AHL-type QS signals and QQ activity has been demonstrated simultaneously in a pathogenic member of the CFB group. Because of the ecological significance of the *Cytophaga*–*Flavobacterium* cluster, especially in the marine environment, the discovery of AHL-mediated QS processes among their members will advance our understanding of the microbial interactions in complex ecosystems. Moreover, cell-to-cell communication phenomena should be reconsidered in other habitats in which the *Bacteroidetes* play an important role, such as intestinal flora or dental plaque. As QS controls the expression of important virulence factors in many pathogenic

bacteria, the disruption of QS mechanisms in *T. maritimum* and other fish pathogenic bacteria may represent a new strategy for the treatment of infections in aquaculture.

Acknowledgements

This work was financed by a grant from Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, Spain (PGI-DIT06PXIB200045PR). M.R. is supported by an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Science and Education. We would like to thank Noemi Ladra (University of Santiago) and Catherine Ortori (University of Nottingham) for LC-MS analysis. The sensor *Chromobacterium violaceum* VIR07 was kindly provided by Prof. T. Morohoshi.

References

- Avendaño-Herrera R, Magariños B, López-Romalde S, Romalde JL & Toranzo AE (2004) Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Dis Aquat Organ* **58**: 1–8.
- Avendaño-Herrera R, Toranzo AE & Magariños B (2006) Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis Aquat Organ* **71**: 255–266.
- Bruhn JB, Dalsgaard I, Nielsen KF, Buchholtz C, Larsen JL & Gram L (2005) Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis Aquat Organ* **65**: 43–52.
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J & Greenberg EP (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 3587–3590.
- Daniels R, Reynaert S, Hoekstra H *et al.* (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *P Natl Acad Sci USA* **103**: 14965–14970.
- Defoirdt T, Boon N, Bossier P & Verstraete W (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**: 69–88.
- 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.
- Dong YH & Zhang LH (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43**: 101–109.
- Givskov M, De Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD & Kjelleberg S (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**: 6618–6622.
- Hanzawa N, Nakanishi K, Nishijima M & Saga N (1998) 16S rDNA-based phylogenetic analysis of marine flavobacteria that induce algal morphogenesis. *J Mar Biotechnol* **6**: 80–82.

- Holden MTG, Chhabra SR, De Nys R *et al.* (1999) Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **33**: 1254–1266.
- Huang YL, Dobretsov S, Ki JS, Yang LH & Qian PY (2007) Presence of acyl-homoserine lactone in subtidal biofilm and the implication in larval behavioural response in the polychaete *Hydroides elegans*. *Microb Ecol* **54**: 384–392.
- Huang YL, Ki J-S, Lee OO & Qian P-Y (2009) Evidence for the dynamics of acylhomoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J* **3**: 296–304.
- Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Rogers CJ, Meijler MM, Moss JA, Clapham B, Brogan AP, Dickerson TJ & Janda KD (2005) Revisiting quorum sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-acylhomoserine lactones. *P Natl Acad Sci USA* **102**: 309–314.
- Lerat E & Moran NA (2004) The evolutionary history of quorum-sensing systems in Bacteria. *Mol Biol Evol* **21**: 903–913.
- Ludwig W & Klenk HP (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone DR & Castenholz RW, eds), pp. 49–65. Springer-Verlag, Berlin.
- Manefield M & Turner SL (2002) Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* **148**: 3762–3764.
- Matsuo Y, Suzuki M, Kasai H, Shizuri Y & Harayama S (2003) Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*. *Environ Microbiol* **5**: 25–31.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L *et al.* (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**: 3703–3711.
- Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N & Ikeda T (2008) *N*-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 124–130.
- Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, Cámara M, Williams P & Barrett DA (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.
- Paggi RA, Martone CB, Fuqua C & De Castro R (2003) Detection of quorum sensing signals in the haloalkalophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 49–52.
- Pazos F, Santos Y, Macías AR, Núñez S & Toranzo AE (1996) Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J Fish Dis* **19**: 193–197.
- Rasch M, Buch C, Austin B *et al.* (2004) An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol* **27**: 350–359.
- Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW & Kjelleberg S (2005) Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* **187**: 3477–3485.
- Roche DM, Byers JT, Smith DS, Glansdorff FG, Spring DR & Welch M (2004) Communications blackout? Do *N*-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* **150**: 2023–2028.
- Romero M, Diggle SP, 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.
- Schertzer JW, Boulette ML & Whiteley M (2009) More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* **17**: 189–195.
- Sharif DI, Gallon J, Smith CJ & Dudley E (2008) Quorum sensing in cyanobacteria: *N*-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothoece* PCC6909. *ISME J* **2**: 1171–1182.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Rinehart KL & Farrand SK (1997) Detecting and characterizing *N*-acylhomoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 6036–6041.
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S & Yamamoto S (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* **51**: 1639–1652.
- Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P, Macintyre S & Stewart GSAB (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* **179**: 5271–5281.
- Tait K, Joint I, Daykin M, Milton DL, Williams P & Cámara M (2005) Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol* **7**: 229–240.
- Toyama T, Kita-Tsukamoto K & Wakabayashi H (1996) Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathol* **31**: 25–31.
- Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Henning A, Pukall R & Schulz S (2005) Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine *Alphaproteobacteria*. *ChemBioChem* **6**: 2195–2206.
- Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Bi* **21**: 319–346.
- Weinberger F, Beltran J, Correa JA, Lion U, Pohnert G, Kumar N, Steinberg P, Kloreg B & Potin P (2007) Spore release in *Acrochaetium* sp. (*Rhodophyta*) is bacterially controlled. *J Phycol* **43**: 235–241.

- Williams P, Winzer K, Chan WC & Cámara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos T Roy Soc B* **362**: 1119–1134.
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P & Stewart GSAB (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating *N*-acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185–192.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C *et al.* (2002) *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**: 5635–5646.
- Zhang HB, Wang LH & Zhang LH (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 4638–4643.

2.3 Solicitud de patente internacional WO2010012852A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/012852 A1

(43) Fecha de publicación internacional
4 de febrero de 2010 (04.02.2010)

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 35/74 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070306
- (22) Fecha de presentación internacional:
23 de julio de 2009 (23.07.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P200802309 1 de agosto de 2008 (01.08.2008) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio CACTUS-CITT, Campus Sur, E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña) (ES).
- (72) Inventores: e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **OTERO CASAL, Ana María** [ES/ES]; Edificio CACTUS-CITT, Campus Sur, E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña) (ES). **ROMERO BERNÁRDEZ, Manuel** [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Edificio CACTUS-CITT, Campus Sur, E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña) (ES). **ROCA RIVADA, Arturo** [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Edificio CACTUS-CITT, Campus Sur, E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña) (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))



WO 2010/012852 A1

(54) Title: USE OF BACTERIA OF THE GENUS *TENACIBACULUM* FOR QUORUM QUENCHING

(54) Título: USO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *TENACIBACULUM* PARA QUORUM QUENCHING

(57) Abstract: Use of bacterial cells of the genus *Tenacibaculum*, from the crude cellular extract or from its cultivation supernatants, capable of degrading N-acyl homoserine lactones, for quorum quenching, for treatment of infectious bacterial illnesses or to inhibit formation of biofilms.

(57) Resumen: Uso de células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, capaces de degradar N- Acil homoserin lactonas, para quorum quenching, para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas o para inhibir la formación de biofilms.

**USO DE BACTERIAS DEL GÉNERO TENACIBACULUM PARA
QUORUM QUENCHING**

La presente invención se encuentra dentro de la biología y la biología
5 molecular, y se refiere a especies del género *Tenacibaculum* capaces de
degradar *N*-acil-homoserin lactonas (AHLs) para el control de
enfermedades infecciosas bacterianas, y para evitar la formación de
biofilms.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Numerosas especies bacterianas usan un mecanismo de regulación
genética coordinada para responder a cambios en el entorno. Este
15 mecanismo conocido como "*quorum sensing*" (QS) consiste en la
producción y liberación de moléculas señal al medio donde se acumulan
controlando la expresión de múltiples genes (Fuqua *et al.*, 1994. *J*
Bacteriol 176: 269-275). Mediante la comunicación por QS las poblaciones
bacterianas pueden coordinarse para ejecutar importantes funciones
20 biológicas, muchas de ellas implicadas en la virulencia de importantes
patógenos, como: movilidad, "*swarming*", agregación, luminiscencia,
biosíntesis de antibióticos, factores de virulencia, simbiosis, formación y
diferenciación de biofilms, transferencia de plásmidos por conjugación,...
(Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134).

25

Las señales de QS más estudiadas y conocidas son las *N*-acil-homoserin
lactonas (AHLs) empleadas por numerosas bacterias Gram-negativas
(Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134). Las AHLs,
también conocidas como *autoinducers* (AIs), son una familia de moléculas
30 señales usadas en el sistema de QS de muchas bacterias, principalmente
Gram negativas, que se basan en un anillo lactona con una cadena lateral

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

2

acilo de tamaño variable entre 4 y 14 carbonos, con o sin saturación y con o sin sustituciones Oxo- o Hidroxi- en el tercer carbono (Whitehead *et al.*, 2001. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404). Como las poblaciones de especies bacterianas coordinadas por QS obtienen importantes ventajas competitivas en sus múltiples interacciones con otros procariontes y eucariotas, sus competidores han desarrollado mecanismos para interferir con su comunicación por sistemas QS, a estos mecanismos se les conoce como "quorum quenching" (QQ). Se basan en la producción de inhibidores que mimetizan las AHLs bloqueando el receptor, como las furanonas producidas por el alga marina *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996. *J Bacteriol* 178: 6618-6622). Otra estrategia para bloquear los sistemas de QS mediados por AHLs es la degradación enzimática de las moléculas señal. Hasta el momento se han descrito dos tipos principales de enzimas que llevan a cabo esta degradación: las Lactonasas que hidrolizan el anillo lactona y las acilasas que rompen el enlace entre el anillo lactona y la cadena lateral (Dong *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211).

Aunque la síntesis de quimioterápicos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en el siglo pasado una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de algunas bacterias patógenas es un grave problema mundial, que obliga a la industria farmacéutica a desarrollar nuevas generaciones de antibióticos más potentes, y que puede originar cepas multirresistentes en las que el tratamiento es más largo y con frecuencia ineficaz, llegando incluso a la muerte del paciente. La presión selectiva que se ejerce en el ambiente microbiano, el estado inmunitario del hospedero, los microambientes bacterianos y factores propios de las bacterias involucradas, tienen un papel importante en el desarrollo de la resistencia.

Debido a que gran cantidad de patógenos humanos (p. e.: *Pseudomonas*

putida, *Serratia* spp,...), de plantas (p. e.: *Agrobacterium* spp., *Erwinia carotovora*,...) y patógenos marinos (p. e.: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*,...) (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52.) usan AHLs para el control de producción de factores de virulencia, la interferencia con estos sistemas de comunicación constituye una interesante y prometedora vía para el control de enfermedades infecciosas bacterianas (Dong & Zhang. 2005. *J Microbiol* 43: 101-109; Dong *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211). Además este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas. El interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas es que al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno sino a la expresión de los factores de virulencia no ejercen presión selectiva evitando la aparición de resistencias.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presión selectiva que representa la aplicación a gran escala de los quimioterápicos ha permitido la diseminación de cepas microbianas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones dificultan el adecuado tratamiento clínico, llegando incluso a la muerte del paciente. Puesto que muchas bacterias usan el sistema de señales de QS para sincronizar la expresión genética y coordinar su actividad biológica dentro de una población, controlando la virulencia y la formación de biofilms entre otras funciones biológicas, una vía para evitar el aumento de mecanismos de resistencia de las bacterias patógenas sería controlar estos sistemas de señales QS. La inhibición de este sistema de señales es lo que se ha denominado *Quorum Quenching* (QQ). La presente invención proporciona

los medios para controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de estas bacterias y evitando así la aparición de resistencias así como para la inhibición de otros procesos de colonización bacteriana en las que están implicadas las señales de QS tipo AHL, como la formación de biofilms. En la presente invención se describe por primera vez el uso de células bacterianas del género *Tenacibaculum* capaces de degradar las N-Acil-homoserin lactonas (AHLs), para el control de enfermedades infecciosas bacterianas y para la inhibición de la formación de biofilms.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para *quorum quenching*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, se usan para degradar N-Acil-homoserin lactonas (AHLs).

Cualquier bacteria regula su expresión génica en respuesta a diferentes señales medioambientales, una propiedad esencial para competir con otros organismos. En el caso particular de bacterias patógenas, la regulación génica es crucial para permitir la supervivencia de la bacteria al particular ambiente que le ofrece su hospedador. Los genes de virulencia bacterianos están sujetos a complejos mecanismos de regulación para asegurar la expresión del gen apropiado en el momento apropiado. Las AHLs son las señales de QS más estudiadas y conocidas, y son empleadas por multitud de bacterias patógenas humanas, de plantas y marinas para el control de la producción de factores de virulencia.

Por tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención es el uso de las células bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, o cualquiera de sus combinaciones, que son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, y por tanto interferir con el sistema de señales de QS de bacterias, para elaborar un medicamento. En una realización aún más preferida, el medicamento se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

- 10 Los "biofilms" o "biopelículas", tal y como se definen en esta memoria, son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Es una comunidad de bacterias (de una única especie o varias), que se adhiere a una superficie sólida. La inhibición de las AHLs permitiría inhibir
- 15 la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por QS.

Los biofilms producen una gran cantidad de polisacáridos extracelulares, responsables de la apariencia viscosa, y se caracterizan por una gran resistencia a agentes antibióticos. Esta resistencia puede deberse a que la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas las bacterias proporciona una barrera frente a la penetración de biocidas. Otra posibilidad es que la mayoría de las células del biofilm crecen muy lentamente, en un estado de privación de comida, por lo que no son susceptibles al efecto de los agentes antimicrobianos. Un tercer aspecto

20 podría ser que las células en el biofilm adoptasen un fenotipo distinto, por ejemplo, mediante la expresión de bombas efluentes de fármacos.

La contaminación biológica de superficies es común, pudiendo desarrollarse el biofilm sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, y conduce a la degradación del material, productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de

30

calor en procesos acuáticos. Los biofilms son también la primera causa de la contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biofilms en los sistemas antiincendios. El establecimiento de bacterias adheridas a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos, conlleva serios problemas higiénicos e incluso casos de toxiinfecciones alimentarias, así como numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar (Carpentier & Cerf, 1993. *J App Bacter.* 75:499-511).

En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biofilm en estructuras sumergidas tales como jaulas, redes y contenedores; o equipamiento tales como cañerías, bombas, filtros y tanques colectores, y para especies de cultivo, como mejillones, vieiras, ostras, etc. Se conoce como *biofouling* y afecta a todos los sectores de la acuicultura europea, siendo un problema creciente debido a la aplicación de la Directiva de Productos Biocidas EC 98/8/EC, resultando en sustanciales pérdidas económicas. Tiene además, repercusiones ecológicas importantes porque los organismos acuáticos que se afianzan a los cascos de los barcos como consecuencia del *biofouling* acompañan a estos navíos a donde quiera que vayan. Esto ha significado un problema ecológico mundial, ya que los barcos están trasladando especies invasoras hacia los lagos, los ríos y los océanos que no son su hábitat original.

Así, la fabricación de pinturas anti-incrustaciones con células bacterianas del género *Tenacibaculum*, el extracto celular crudo o el sobrenadante de los cultivos de dichas bacterias reduciría el *biofouling* en los cascos pintados con ella, sin tener elementos químicos tóxicos para la vida marina.

Por tanto, en otra realización preferida, las células bacterianas del género

Tenacibaculum, el extracto celular crudo o el sobrenadante de los cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, se usan para inhibir la formación de biofilms.

- 5 Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan los biofilms con distintos procesos infecciosos en humanos (Tabla 1) (Wilson, 2001. *Sci Prog* 84: 235-254; Costerton *et al.*, 1999. *Science* 1999; 284: 1318-1322). Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha
- 10 sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente
- 15 relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.

- Además este tipo de mecanismos en combinación con antibióticos puede
- 20 ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas. Por tanto, una realización
- 25 aún más preferida de este aspecto de la invención es el uso de las células

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>

Infecciones del músculo-esquelético	Cocos Gram positivos (ej. Staphylococos)
Fasciitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	Streptococos del grupo viridans
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Enfermedades nosocomiales	
- Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
- Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Bucles esclerales	Cocos Gram positivos
- Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y otros cocos Gram positivos
- Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
- Periodontitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
- DIU	<i>Actinomyces israelii</i> y muchos otros
- Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
- Catéteres Hackman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
- Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
- Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
- Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
- Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
- Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

Tabla 1. Procesos infecciosos humanos en los que interviene la formación de biofilm.

- 5 bacterianas del género *Tenacibaculum*, del extracto celular crudo o del sobrenadante de cultivos de dichas bacterias del género *Tenacibaculum*, que son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, en combinación con antibióticos, para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas o inhibir la formación de biofilms.
- 10 Las bacterias del género *Tenacibaculum* de la invención se caracterizan por ser capaces de degradar AHLs. Para llevar a cabo la presente

invencción se ensayaron distintas cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum*. Así por ejemplo, esta actividad degradadora de AHLs fue detectada en diferentes ensayos con los biosensores: *Chromobacterium violaceum* CV026 con las AHLs: *N*-Hexanoil-L-homoserin lactona (C6-HSL) (Fig. 1A) y C10-HSL (Fig. 1B), *Escherichia coli* JM109 pSB536 ó pSB1075 con las AHLs: C4 y C12-HSL, y confirmada por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) con las AHLs C4, C6, C8, C10, C12 y C14-HSL (Para C4 y C12-HSL, Fig. 2).

10 La información que se proporciona en esta memoria es suficiente para permitir a un experto en la materia identificar a otras cepas y otras especies que estén dentro de este género.

El género *Tenacibaculum* fue descrito por Suzuki *et al.* en 2001 (Suzuki *et al.*, 2001. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1639-1652) en base a sus características filogenéticas, quimiotaxonómicas y fenéticas, combinando dos especies del género *Flexibacter* (*F. maritimus* y *F. ovolyticus*, describiendo *Tenacibaculum maritimum* como la especie tipo, y otras dos especies nuevas para el género, *Tenacibaculum mesophilum* y 20 *Tenacibaculum amylolyticum*. Posteriormente se han añadido otras especies al género, existiendo en la fecha de redacción de esta memoria, un total de 14 especies aceptadas:

- Tenacibaculum adriaticum* Heindl *et al.* 2008.
- 25 *Tenacibaculum aestuarii* Jung *et al.* 2006.
- Tenacibaculum aiptasiae* Wang *et al.* 2008.
- Tenacibaculum amylolyticum* Suzuki *et al.* 2001.
- Tenacibaculum discolor* Piñeiro-Vidal *et al.* 2008.
- Tenacibaculum gallaicum* Piñeiro-Vidal *et al.* 2008.
- 30 *Tenacibaculum litopenaei* Sheu *et al.* 2007.
- Tenacibaculum litoreum* Choi *et al.* 2006.

Tenacibaculum lutimaris Yoon et al. 2005.

Tenacibaculum maritimum (Wakabayashi et al. 1986) Suzuki et al. 2001,

Tenacibaculum mesophilum Suzuki et al. 2001.

Tenacibaculum ovolyticum (Hansen et al. 1992) Suzuki et al. 2001.

5 *Tenacibaculum skagerrakense* Frette et al. 2004.

Tenacibaculum soleae Piñeiro-Vidal et al. 2008.

Por las especiales características de estos organismos, que aún no se han estudiado en profundidad, y por las dificultades que supone su descripción, ésta será más fácil y fiable si su delimitación taxonómica se basa en métodos de biología molecular.

Así, en la identificación de un microorganismo como perteneciente al género *Tenacibaculum* son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las cepas de *Tenacibaculum* son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la homología global de los genomas al nivel de los nucleótidos, y más concretamente a nivel de la región 16 S del ARN ribosómico nuclear, y más concretamente al polinucleótido de la región 16S del ARN ribosómico nuclear que se recoge en la SEQ ID NO: 1, y que pertenece al microorganismo depositado en el CECT con número 7426 el 18 de junio de 2008 y que en este documento se denomina como *T. discolor* cepa 20J, sea de un 80% o mayor, y más preferiblemente de un 85%, de un 90%, de un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia genómica de la(s) cepa(s) de *Tenacibaculum* putativa(s) y la secuencia de otro microorganismo se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia del polinucleótido procedente del *Tenacibaculum* putativo, y la secuencia del polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 de esta memoria. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a

ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J Mol Biol* 215: 403-410). Por ejemplo, también, aquéllas se pueden determinar por hibridación de los polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión
5 con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), seguido por determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

El porcentaje de homología se ha determinado midiendo la identidad entre el polinucleótido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 (perteneciente a la
10 cepa del género *Tenacibaculum* depositada en el CECT) y todos los polinucleótidos homólogos del género *Tenacibaculum* que se encontraban recogidos en el momento de escritura de esta memoria, en el GenBank. Tras este análisis cabe pensar que un organismo que pertenezca al género *Tenacibaculum* tendrá un polinucleótido homólogo al de la SEQ ID
15 NO: 1, perteneciente a la región 16S de su RNA ribosómico nuclear, que presente, al menos, una identidad del 80% con éste.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa de células bacterianas del género *Tenacibaculum*, que han sido depositadas en la Colección
20 Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 7426. Dicha cepa bacteriana se ha identificado como perteneciente a la especie *Tenacibaculum discolor*, y la secuencia de polinucleótidos de la región ribosómica 16S se recoge parcialmente en la SEQ ID NO: 1.

25 En relación con otras cepas de bacterias con actividad QQ, la cepa con número de depósito CECT 7426 presenta una elevada actividad degradadora, alta inespecificidad, siendo capaz de degradar todas las AHLs probadas con cadenas de entre 4 y 14 carbonos en un periodo de 24 horas según datos obtenidos mediante cuantificación por LC-MS, buen
30 crecimiento, capacidad de crecer en medios marinos y no marinos, y carácter constitutivo de la actividad QQ que deriva de la degradación

inmediata de AHLs (no es necesaria la exposición de la bacteria a AHLs para que se active).

Se trató de determinar el tipo de actividad enzimática de *Tenacibaculum*
5 *discolor* de la cepa depositada con número de acceso CECT 7426, para
ello se acidificó a pH 2.0 tras la degradación. Se observó una recuperación
de C4 (Fig. 2) y C6-HSL (Fig. 1A) tras la acidificación, indicando una
actividad del tipo lactonasa, porque el pH ácido cierra el anillo lactona. Sin
embargo no se recupera C10-HSL (Fig. 1B) y C12-HSL (Fig. 2), lo que
10 indica la presencia de una doble actividad enzimática: lactonasa para
AHLs de cadena lateral corta y acilasa para AHLs de cadena lateral larga.
Esto está apoyado por la distinta cinética de degradación observada para
30 μ M C4-HSL y C12-HSL, que fue determinada por LC-MS (Fig. 4). La
cepa 20J degrada toda la C12 en 30 min y la C4 en 8 horas (Fig. 4). La
15 actividad degradadora se encuentra tanto en el sobrenadante como en el
extracto celular crudo (CCE) de cultivos (Fig. 5), lo que posibilita la
utilización de la cepa viva o de extractos celulares crudos o purificados
para sus aplicaciones biotecnológicas.

20 La alta capacidad degradadora y amplio rango de especificidad mostrada
por los enzimas de las bacterias del género *Tenacibaculum*, miembros del
grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes* (CFB), contra el rango de
tamaños de cadena lateral de AHL: C4-C14 lo convierte en un candidato
prometedor para el control de patógenos con QS basado en AHL en salud
25 humana, cultivos marinos, animales y plantas, así como para la inhibición
de la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por
QS.

Así, en una realización preferida de este aspecto de la invención la célula
30 bacteriana del género *Tenacibaculum* con el número de depósito CECT
7426, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, o

cualquiera de sus combinaciones, se usa para *quorum quenching*. En una realización más preferida, se usa para degradar N-Acil homoserin lactonas. En otra realización aún más preferida se usa para elaborar un medicamento. En otra realización aún mucho más preferida, el medicamento se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas. En otra realización preferida, se usa para inhibir la formación de biofilms. En otra realización aún más preferida se usa en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos. En una realización aún más preferida las bacterias causantes de la enfermedad infecciosa o de la formación del biofilm son bacterias Gram negativas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a. una célula bacteriana perteneciente al género *Tenacibaculum*,
- 15 b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de a),
- c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de a),

o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como agente antibacteriano.

20

Un agente antibacteriano es una sustancia química natural (sintetizadas por hongos o bacterias) que inhibe el crecimiento (bacteriostático) o mata a las bacterias (bactericida).

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, que comprende:

- a. una célula bacteriana perteneciente al género *Tenacibaculum*,
- b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de a),
- 30 c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de a),

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

14

o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento.

5 En una realización preferida, la composición de la invención se usa para el tratamiento de infecciones bacterianas. En otra realización preferida, la composición de la invención se usa para elaborar un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los biofilms bacterianos son una causa común de infecciones bacterianas, tanto en humanos (Costerton *et al.*, 1999. *Science* 284: 1318-1322), como en animales y plantas. En otra
10 realización preferida, la composición de la invención se usa para inhibir la formación de biofilms. En otra realización preferida, la composición de la invención se usa en combinación con otros agentes antibacterianos. En una realización aún más preferida, las bacterias que provocan la formación de biofilm y/o la infección son bacterias Gram negativas.

15 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre, animales y plantas. En el contexto de la presente invención las enfermedades son provocadas
20 por la infección de bacterias patógenas.

El término "infección" es el término clínico para describir la colonización de un organismo huésped por organismos de otras especies. En la utilización
25 clínica del término infección, el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno.

El término "género", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que
30 comprende una o más especies relacionadas filogenéticamente y morfológicamente similares. También se espera que compartan

características químicas y metabólicas similares.

Por "categoría taxonómica" se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

5

El término "polinucleótido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polímera de nucleótidos de cualquier longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucléico" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren

10

exclusivamente a la estructura primaria de la molécula.

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los

15

nucleótidos de dos o más polinucleótidos.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos homólogos que se comparan.

20

El término "genotipo", tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la constitución hereditaria o genética de un individuo; todo el material genético contenido en una célula, al que, por lo general, se denomina material nuclear.

25

El término "fenotipo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo; producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

30

El término "especie tipo" hace referencia a la especie designada como el tipo de un género o un subgénero, siendo el "tipo" bajo el punto de vista

taxonómico, el elemento simple de un taxón al cual se le asigna permanentemente el nombre y sobre el que están basadas las características descriptivas que satisfacen las condiciones de disponibilidad o de publicación válidas.

5

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las células bacterianas puede ser cualquier medio conocido en el estado del arte. Preferiblemente el medio contiene los componentes que comprenden el medioambiente de donde se coge la muestra. Por ejemplo, el medio de cultivo de bacterias marinas contiene preferiblemente sales marinas. El soporte sólido para crecer colonias aisladas individuales puede ser agar, agar noble, Gel-Rite o cualquier otro medio sólido conocido en el estado del arte.

10

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

25

Fig. 1. Ensayo con *Chromobacterium violaceum* CV026 para detectar degradación por *Tenacibaculum discolor* 20J de 2 μ M C6-HSL (A) y C10-HSL (B) en relación con controles antes (C) y después de acidificar a pH 2.0 (C Ac).

30

Fig. 2. Ensayo con las cepas indicadoras *Chromobacterium violaceum*

CV026 y *C. violaceum* VIR07 para detectar degradación por *Tenacibaculum discolor* 20J y de *T. maritimum* de 2 μ M C6-HSL (A) y C10-HSL (B), donde se observa que *T. maritimum* no degrada C6-HSL.

5 **Fig. 3.** Porcentaje de degradación de C4-HSL (barras negras) y C12-HSL (barras blancas) por *Tenacibaculum discolor* 20J sin y con acidificación (Ac) en relación a controles (C) (50 μ M) cuantificada mediante Lc-MS.

10 **Fig. 4.** Cinética de degradación de C4-HSL (4A) y C12-HSL (4B) por cultivos vivos de la cepa *T. discolor* 20J medida por LC-MS. Concentración inicial de las AHLs: 30 μ M.

15 **Fig. 5.** Actividad degradadora de C4-HSL (5A) y C12-HSL (5B) en cultivos celulares completos de la cepa *T. discolor* 20J, extractos crudos celulares (CCE) y sobrenadante (SUP) después de 24 horas. La cuantificación de las AHLs se llevó a cabo por LC-MS. Los extractos se midieron con y sin acidificación para estimar el grado de posible actividad lactonasa presente. Concentración inicial de las AHLs: 50 μ M.

20

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de distintas cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* para degradar N-Acil homoserin lactonas.

Metodología de aislamiento de las cepas bacterianas marinas

Para la detección de bacterias marinas con actividad *quorum quenching* (QQ) de señales tipo AHL se procedió al aislamiento de colonias procedentes de muestras de diferentes medios marinos.

5 Se tomaron tres tipos de muestras con material estéril:

-Muestra de sedimento de un tanque-reservorio de agua de mar de un circuito cerrado para el cultivo de peces de la Universidad de Santiago de Compostela.

10

-Muestra de biopelícula de un tanque de cemento para el cultivo marino de peces en circuito abierto del instituto IGAFa (Isla de Arosa).

15 -Muestra de alga *Fucus* sp. obtenida de un sustrato rocoso intermareal en la Illa de Arousa. 1 g del alga fue troceado y diluido en 10 ml de agua de mar esterilizada.

Los medios sólidos empleados para el aislamiento fueron: Triptona soja agar (TSA) 1% NaCl, Agar marino (AM, Difco), Agar marino en dilución
20 1/100, medio FAS suplementado con 1 g/L de casaminoácidos (FAS CAS) (Schut *et al.*, 1993. *Appl Environ Microbiol* 59: 2150-2160) y medio FAS suplementado con 0.5 g/L de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL) (Bruns *et al.*, 2002. *Appl Environ Microbiol* 8: 3978-3987). Se prepararon 3 diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) en agua de mar esterilizada
25 para cada una de las muestras y se sembraron en placas con los medios de cultivo nombrados. Las placas fueron incubadas a 15 y 22°C durante 15 días. Se aislaron un total de 165 colonias en función de su diferente morfología y tonalidad para el análisis de actividad QQ. Puesto que las 165 cepas obtenidas presentaban crecimiento en AM a 22°C, se seleccionaron
30 estas condiciones de cultivo como método de cultivo estándar y para su mantenimiento en el laboratorio.

Detección de actividad QQ

Las 165 cepas aisladas fueron ensayadas para su actividad QQ utilizando dos tipos de ensayos: en medio líquido y sólido.

5

Las AHLs utilizadas en el ensayo líquido para detectar la capacidad degradadora/inhibidora de las cepas fueron N-Butiril-L-homoserín lactona (C4-HSL) como representante de las AHLs de cadena corta y N-Dodecanoil-L-homoserín lactona (C12-HSL) como representante de AHLs de cadena larga. Para cuantificar las AHLs se utilizaron dos biosensores de *E. coli* JM109 transformados cada uno con un plásmido portador del operón lux, para la detección de C4-HSL (pSB536) y para la detección de C12-HSL (pSB1075). Los biosensores se cultivaron a 37°C en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado (Winson *et al.*, 1998. *FEMS Microbiol Lett* 163:185-192).

10
15

Cada aislado marino se inoculó en tubos eppendorf con 1 mL de Caldo Marino (CM) y se incubó a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas de incubación el cultivo fue dividido en dos microtubos y centrifugado a 2000 x g durante 5 min. Los correspondientes pellets fueron resuspendidos en CM fresco con 50 µM C4-HSL ó C12-HSL e incubados durante otras 24 horas a 22°C y 200 rpm para permitir la posible degradación de las AHLs. Una vez incubados, los cultivos se centrifugaron a 2000 x g, 5 min y se pipetearon 10 µL de sobrenadante en una placa microtiter para cuantificar la actividad AHL. Ésta se midió mediante la adición de 90 µL de una dilución 1/100 de cultivos de 12 horas a 37°C 200 rpm de las cepas biosensoras basadas en lux, *E. coli* JM109 pSB536 ó pSB1075 antes mencionadas, usando un luminómetro (Ultra Evolution Xfluor4beta E 4.51e) tras 4 horas de incubación a 37°C de las placas microtiter. Se dispusieron diferentes placas para cada AHL y biosensor. Como controles se usaron pocillos con 10 µL de CM con y sin C4-HSL ó C12-HSL 50 µM.

20
25
30

Para el ensayo sólido se utilizaron dos biosensores derivados de la especie *Chromobacterium violaceum* en los que la producción del exopigmento violaceína es dependiente de la presencia de AHLs en el medio de cultivo. La cepa *C. violaceum* CV026 se utilizó inicialmente para la comprobación de los resultados obtenidos en los bioensayos realizados en medio líquido con las cepas de *E. coli*, permitiendo la detección de la degradación de N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL, McClean *et al.*, 1997. *Microbiol* 143: 3703-3711). Con posterioridad se confirmó la capacidad de degradación de C10-HSL utilizando la cepa *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Lett* 279: 124-130). Las cepas marinas aisladas se inocularon en tubos con 1 mL de CM a 22°C y 200 rpm. Tras 24 horas se centrifugaron 500 µL de los cultivos a 2000 x g, durante 5 min y se resuspendieron en 500 µL de CM al que se añadió C6-HSL ó C10-HSL 2 µM, incubándose durante otras 24 horas. Para la evaluación de la degradación de las AHLs, se colocaron 50µL de los sobrenadantes de estos cultivos en pocillos realizados con un sacabocados en placas de LB cubiertas con LB blando inoculado con 500µL de un cultivo de 12 horas de *C. violaceum* CV026 ó *C. violaceum* VIR07, añadiéndose 50 µL de agua destilada estéril para completar el volumen del pocillo. Tras 24 horas de incubación a 25°C se observó la producción de violaceína.

En algunos casos, para la detección de la degradación de AHLs de cadena larga se utilizó el ensayo de inhibición de producción de violaceína con la cepa *C. violaceum* CV026 (Fig. 1B). En este caso, para evaluar la degradación de C10-HSL se prepararon placas de LB cubierto con LB blando inoculado con la cepa sensora a la que se le añadió su AHL afín, C6-HSL. En este caso la presencia de C10-HSL produce un halo de inhibición en la producción de violaceína inducida por la C6-HSL. La degradación de C10-HSL se detecta en este ensayo por la desaparición o

disminución del halo de inhibición (McClellan *et al.*, 1997. *Microbiol* 143: 3703-3711).

5 La identificación de la cepa bacteriana que degradó AHLs se realizó por amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias.

10 A continuación se realizó un análisis BLAST de las secuencias frente a las bases de datos del NCBI, recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia. Así, la cepa 20J se identificó como *Tenacibaculum discolor* con una semejanza de 1018/1019 pb (99,9%) sobre la secuencia AM411030 (cepa tipo DSM 18842).

15 Adicionalmente se probaron otras cepas de distintas especies del mismo género (Tabla 2) para ver si presentaban actividad degradatoria de AHLs. Todas las cepas y especies ensayadas degradaron tanto C6-HSL como C10-HSL, a excepción de *T. maritimum*, que no degradó C6-HSL (Fig. 2).

20

CEPA	C6-HSL	C10-HSL
<i>T. maritimum</i> NCIMB2154	-	+
<i>T. discolor</i> 20J (aislado propio)	+	+
<i>T. discolor</i> DSM 18842	+	+
<i>T. soleae</i> NCIMB 14368	+	+
<i>T. gallaicum</i> DSM 18841	+	+

Tabla 2. Cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* ensayadas.

Especificidad de la actividad QQ

- Se seleccionó *Tenacibaculum discolor* 20J por ser el único aislado con actividad QQ contra las tres AHLs testadas inicialmente (C4-HSL, C6-HSL y C12-HSL), para determinar el tipo de actividad QQ que presentaba y su especificidad contra un rango más amplio de longitud de cadena lateral de AHL mediante LC-MS, técnica analítica que permite comprobar de forma inequívoca la degradación de las AHLs.
- 5
- 10 La cepa fue inoculada en 20mL de CM e incubada a 22°C y 200 rpm; tras 24h se tomaron muestras de 500µL para su centrifugación. Los pellets se resuspendieron en 500 µL de CM, con AHL 50 µM (C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL ó C14-HSL) y fueron incubados otras 24 horas a 22°C y 200 rpm. Los sobrenadantes (2000 x g 5 min) de estos cultivos se
- 15 extrajeron tres veces con el mismo volumen de Etil-Acetato y se evaporaron bajo flujo de nitrógeno. El extracto seco obtenido se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo y se procedió a la cuantificación de las AHLs por LC-MS. De la misma forma se extrajeron muestras control con 500 µL de CM más AHL 50 µM.
- 20
- El sistema LC utilizado fue un Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Con columna: Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4.6 mm (tamaño de partícula de 5 µm). La fase móvil: ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y metanol (B), y la velocidad de flujo de 0.4 mL/min. El gradiente
- 25 establecido fue el siguiente: 50%B de 0 a 10 min, seguido de un gradiente lineal del 50 al 90%B durante 15 min, seguido de 90%B durante 25 min (Morin *et al.*, 2003. *J Chromatogr A*, 1002:79-92). La columna se reequilibró durante 4 min. En la columna se inyectó un volumen de 20 µL de muestra diluida en ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. El MS utilizado
- 30 fue un API4000 triple-cuadrupolo con trampa de iones lineal (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), en modo electrospray de iones

positivos. Como estándares para la identificación y cuantificación de las AHLs presentes en las muestras se utilizaron AHLs sintéticas de longitudes de cadena de 4 a 14 carbonos. La cuantificación de AHLs en las muestras se realizó mediante extrapolación en curvas de calibración
5 obtenidas a partir de la abundancia de los iones moleculares obtenidos para cada AHL patrón con concentración conocida (Milton *et al.*, 2001. *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

Para determinar el tipo de actividad enzimática degradadora de AHLs
10 (acilasa o lactonasa) presente en *Tenacibaculum discolor* 20J se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: Duplicados de los cultivos anteriormente descritos a los que se habían añadido C4-HSL y C12-HSL se acidificaron hasta pH 2,0 con HCl 1M y se incubaron 24 horas más en las mismas condiciones para la posterior extracción de AHLs y cuantificación por LC-
15 MS. La acidificación del medio de cultivo permite la recuperación de la actividad AHL solamente en el caso de que la molécula haya sido degradada por una lactonasa (Yates *et al.*, 2002. *Infect Immun* 70: 5635–5646). Paralelamente se realizó un ensayo en sólido con *C. violaceum* CV026 para las AHLs: C6-HSL, C10-HSL y C12-HSL, con y sin
20 acidificación hasta pH 2,0 (Yates *et al.*, 2002. *Infect Immun* 70: 5635–5646).

Cinética de degradación de AHLs

25 Se incubaron a 22°C y 200 rpm 60 mL de CM inoculados con *Tenacibaculum discolor* 20J. Tras 24 horas, el cultivo fue dividido y centrifugado (2000 x g 5 min), y el pellet se lavó dos veces con 10 mL de PBS pH 6,5. En las dos suspensiones celulares así obtenidas se añadió C4-HSL ó C12-HSL a una concentración final de 30 µM. Las mezclas de
30 reacción fueron incubadas a 22°C y 200 rpm durante 24 horas y se fueron tomando muestras de 500 µL a diferentes tiempos desde el tiempo 0.

Estas muestras se extrajeron mediante el procedimiento anteriormente descrito y las concentraciones de C4-HSL ó C12-HSL restantes en cada muestra se determinaron por LC-MS (Milton *et al.*, 2001. *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

5

Localización de la actividad de degradación de AHLs

Para determinar la localización celular de la actividad degradadora de AHLs, se obtuvo el sobrenadante y extracto celular crudo (CCE) de un cultivo de 24 horas de *Tenacibaculum discolor* 20J en 15 mL de CM. Se centrifugó el cultivo durante 5 minutos a 2000 x g para separar la biomasa del medio de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y fue almacenado a 4°C hasta su utilización. El pellet se lavó con 15 mL de PBS pH 6,5, se resuspendió en otros 5 mL del mismo tampón, se sonicó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 16000 x g durante 90 min a 4°C. El CCE así obtenido se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y se almacenó a 4°C (Uroz *et al.*, 2005. *Microbiol* 151: 3313-3322).

Con el sobrenadante y el CCE de *Tenacibaculum discolor* 20J se realizaron dos ensayos:

20

-Un ensayo en sólido con *C. violaceum* CV026 como se describió anteriormente. Se incubaron 500 μL de sobrenadante y de CCE durante 24 horas con C6 ó C10-HSL 20 μM a 22°C y 200 rpm. Los controles se incubaron de la misma forma, con 500 μL de CM ó PBS C6 ó C10-HSL 20 μM .

25

-Otro ensayo con 500 μL de sobrenadante y de CCE incubados 24 horas con C4 ó C12-HSL 50 μM a 22°C y 200 rpm con o sin acidificación hasta pH 2,0 con HCl 1M (24 horas más a 22°C y 200 rpm). Las concentraciones de las AHLs tras este ensayo fueron cuantificadas por LC-MS como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con la degradación

30

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

25

del cultivo completo (bacteria viva) incubado en las mismas condiciones y con controles de CM fresco con C4 ó C12-HSL 50 μ M.

WO 2010/012852

PCT1596-13

PCT

25/1
[X]

PCT/ES 2009/070306

PCT/ES2009/070306

Impresión (original en formato electrónico)
(Esta hoja no forma parte de la solicitud internacional y no cuenta como una de sus hojas)

0-1	Formulario PCT/RO/134 (SAFE) Indicaciones relativas al Depósito de Microorganismo(s) u otro Material Biológico (Regla 13bis del PCT)	
0-1-1	Preparado usando	PCT-SAFE Version 3.51.041.217 MT/FOP 20090701/0.20.5.17
0-2	Solicitud internacional No.	PCT/ES 2009/070306
0-3	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PCT1596-13
1	Las indicaciones hechas a continuación se refieren al(los) microorganismo(s) u otro material biológico depositado mencionado en la descripción en:	
1-1	página	10
1-2	línea	20-22
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución de depósito	CECT Colección Española de Cultivos Tipo
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot (Valencia), Spain
1-3-3	Fecha de presentación	18 Junio 2008 (18.06.2008)
1-3-4	Número de orden	CECT 7426
1-5	Las indicaciones son dadas para los siguientes Estados designados	todas las designaciones

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA ÚNICAMENTE

0-4	Este formulario fue recibido con la solicitud internacional: (sí o no)	Si
0-4-1	Funcionario autorizado	Dolores Bautista

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL ÚNICAMENTE

0-5	Este formulario fue recibido por la Oficina Internacional el:	
0-5-1	Funcionario autorizado	

"ÚLTIMA HOJA AÑADIDA"

REIVINDICACIONES

1. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum* cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 80% con la
5 secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para *quorum quenching*.
2. Uso de una célula bacteriana según la reivindicación anterior, del
10 extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para degradar N-Acil homoserin lactonas.
3. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto
15 celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para elaborar un medicamento.
4. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto
20 celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para elaborar un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.
5. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto
25 celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para inhibir la formación de biofilms.
6. Uso de una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*, del extracto
30 celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

27

combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.

- 5 7. Uso de una célula bacteriana, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde las bacterias causantes de la enfermedad infecciosa o de la formación del biofilm son bacterias Gram negativas.
- 10 8. Cepa de células bacterianas del género *Tenacibaculum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número de depósito CECT 7426.
- 15 9. Uso de la célula bacteriana del género *Tenacibaculum* con el número de depósito CECT 7426, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 20 10. Composición que comprende:
a. una célula bacteriana del género *Tenacibaculum*,
b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de a),
c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de b),
o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como agente antibacteriano.
- 25 11. Uso de la composición según la reivindicación anterior, para la elaboración de un medicamento.
- 30 12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas.

13. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.

5 14. Uso de la composición según la reivindicación 8 para inhibir la formación de biofilms.

10 15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-14 donde la formación de biofilm o las infecciones bacterianas son provocadas por bacterias Gram negativas.

15

20

25

30

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

1/4

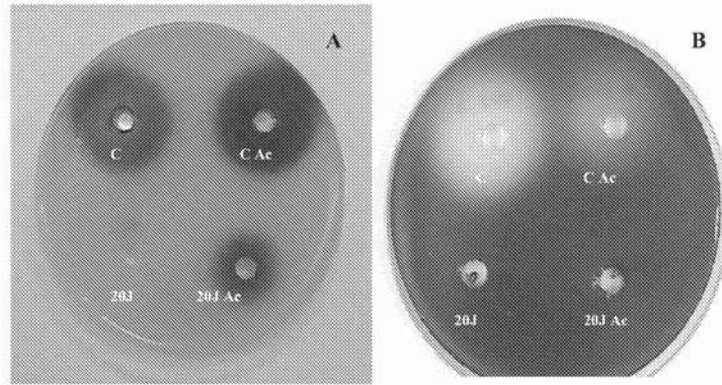


FIG. 1

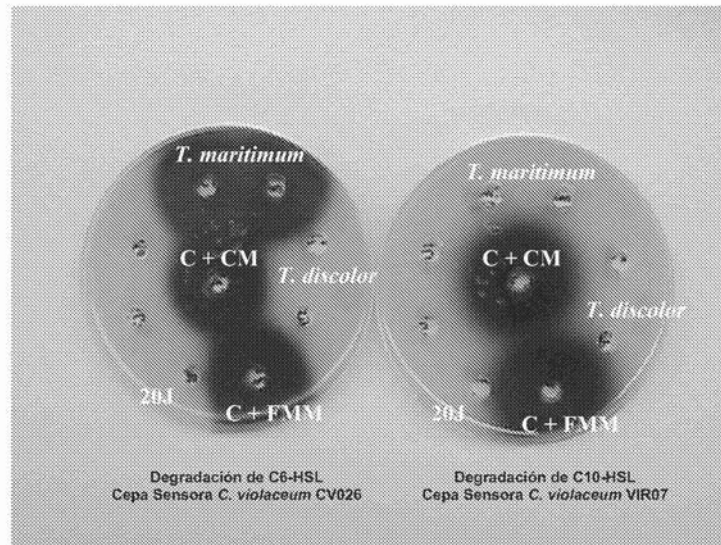


FIG. 2

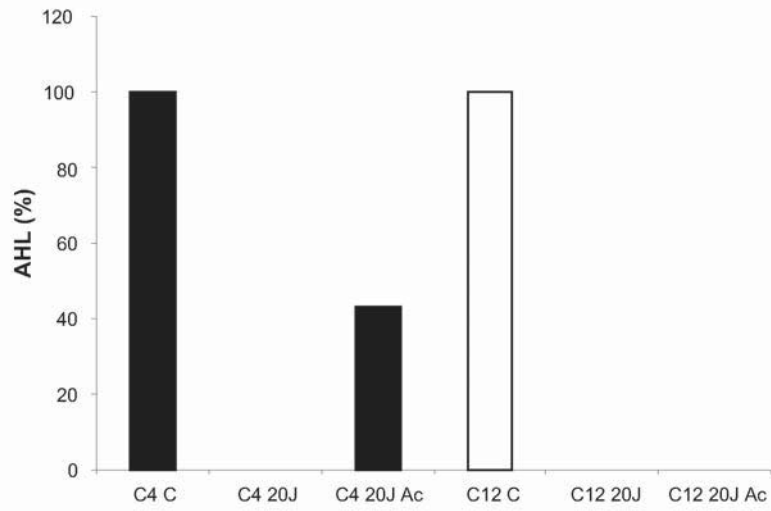


FIG. 3

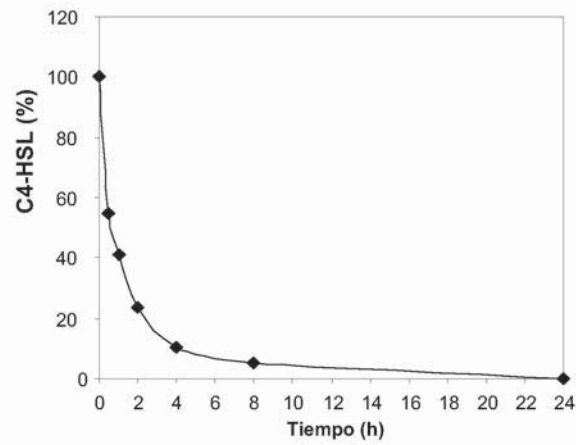


FIG. 4A

WO 2010/012852

PCT/ES2009/070306

3/4

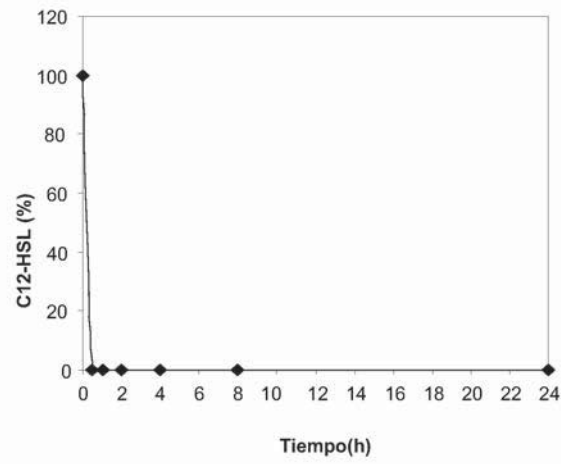


FIG. 4B

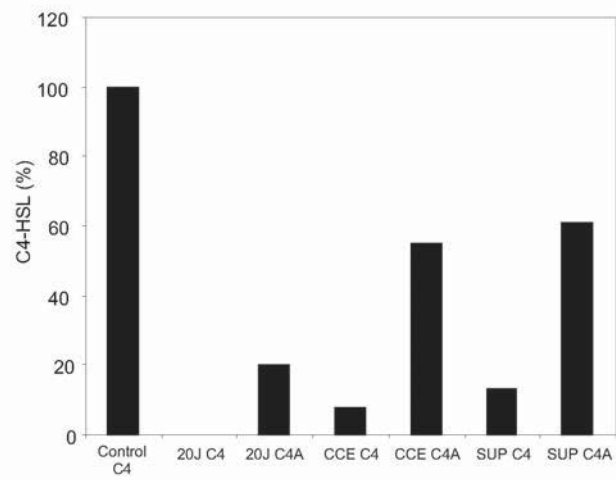


FIG. 5A

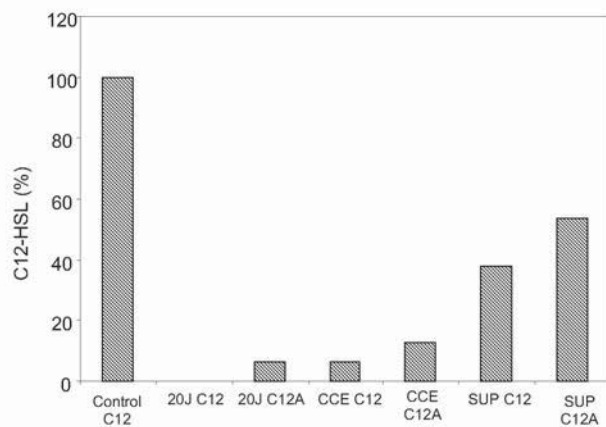


FIG. 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2009/070306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Piñero-Vidal M. et al. <i>Tenacibaculum discolor</i> sp. nov. and <i>Tenacibaculum gallaicum</i> sp. nov., isolated from sole (<i>Solea senegalensis</i>) and turbot (<i>Psetta maxima</i>) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 01.2008, Vol. 58, pages 21-25. DOI 10.1099/ijs.0.65397-0 (the whole document).	1, 4-10, 12-15
A	Lin Y. et al. Acyl-homoserine lactone acylase from <i>Ralstonia</i> strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Molecular Microbiology. 2003, Vol. 47, N° 3, pages 849-860 (the whole document).	1, 4-10, 12-15
A	Dong Y. et al. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. The Journal of Microbiology. 02.2005, Vol. 43, N° 5, pages 101-109 (the whole document).	1, 4-10, 12-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 16.October.2009 (16.10.2009)	Date of mailing of the international search report (22/10/2009)	
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer M. Cumbreño Galindo Telephone No. +34 91 349 68 80	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/ES 2009/070306
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 2, 3 and 11 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p style="text-align: center;">The subject matter of claims 2, 3 and 11 fails to meet the requirements in respect of clarity and concision (PCT Article 6) to such an extent that it was not possible to carry out a meaningful search on the basis of these claims.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2009/070306

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hentzer M. et al. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. The Journal of Clinical Investigation. 11.2003, Vol. 112, N° 9, pages 1300-1307. DOI: 10.1172/JCI200320074 (the whole document).	1, 4-10, 12-15
A	WO 03/075654 A2 (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 18.09.2003, (the whole document).	1, 4-10, 12-15
A	WO 2008/069374 A1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 12.06.2008, page 1, pages 6-8; pages 14-22	1, 4-10, 12-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/ ES 2009/070306	
Information on patent family members			
Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03075654 A2	18.09.2003	CA 2478401 A AU 2003216995 A AU 2003216995 B GB 2401788 AB EP 1485112 A EP 20030712317 CN 1649606 A CN 100496514 C JP 2005525849 T US 2005260183 A	18.09.2003 22.09.2003 02.11.2006 24.11.2004 15.12.2004 06.03.2003 03.08.2005 10.06.2009 02.09.2005 24.11.2005
----- WO 2008069374 A1 -----	----- 12.06.2008 -----	----- KR 20080050844 A -----	----- 10.06.2008 -----

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070306

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070306

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
Ver hoja adicional De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) A61K, A61P		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	
	Relevante para las reivindicaciones N°	
A	Piñeiro-Vidal M. et al. <i>Tenacibaculum discolor</i> sp. nov. and <i>Tenacibaculum gallaicum</i> sp. nov., isolated from sole (<i>Solea senegalensis</i>) and turbot (<i>Psetta maxima</i>) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 01.2008, Vol. 58, páginas 21-25. DOI 10.1099/ijs.0.65397-0 (todo el documento).	1, 4-10, 12-15
A	Lin Y. et al. Acyl-homoserine lactone acylase from <i>Ralstonia</i> strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Molecular Microbiology. 2003, Vol. 47, N° 3, páginas 849-860 (todo el documento).	1, 4-10, 12-15
A	Dong Y. et al. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. The Journal of Microbiology. 02.2005, Vol. 43, N° S, páginas 101-109 (todo el documento).	1, 4-10, 12-15
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"J" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.	
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.	
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.	
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.	
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 16.Octubre.2009 (16.10.2009)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 22 -OCTUBRE -2009 (22/10/2009)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M. Cumbreño Galindo N° de teléfono +34 91 349 68 80	

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070306

Recuadro II	Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)
<p>Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones N°s: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Las reivindicaciones N°s: 2, 3 y 11 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: El objeto de las reivindicaciones 2, 3 y 11 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones N°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).</p>	
Recuadro III	Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)
<p>La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:</p> <p>Indicación en cuanto a la protesta</p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.</p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.</p> <p><input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.</p>	

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la primera hoja (2)) (Julio 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070306

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Hentzer M. et al. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. The Journal of Clinical Investigation. 11.2003, Vol. 112, N° 9, páginas 1300-1307. DOI: 10.1172/JCI200320074 (todo el documento).	1, 4-10, 12-15
A	WO 03/075654 A2 (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 18.09.2003, (todo el documento).	1, 4-10, 12-15
A	WO 2008/069374 A1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 12.06.2008, página 1, páginas 6-8; páginas 14-22	1, 4-10, 12-15

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070306

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 03075654 A2	18.09.2003	CA 2478401 A	18.09.2003
		AU 2003216995 A	22.09.2003
		AU 2003216995 B	02.11.2006
		GB 2401788 AB	24.11.2004
		EP 1485112 A	15.12.2004
		EP 20030712317	06.03.2003
		CN 1649606 A	03.08.2005
		CN 100496514 C	10.06.2009
		JP 2005525849 T	02.09.2005
		US 2005260183 A	24.11.2005
-----	-----	-----	-----
WO 2008069374 A1	12.06.2008	KR 20080050844 A	10.06.2008
-----	-----	-----	-----

Formulario PCT/ISA/210 (anexo_familia de patentes) (Julio 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070306

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Formulario PCT/ISA/210 (hoja adicional) (Julio 2008)

2.4 Solicitud de patente nacional P201030892



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201030892	
Fecha de recepción:	09 junio 2010, 17:08 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1596.32	
Solicitante:	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	USO DE UNA NUEVA A-PROTEOBATERIA PARA QUORUM QUENCHING	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (32 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (3 p.) SEQLPDF.pdf (1 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	09 junio 2010, 17:08 (CEST)	
Codificación del envío:	9A:FB:9D:50:AE:29:71:53:8C:75:B8:1E:CB:17:01:97:76:F3:4C:5A	

/Madrid, Oficina Receptora/



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA España ES Q1518001A CENTRO DE INNOVACION E TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA, EDIFICIO EMPRENDIA, CAMPUS SUR SANTIAGO DE COMPOSTELA 15 A Coruña 15782 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	OTERO CASAL ANA MARIA España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	ROMERO BERNARDEZ MANUEL España ES
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:		USO DE UNA NUEVA A-PROTEOBATERIA PARA QUORUM QUENCHING

Anexos/Annexes

<p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI:</p> <p>DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA OTROS:</p>	<p>[] N.º de páginas:</p> <p>[] N.º de páginas:</p> <p>[] N.º de páginas:</p> <p>[] N.º de páginas:</p> <p>[] N.º de páginas:</p> <p>[] N.º de páginas:</p>
<p>(18) NOTAS:</p>	
<p>(19) FIRMA DIGITAL:</p> <p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: right;">LUGAR DE FIRMA:</p> <p style="text-align: right;">FECHA DE FIRMA:</p>	
<p>ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J Madrid 09 Junio 2010</p>	



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES1596.32	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.		0,00
Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
Prioridad extranjera (0)		0,00
Petición IET		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input checked="" type="checkbox"/>	
	Importe total	0,00
	Importe abonado	0,00
	Importe pendiente de pago	0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*

La presente invención se encuentra dentro de la biología, la biología molecular, y la acuicultura, y específicamente se refiere a una nueva α -Proteobacteria capaz de degradar *N*-acil-homoserín lactonas (AHLs) para el control de enfermedades infecciosas bacterianas, y para evitar la formación de biofilms.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Numerosas especies bacterianas usan un mecanismo de regulación genética coordinada para responder a cambios en el entorno. Este mecanismo conocido como “*quorum sensing*” (QS) consiste en la producción y liberación de moléculas señal al medio donde se acumulan controlando la expresión de múltiples genes (Fuqua *et al.*, 1994. *J Bacteriol* 176: 269-275). Mediante la comunicación por QS las poblaciones bacterianas pueden coordinarse para ejecutar importantes funciones biológicas, muchas de ellas implicadas en la virulencia de importantes patógenos, como: movilidad, “*swarming*”, agregación, luminiscencia, biosíntesis de antibióticos, factores de virulencia, simbiosis, formación y diferenciación de biofilms, transferencia de plásmidos por conjugación,... (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134).

Las señales de QS más estudiadas y conocidas son las *N*-acil-homoserín lactonas (AHLs) empleadas por numerosas bacterias Gram-negativas (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134). Las AHLs, también conocidas como *autoinducers* (AIs), son una familia de moléculas señales usadas en el sistema de QS de muchas bacterias, principalmente Gram negativas, que se basan en un anillo lactona con una cadena lateral acilo de tamaño variable entre 4 y 14 carbonos, con o sin saturación y con o sin sustituciones Oxo- o Hidroxi- en el tercer carbono (Whitehead *et al.*, 2001. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404). Como las poblaciones de especies bacterianas coordinadas por QS obtienen importantes ventajas competitivas en sus múltiples interacciones con otros procariontes y eucariotas, sus competidores han desarrollado mecanismos

para interferir con su comunicación por sistemas QS, a estos mecanismos se les conoce como “*quorum quenching*” (QQ). Existen dos tipos principales de mecanismos de QQ: un primer tipo se basa en la producción de moléculas inhibitoras/antagonistas que mimetizan las AHLs bloqueando o desestabilizando el receptor, como las furanonas producidas por el alga marina *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996. *J Bacteriol* 178: 6618-6622). Otra estrategia para bloquear los sistemas de QS mediados por AHLs es la degradación enzimática de las moléculas señal. Hasta el momento, se han descrito dos tipos principales de enzimas que llevan a cabo esta degradación: las lactonasas que hidrolizan el anillo lactona y las acilasas que rompen el enlace entre el anillo lactona y la cadena lateral (Dong *et al.*, 2007, *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211). La actividad acilasa ha sido descrita en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Shewanella* sp. y *Variovorax paradoxus* (Leadbetter and Greenberg, 2000, *J Bacteriol* 182: 6921-6926; Lin *et al.*, 2003, *Mol Microbiol* 47: 849-860; Park *et al.*, 2005, *Appl Environ Microbiol* 71: 2632-2641; Uroz *et al.*, 2005, *Microbiol* 151: 3313-3322; Huang *et al.*, 2006, *Appl Environ Microbiol* 72: 1190-1197; Sio *et al.*, 2006, *Infect Immun* 74: 1673-1682; Romero *et al.*, 2008, *FEMS Microbiol Lett* 280: 73-80), mientras que la actividad lactonasa ha sido identificada en distintas cepas de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter* sp. y *Rhodococcus*, pero también está presente en algunos Gram negativos como *Klebsiella* y *Agrobacterium* (Dong and Zhang, 2005. *J Microbiol* 43: 101-109; Dong *et al.*, 2007, *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211).

Aunque la síntesis de quimioterápicos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en el siglo pasado una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de algunas bacterias patógenas es un grave problema mundial, que obliga a la industria farmacéutica a desarrollar nuevas generaciones de antibióticos más potentes, y que puede originar cepas multirresistentes en las que el tratamiento es más largo y con frecuencia ineficaz, llegando incluso a la muerte del paciente. La presión selectiva que se

ejerce en el ambiente microbiano, el estado inmunitario del hospedero, los microambientes bacterianos y factores propios de las bacterias involucradas, tienen un papel importante en el desarrollo de la resistencia. Es por lo tanto un objetivo prioritario para la industria farmacéutica el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de las infecciones bacterianas.

Puesto que muchas bacterias usan el sistema de señales de QS para sincronizar la expresión genética y coordinar su actividad biológica dentro de una población, controlando la virulencia y la formación de biofilms entre otras funciones biológicas, una vía para evitar el aumento de mecanismos de resistencia de las bacterias patógenas (que en muchas ocasiones dificultan el adecuado tratamiento clínico, llegando incluso a la muerte del paciente) sería controlar estos sistemas de señales QS mediante QQ. La posibilidad de utilización de la inhibición del quorum sensing para el tratamiento de enfermedades bacterianas ha sido revisada con anterioridad (Stephenson *et al.*, 2004. *Curr Med Chem* 11:765-773; Hentzer *et al.*, 2003. *BioDrugs* 17:241-250; Hentzer *et al.*, 2003. *J Clin Invest* 112:1300-1307; Lyon *et al.*, 2003. *Chem Biol* 10:1007-1021). Debido a que gran cantidad de patógenos humanos (p. e.: *Pseudomonas putida*, *Serratia* spp.,...), de plantas (p. e.: *Agrobacterium* spp., *Erwinia carotovora*,...) y patógenos marinos (p. e.: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*,...) (Williams *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1119-1134; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52) emplean AHLs para el control de la producción de factores de virulencia, la interferencia con estos sistemas de comunicación constituye una interesante y prometedora vía para el control de enfermedades infecciosas bacterianas (Dong & Zhang. 2005. *J Microbiol* 43: 101-109; Dong *et al.*, 2007. *Phil Trans R Soc B* 362: 1201-1211).

Una de las actividades bacterianas de mayor importancia clínica y ecológica en la que intervienen los procesos de “quorum sensing” es la formación de biofilms, que requiere la producción, por parte de los microorganismos, de estas moléculas señal difusibles (Nadell *et al.*, 2008. *PLoS Biol* 6(1): e14. doi:10.1371/journal.pbio.0060014).

- Los biofilms son películas biológicas que se desarrollan y persisten en las superficies, y que suelen ser estables y difíciles de eliminar debido a la naturaleza protectora de la matriz de polisacárido en la que están embebidos los microorganismos. Pueden definirse como una población bacteriana encerrada dentro de una matriz de polisacárido que se adhiere a las superficies. Se encuentran generalmente en las superficies de los equipamientos industriales que procesan o transportan líquidos, o en las superficies adyacentes a tales equipamientos. A menudo se encuentran en la superficie de los implantes médicos o en los dispositivos insertados en el organismo. También se pueden formar en áreas del cuerpo que están expuestas al aire; en particular en heridas y en la pleura. Uno de los biofilms biológicos que presenta mayor complejidad y de mayor relevancia clínica es la placa dental.
- Los medicamentos convencionales, como por ejemplo, los antibióticos, son poco eficaces en infecciones que cursan a través de la formación de biofilms, debido a las barreras de difusión o al estado metabólico de los microorganismos en el biofilm.
- Por tanto, mecanismos de interferencia del QS, es decir el QQ, solos o en combinación con antibióticos, constituyen una estrategia interesante en la inhibición de la formación de biofilms así como en el tratamiento de enfermedades infecciosas por patógenos multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias más infectivas y problemáticas, al formar biofilms difícilmente tratables con antibióticos convencionales. En pacientes con fibrosis quística coloniza los pulmones causando infecciones que son difíciles de tratar y a menudo, finalmente fatales. También es especialmente interesante para pacientes con heridas crónicas o con quemaduras.

Por tanto, este mecanismo puede ser interesante para el tratamiento de muchas enfermedades bacterianas, y existe bastante literatura sobre este tema (March & Bentley, 2004. *Current Opinion in Biotechnology* 15:495–502; Stephenson *et al.*, 2004. *Curr Med Chem* 11:765-773; Hentzer *et al.*, 2003. *BioDrugs* 17:241-250; Hentzer *et al.*, 2003. *J Clin Invest* 112:1300-1307; Lyon *et al.*, 2003. *Chem Biol* 10:1007-1021). Por ejemplo, se ha visto que puede ser útil en el tratamiento de enfermedades, tanto en los animales como en las plantas, provocadas por los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Borrelia*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Ceratocystis*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, o por otras enterobacterias (además de *Pseudomonas*).

Además, el interés de las estrategias de QQ para el tratamiento de enfermedades infecciosas es que, al no afectar directamente a la supervivencia del patógeno sino a la expresión de los factores de virulencia, no ejercen presión selectiva evitando la aparición de resistencias. Por esta razón, este tipo de estrategia ha sido denominada “antiinfectivos” o “antipatogénicos” en contraste con los “antibióticos” o “antibacterianos” cuyo objetivo es la muerte celular.

A pesar de que los procesos de QS y de QQ se descubrieron en organismos marinos (Nealson *et al.*, 1970. *J Bacteriol* 104: 313-322; Givskov *et al.*, 1996. *J Bacteriol* 178: 6618-6622) se ha prestado poca atención a su significado ecológico en el ambiente marino. La producción de AHLs es común entre las bacterias patógenas de peces marinos, incluyendo *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, o *Vibrio anguillarum* (Freeman & Bassler, 1999. *Mol Microbiol* 31: 665-677; Croxatto *et al.*, 2002. *J Bacteriol* 184: 1617-1629; Buch *et al.*, 2003. *Syst Appl Microbiol* 26: 338-349; Kim *et al.*, 2003. *Mol Microbiol* 48: 1647-1664; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52). Por ello, la posibilidad de emplear los inhibidores de QS para controlar la infección se ha propuesto como una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004.

Aquaculture 240: 69-88), y la viabilidad de la utilización de esta estrategia ha sido ya demostrada (Rasch *et al.*, 2004. *System Appl Microbiol* 27: 350-359; Tinh *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 45- 53).

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una cepa de una nueva especie de α -Proteobacteria afín al género *Phaeobacter*, que es capaz de degradar las N-Acil-homoserin lactonas (AHLs), las cuales no pueden ser recuperadas significativamente por acidificación, indicando una actividad enzimática diferente a la lactonasa. Por tanto, el empleo de esta bacteria es útil para controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de las bacterias patógenas y evitando así la aparición de resistencias. También permite la inhibición de otros procesos de colonización bacteriana en los que están implicadas las señales de “*quorum sensing*” o QS tipo AHL, como la formación de biofilms.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a una cepa de células bacterianas de α -Proteobacteria depositada el 21 de mayo de 2010 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito CECT 7733, de ahora en adelante “cepa de la invención” o “cepa 177”. Dicha cepa pertenece al filo de las α -Proteobacteria afín al género *Phaeobacter*. Esta cepa de la invención crece, preferiblemente, en caldo o agar marino, más preferiblemente a una temperatura de 22°C y aun más preferiblemente durante 24 horas. La secuencia de polinucleótidos de la región ribosómica 16S de dicha cepa de la invención se recoge parcialmente en la SEQ ID NO: 1.

Cualquier bacteria regula su expresión génica en respuesta a diferentes señales medioambientales, una propiedad esencial para competir con otros organismos. En el caso particular de bacterias patógenas, la regulación génica es crucial para permitir la supervivencia de la bacteria en el particular ambiente que le ofrece su hospedador. Los genes de virulencia bacterianos están sujetos

a complejos mecanismos de regulación para asegurar la expresión del gen apropiado en el momento apropiado. Las AHLs son las señales de QS más estudiadas y conocidas, y como se ha dicho son empleadas por multitud de bacterias patógenas humanas, de plantas y marinas para el control de la producción de factores de virulencia.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una célula bacteriana cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 96% con la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de la SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante “célula bacteriana de la invención”, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para degradar N-Acil homoserin lactonas y provocar *quorum quenching*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la región 16S del ARNr de la célula bacteriana de la invención presenta una identidad de al menos un 97%, más preferiblemente de un 98%, y aún más preferiblemente, de un 99% con la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de la SEQ ID NO: 1. En una realización particular de este aspecto de la invención, la región 16S del ARNr de la célula bacteriana de la invención presenta la secuencia polinucleotídica recogida en la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente, la célula bacteriana de la invención es la cepa de la invención.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para provocar *quorum quenching*.

En la presente invención se entiende por “quorum quenching” o “QQ” el mecanismo mediante el cual se interfiere la comunicación microbiana, preferiblemente de bacterias patógenas, mediada por señales basadas en un sistema *quorum sensing* o QS. Este mecanismo QQ afecta negativamente a, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la expresión de factores de virulencia de la población microbiana sin provocar la muerte celular.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, los cuales son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas y, por tanto, de interferir con el sistema de señales de QS de bacterias, para la elaboración de un medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.

La producción de AHLs es común entre las bacterias patógenas de peces marinos, incluyendo, pero sin limitarse, a *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, o *Vibrio anguillarum*, (Freeman & Bassler, 1999. *Mol Microbiol* 31: 665-677 ; Croxatto *et al.*, 2002. *J Bacteriol* 184: 1617-1629; Buch *et al.*, 2003. *Syst Appl Microbiol* 26: 338-349; Kim *et al.*, 2003. *Mol Microbiol* 48: 1647-1664; Bruhn *et al.*, 2005. *Dis Aquat Org* 65: 43-52). Por ello, la posibilidad de emplear los inhibidores de QS para controlar la infección se ha propuesto como una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004. *Aquaculture* 240: 69-88), y su viabilidad ya ha sido demostrada (Rasch *et al.*, 2004. *System Appl Microbiol* 27: 350-359; Tinh *et al.*, 2008. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 45- 53).

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs. En esta memoria se entiende por “animal acuático” cualquier animal que viva en el agua, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, peces, moluscos o crustáceos.

Los “biofilms” o “biopelículas”, tal y como se definen en esta memoria, son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Es una comunidad de bacterias (de una única especie o varias), que se adhiere a una superficie sólida. La inhibición de las AHLs permite inhibir la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por QS.

Los biofilms producen una gran cantidad de polisacáridos extracelulares, responsables de la apariencia viscosa, y se caracterizan por una gran resistencia a agentes antibióticos. Esta resistencia puede deberse a que la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas las bacterias proporciona una barrera frente a la penetración de biocidas. Otra posibilidad es que la mayoría de las células del biofilm crecen muy lentamente, en un estado de privación de comida, por lo que no son susceptibles al efecto de los agentes antimicrobianos. Un tercer aspecto podría ser que las células en el biofilm adoptasen un fenotipo distinto, por ejemplo, mediante la expresión de bombas efluentes de fármacos.

La contaminación biológica de superficies es común, pudiendo desarrollarse el biofilm sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, y conduce a la degradación del material, productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de calor en procesos acuáticos. Los biofilms son también la primera causa de la contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biofilms en los sistemas antiincendios. El establecimiento de bacterias adheridas a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos, conlleva serios problemas higiénicos e incluso casos de toxiinfecciones alimentarias, así como numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar (Carpentier & Cerf, 1993. *J App Bacter.* 75:499-511).

En acuicultura tiene especial relevancia la formación de biofilm en estructuras

sumergidas tales como jaulas, redes o contenedores; o equipamientos tales como cañerías, bombas, filtros y tanques colectores, y para especies de cultivo, como mejillones, vieiras, ostras, etc. Se conoce como *biofouling* y afecta a todos los sectores de la acuicultura europea, siendo un problema creciente debido a la aplicación de la Directiva de Productos Biocidas EC 98/8/EC, resultando en sustanciales pérdidas económicas. Tiene además, repercusiones ecológicas importantes porque los organismos acuáticos que se afianzan a los cascos de los barcos como consecuencia del *biofouling* acompañan a estos navíos a donde quiera que vayan. Esto ha significado un problema ecológico mundial, ya que los barcos están trasladando especies invasoras hacia los lagos, los ríos y los océanos que no son su hábitat original.

Así, la fabricación de pinturas anti-incrustaciones con células bacterianas de la invención, preferiblemente, con la cepa de la invención, el extracto celular crudo o el sobrenadante de sus cultivos, reduciría el *biofouling* en los cascos pintados con ella, sin tener elementos químicos tóxicos para la vida marina.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para inhibir la formación de biofilms.

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan los biofilms con distintos procesos infecciosos en humanos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, los recogidos en la tabla 1 (Wilson, 2001. *Sci Prog* 84: 235-254; Costerton *et al.*, 1999. *Science*, 284: 1318-1322). Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede

ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la formación de biofilms es provocada por bacterias productoras de AHLs.

5

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esquelético	Cocos Gram positivos (ej. Staphylococos)
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	Streptococos del grupo viridans
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Enfermedades nosocomiales	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos Gram positivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y otros cocos Gram positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
Periodontitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israelii</i> y muchos otros
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres Hackman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

Tabla 1. Procesos infecciosos humanos en los que interviene la formación de biofilm.

Además el uso de la célula bacteriana de la invención, preferiblemente de la cepa de la invención, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos puede ser una estrategia interesante en el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por patógenos multirresistentes como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Pseudomonas aeruginosa*, en la que está descrito el control de QS sobre mecanismos de virulencia (Venturi, 2006. *FEMS Microbiol Rev* 30: 274-291) y otros patógenos de humanos, animales y plantas.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de las células bacterianas de la invención, preferiblemente, de la cepa de la invención, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, los cuales son capaces de degradar N-Acil homoserin lactonas, o cualquiera de sus combinaciones, solos o en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos, más preferiblemente para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas o para inhibir la formación de biofilms.

La información que se proporciona en esta memoria es suficiente para permitir a un experto en la materia identificar a otras cepas que estén dentro de esta nueva especie de α -Proteobacteria. Por las especiales características de estos organismos, que aún no se han estudiado en profundidad, y por las dificultades que supone su descripción, ésta será más fácil y fiable si su delimitación taxonómica se basa en métodos de biología molecular.

Así, en la identificación de un microorganismo como perteneciente a la nueva especie son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las cepas de la nueva especie son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la homología global de los genomas a nivel de los nucleótidos, y más concretamente a nivel de la región 16 S del ARN ribosómico nuclear, y más concretamente al polinucleótido de la región 16S del ARN ribosómico nuclear que se recoge en la SEQ ID NO: 1, y que pertenece al microorganismo depositado en la CECT con número 7733 el 21 de mayo de 2010 y que en este documento se denomina como cepa de la

invención o cepa 177, sea de un 80% o mayor, y más preferiblemente de un 85%, de un 90%, de un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia genómica de la(s) cepa(s) putativa(s) de la nueva especie y la secuencia de otro microorganismo se puede determinar por métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia del polinucleótido procedente de la cepa putativa, y la secuencia del polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 de esta memoria. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J Mol Biol* 215: 403-410). Por ejemplo, también, aquéllas se pueden determinar por hibridación de los polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), seguido por determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

El porcentaje de identidad se ha determinado midiendo la identidad entre el polinucleótido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 (perteneciente a la cepa de la invención) y todos los polinucleótidos homólogos que se encontraban recogidos en el momento de escritura de esta memoria, en el GenBank. Tras este análisis cabe pensar que un organismo que pertenezca a la nueva especie tendrá un polinucleótido homólogo al de la SEQ ID NO: 1, perteneciente a la región 16S de su ARN ribosómico nuclear, que presente, al menos, una identidad del 96% con éste.

En relación con otras cepas de bacterias con actividad QQ, la cepa de la invención presenta una elevada actividad degradadora y una alta inespecificidad, siendo capaz de degradar todas las AHLs probadas (por ejemplo, aunque sin limitarnos, C4-HSL, C6HSL, C10-HSL, C12-HSL y OC12-HSL) en un periodo de 24 horas según datos obtenidos mediante cuantificación por LC-MS y presenta un buen crecimiento, así como capacidad de crecer en medios marinos.

- La cepa de la invención se caracteriza por una alta capacidad degradadora, un amplio rango de especificidad mostrada por sus enzimas degradadoras de AHLs y por el tipo de actividad enzimática que se deriva de los análisis por HPLC de la degradación de C4-HSL y C12-HSL, cuya concentración no se recupera tras acidificación, (Figura 3), lo que excluye una posible actividad lactonasa e indica la posible presencia de actividad acilasa. En caso de confirmarse la presencia de actividad acilasa en esta cepa se trataría de un enzima de características distintivas con otras acilasas de origen bacteriano, cuya actividad es prevalentemente sobre AHLs de cadena larga. Todas estas características convierten a la cepa de la invención en un candidato prometedor para el control de patógenos con QS basado en AHL en salud humana, cultivos marinos, animales y plantas, así como para la inhibición de la formación de biopelículas formadas por procesos controlados por QS.
- 5
- 10
- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende un elemento seleccionado de la lista que comprende:
- 20 a. una célula bacteriana cuya región 16S del ARNr presenta una identidad de al menos un 96% con la secuencia polinucleotídica homóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 1, o célula bacteriana de la invención, preferiblemente, dicha célula bacteriana de la invención es la cepa de la invención,
 - 25 b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la célula bacteriana de (a), preferiblemente de la cepa de la invención,
 - c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de (b),
- o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención como agente antipatogénico.

Un “agente antipatogénico” es una molécula o enzima que inhibe la expresión de los genes controlados por los procesos de comunicación entre bacterias dependientes de densidad celular, preferiblemente de los genes relacionados con la virulencia de una bacteria patógena, evitando así el desarrollo de la actividad bacteriana en una superficie inerte o en un tejido vivo y los síntomas asociados a la infección, y facilitando la eliminación del patógeno del medio por parte, por ejemplo, del sistema inmune del hospedero o de agentes antibacterianos.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas, o alternativamente, se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas. Preferiblemente, la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.

20 Los biofilms bacterianos son una causa común de infecciones bacterianas, tanto en humanos (Costerton *et al.*, 1999. *Science* 284: 1318-1322), como en animales y plantas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para inhibir la formación de biofilms.

25 En una realización preferida, la composición de la invención se usa en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos. En una realización más preferida, la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs

30 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de

enfermedades en el hombre, animales y plantas. En el contexto de la presente invención este término se refiere a una preparación que comprenda al menos una célula bacteriana de la invención, preferiblemente, la cepa de la invención, o la composición de la invención. Las enfermedades son provocadas por la
5 infección de bacterias patógenas productoras de AHLs.

Los medicamentos de la invención comprenden células bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa de la invención, o la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de prevenir
10 o tratar enfermedades infecciosas bacterianas o de inhibir la formación de biofilms.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de células bacterianas de la invención, preferiblemente de cepa de la invención, o de composición de la
15 invención que produzca el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención y/o en los medicamentos de la invención son los conocidos por los técnicos en la materia.

20

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a evitar la aparición de daños cuya causa sean enfermedades infecciosas bacterianas o la formación de biofilms provocados por bacterias productoras de AHLs. El término "tratamiento", tal como se entiende en la
25 presente invención, supone combatir los efectos causados por enfermedades infecciosas bacterianas o por la formación de biofilms provocados por bacterias productoras de AHLs, para estabilizar el estado del hombre, animal o planta, o prevenir daños posteriores.

30 El término "infección" es el término clínico para describir la colonización de un organismo huésped por microorganismos de otras especies. En la utilización clínica del término infección, el organismo colonizador es perjudicial para el

funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno.

5 Por “categoría taxonómica” se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

10 El término “polinucleótido”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren exclusivamente a la estructura primaria de la molécula.

15 El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los nucleótidos de dos o más polinucleótidos.

20 El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos homólogos que se comparan.

25 El término “fenotipo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo; producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

30 El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las células bacterianas de la invención, y preferiblemente de la cepa de la invención, puede ser cualquier medio conocido en el estado del arte. Preferiblemente el medio contiene los componentes que comprenden el medioambiente de donde se coge la muestra. Por ejemplo, el medio de cultivo de bacterias marinas comprende preferiblemente sales marinas. El soporte sólido para crecer colonias aisladas individuales puede ser agar, agar noble, Gel-Rite o cualquier otro medio sólido

conocido en el estado del arte.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Foto del ensayo en medio sólido para detectar cepas marinas QQ con los biosensores para AHL *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). Las cepas de QQ positivas (177, 168 y 20J) degradaron ambas AHLs (10 μ M) tras 24 horas, eliminando la producción de violaceína comparada con el control (pocillo central). Se empleó una cepa de *Vibrio anguillarum* como control negativo.

Fig. 2. Foto de un ensayo en medio sólido para la detección de actividad QQ sobre OC12-HSL con el bisensor *E. coli* JM109 pSB1075. Las cepas capaces de degradar la AHL tras 24 horas impiden la producción de luz por el biosensor. El pocillo central se corresponde con el control de AHL (10 μ M), los pocillos a la izquierda se corresponden con aislados negativos para degradación de OC12-HSL.

Fig. 3. Análisis por HPLC-MS de degradación de C4-HSL y C12-HSL en el medio de cultivo de los 15 aislados QQ positivos tras 24 horas. La concentración inicial de AHL era de 50 μ M. Los sobrenadantes fueron acidificados hasta pH 2 para permitir la recuperación del anillo de lactona. CM: caldo marino.

Fig. 4. Árbol Neighbour-joining mostrando las relaciones entre los aislados bacterianos de los ejemplos de la invención (rombos oscuros) y las especies con lactonasas (círculos blancos) y acilasas (círculos oscuros) conocidas y cepas con actividad QQ conocida de las que no se ha caracterizado la actividad enzimática (rombos blancos) basada en el gen de 16S ADNr. El número tras cada nombre taxonómico es el número de acceso para la secuencia génica correspondiente. Se muestran los valores de Bootstrap por encima del 50% del análisis neighbour-joining. Barra: 0,02 sustituciones por posición de nucleótido.

5

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de la cepa de la invención para degradar N-Acil homoserin lactonas. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

10

Metodología de aislamiento de las cepas bacterianas marinas

Para la detección de bacterias marinas con actividad *quorum quenching* (QQ) de señales tipo AHL se procedió al aislamiento de colonias procedentes de muestras de diferentes medios marinos.

15

Se tomaron tres tipos de muestras con material estéril:

20

-Muestra de sedimento de un tanque-reservorio de agua de mar de un circuito cerrado para el cultivo de peces de la Universidad de Santiago de Compostela.

-Muestra de biopelícula de un tanque de cemento para el cultivo marino de peces en circuito abierto del instituto IGAFa (Isla de Arosa).

-Muestra de alga *Fucus vesiculosus* obtenida de un sustrato rocoso

intermareal en la Illa de Arousa. 1 g del alga fue troceado y diluido en 10 ml de agua de mar esterilizada.

Los medios sólidos empleados para el aislamiento fueron: Agar Triptona soja (TSA) 1% NaCl, Agar marino (MA, Difco), Agar marino en dilución 1/100, medio 5 FAS suplementado con 1 g/l de casaminoácidos (FAS CAS) (Schut *et al.*, 1993, *Appl Environ Microbiol* 7: 2150-2160) y medio FAS suplementado con 0,5 g/l de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL) (Bruns *et al.*, 2002, *Appl Environ Microbiol* 68: 3978-3987). Se prepararon 3 diluciones (1/10, 1/100 y 10 1/1000) en agua de mar esterilizada para cada una de las muestras y se sembraron en placas con los medios de cultivo nombrados. Las placas se incubaron a 15 y 22°C durante 15 días. Se aislaron un total de 166 colonias en función de su diferente morfología y coloración para el análisis de actividad QQ. Puesto que las 166 cepas obtenidas presentaban crecimiento en MA a 22°C, 15 se seleccionaron estas condiciones de cultivo como método de cultivo estándar y para su mantenimiento en el laboratorio.

Detección de actividad QQ

20 Las cepas aisladas fueron ensayadas para su actividad QQ utilizando un ensayo en medio sólido basado en dos biosensores derivados de la especie *Chromobacterium violaceum* en los que la producción del exopigmento violaceína es dependiente de la presencia de AHLs en el medio de cultivo. La cepa *C. violaceum* CV026 se utilizó inicialmente para la detección de la 25 degradación de N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL, McClean *et al.*, 1997, *Microbiol* 143: 3703-3711). Con posterioridad se confirmó la capacidad de degradación de C10-HSL utilizando la cepa *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi *et al.*, 2008b, *FEMS Microbiol Lett* 279: 124-130). Las cepas marinas aisladas se inocularon en tubos con 1 ml de caldo marino (CM) a 22°C y 200 rpm. Tras 30 24 horas se centrifugaron 500 µl de los cultivos a 2000 x g, durante 5 min y se resuspendieron en 500 µl de CM al que se añadió C6-HSL ó C10-HSL 2 µM, incubándose durante otras 24 horas. Para la evaluación de la degradación de

las AHLs, se colocaron 50µl de los sobrenadantes de estos cultivos en pocillos realizados con un sacabocados en placas de LB cubiertas con LB blando inoculado con 500µl de un cultivo de 12 horas de *C. violaceum* CV026 ó *C. violaceum* VIR07, añadiéndose 50 µl de agua destilada estéril para completar el volumen del pocillo. Tras 24 horas de incubación a 25°C se observó la producción de violaceína (Figura 1).

Además se analizó la capacidad de interferir con la actividad de la OC12-HSL de las cepas seleccionadas utilizando la cepa sensora de *E. coli* JM109 pSB1075 (Winson MK, Swift S, Fisha L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, *et al.* 1998. *FEMS Microbiol Lett* 163:185-192). Se añadió OC12-HSL a 1 ml de cultivo de 12 horas de las cepas en Caldo Marino a una concentración final de 2 µg/ml y se incubaron durante 24 horas a 22°C. La actividad AHL en el medio de cultivo se evaluó en placas de LB cubiertas con 5 ml de LB semi-sólido inoculado con 50 µl de un cultivo de 12 horas de la cepa sensora *E. coli* JM109 pSB1075 mantenida a 37°C y 200 rpm. Se pipetearon 50 µl de cultivo en pocillos realizados en el agar de estas placas, utilizándose CM estéril y CM más OC12-HSL como controles. Las placas se inocularon durante 3 horas a 37°C, observándose la producción de luz derivada de la actividad AHL (Figura 2).

Confirmación de la degradación de AHL por HPLC-MS

Con las 15 cepas que mostraron inhibición de QS contra las AHLs C6 y C10, se llevaron a cabo análisis mediante HPLC-MS para determinar inequívocamente su capacidad para degradar AHLs (Figura 3). A cultivos de 24h de 1 ml de las cepas correspondientes, se añadieron las AHLs C4-HSL y C12-HSL con una concentración final de 50 µM, y se incubaron estos cultivos durante 24 h más a 22°C y a 200 rpm. Tras la centrifugación de los cultivos (2000g, 5 min), se dividió el sobrenadante en dos partes iguales. Un volumen de 500 µl se acidificó con HCl hasta un pH de 2 y se incubó durante 24 h a 25°C para facilitar la recuperación de la actividad AHL derivada de la hidrólisis del anillo

de lactona por la acción de las lactonasas. Los sobrenadantes de los cultivos se extrajeron 3 veces con un volumen igual de etilacetato, se evaporaron bajo flujo de nitrógeno y se resuspendieron en 200 µl de acetonitrilo para análisis por HPLC-MS y cuantificación. Las muestras de caldo marino suplementadas con la misma cantidad de C4 o C12-HSL fueron procesadas y extraídas de la misma forma y usadas como controles. Los análisis se llevaron a cabo con un equipo de HPLC 1100 series (Agilent USA) con precolumna CB (2,1x12,5 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm (tamaño de partícula 5 µm) a 45°C. La fase móvil estaba compuesta por 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). La velocidad de flujo fue de 0,22 ml/min. Las condiciones de elución fueron las siguientes: 0 min 35%B, gradiente lineal a 60%B en 10 min, gradiente lineal desde 60% a 95% B durante 5 min, 5 min 95% B y finalmente vuelta a las condiciones iniciales en 9 min.

La columna fue reequilibrada durante 5 min. El volumen de inyección fue de 2 µl. Los experimentos de MS mostrados fueron llevados a cabo en un espectrómetro de masas API 4000 triple-quadrupole (Applied Biosystem, CA, USA) equipado con una fuente de Turbolon empleando un electrospray iónico positivo, con modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). La señales MRM se emplearon para generar información cuantitativa relativa mediante comparación con una curva de calibrado construida para abundancia iónica molecular, empleando el estándar sintético de AHL apropiado (Milton *et al.*, 2001, *J Bacteriol* 183: 3537-3547).

Identificación bacteriana basada en la subunidad 16S y análisis filogenéticos

La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante amplificación y secuenciación parcial del gen correspondiente a la subunidad 16S del ARNr. El ADN genómico de los distintos aislados fue extraído (Puregene Tissue Core Kit B) y el gen de la subunidad 16S del ARNr fue amplificado empleando los

cebadores ANT1 (forward) (5`AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y S (reverse) (5`GGTTACCTTGTTACGACTT) (Martinez-Murcia and Rodriguez-Valera, 1994, *FEMS Microbiol Lett* 124: 265-269). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones estándar: 35 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 50°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 2 min) precedidos por 2 min de desnaturalización a 94°C y seguidos por 7 min de extensión a 72°C. Los productos de PCR fueron parcialmente secuenciados, revisados y corregidos mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.0.9.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Un total de quince secuencias de la subunidad 16S del ARNr fueron identificadas y comparadas con secuencias de la subunidad 16S del ARNr disponibles en el GenBank usando NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402) y el Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Las secuencias de ARNr 16S fueron alineadas usando MUSCLE (Edgar, 2004, *Nucleic Acids Res* 321792-321797) con las secuencias más cercanas filogenéticamente encontradas en las bases de datos tras identificación por BLAST, y con aquellos aislados con actividad acilasa o lactonasa previamente identificados o con actividad QQ ya conocida. Para eliminar espacios y posiciones alineadas de modo inequívoco, se empleó Gblocks (Castresana, 2000, *Mol Biol Evol* 17: 540-552), dando lugar a 649 posiciones disponibles para construir el árbol filogenético. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo después usando el paquete informático de filogénesis MEGA4 (Zmasek and Eddy, 2001, *Bioinformatics* 17: 821-828; Kumar *et al.*, 2004, *Brief Bioinform* 5: 150-163) empleando los parámetros por defecto (Figura 4).

25

RESULTADOS

Crecimiento y aislamiento bacteriano

30 Se obtuvieron resultados muy distintos en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) dependiendo del medio de cultivo y de la temperatura de crecimiento empleada para cada muestra. La muestra con una población de

bacterias mayor fue la obtenida del sedimento del tanque de cultivo, llegando a 3×10^6 CFUs ml^{-1} . El mayor valor de CFU obtenido para la muestra de biopelícula era un orden de magnitud más bajo que en el sedimento, mientras que el número de bacterias viables aisladas de *F. vesiculosus* era el más bajo, 5 llegando tan sólo a 30.000 CFUs ml^{-1} en el mejor de los casos. La temperatura de crecimiento y, lo que es más importante, el medio de cultivo empleado para su aislamiento, también tuvieron una gran influencia sobre el número de bacterias viables aisladas. Temperaturas más altas (22°C) permitieron el crecimiento de un mayor número de colonias en casi todos los casos. El medio 10 de Agar Marino Diluido (MA 1/100) y el medio de FAS-CAS resultaron ser los más efectivos para la recuperación de CFUs en las muestras de sedimento y de biopelícula, mientras que en la muestra de *F. vesiculosus* el medio de Agar Marino y el de FAS-POL fueron igual de efectivos a altas temperaturas, resultando en números de CFUs 3 veces mayores que los otros medios de 15 cultivo.

Un total de 166 aislados fueron obtenidos de las muestras de ambientes marinos seleccionados para la búsqueda de actividad QQ, 85 cepas de la muestra de sedimento del tanque de cultivo, 48 de la biopelícula y 33 de *F. vesiculosus* (Tabla 2). 20

A pesar del mayor número de CFU/ml obtenidas con el medio de cultivo oligotrófico en las primeras dos muestras, alrededor de la mitad de aislados empleados para la búsqueda de actividad QQ se obtuvieron de medios más 25 ricos como TSA 1% NaCl y MA, debido a la mayor variabilidad que se observó de las colonias. En el caso de la muestra de sedimento, más del 70% de los aislados provenían de estos medios ricos, mientras que en la muestra de biopelícula la mayoría de cepas habían sido aisladas en medio FAS (Tabla 2). El número de cepas aisladas a las dos temperaturas distintas que se 30 emplearon en el estudio fue muy similar: 91 cepas se aislaron de placas mantenidas a 22°C y 75 de placas mantenidas a 15°C.

Detección de la inhibición de la actividad quorum sensing mediante bioensayos

El ensayo en medio sólido en placa empleando la cepa biosensora *C. violaceum* CV026 permitió la detección de la inhibición de la actividad C6-HSL de forma robusta (Figura 1). Este ensayo permitió diferenciar las cepas con actividad de inhibición del crecimiento de aquéllas con una actividad QQ real. El ensayo en medio sólido con *C. violaceum* CV026 permitió la identificación de 24 cepas con actividad QQ, lo cual representa un 14,5% de las cepas aisladas (Tabla 2).

	Nº de cepas aisladas	Cepas QQ
Sedimento del tanque de peces		
TSA-1% NaCl	30	2
MA	31	4
MA 1/100	9	1
FAS-CAS	7	0
FAS-POL	8	1
Total	85	8
Biofilm del tanque de agua		
TSA-1% NaCl	9	0
MA	5	0
MA 1/100	7	0
FAS-CAS	17	2
FAS-POL	10	1
Total	48	3
<i>Fucus vesiculosus</i>		
TSA-1% NaCl	9	3
MA	9	2

MA 1/100	5	3
FAS-CAS	7	3
FAS-POL	3	2
Total	33	13
Todas las muestras		
TSA-1%NaCl	48	5
MA	45	6
MA 1/100	21	4
FAS-CAS	31	5
FAS-POL	21	4
Total	166	24

- Tabla 2.** Resumen de las cepas bacterianas aisladas de distintos ambientes y medios de cultivo, mostrando el número y porcentaje de cepas con actividad de inhibición QS contra C6-HSL obtenido empleando el ensayo en placa de *C. violaceum* CV026. MA: agar marino; MA 1/100: agar marino diluido 1/100 con agua de mar; FAS-CAS: agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con casaminoácidos; FAS-POL: agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con polímeros.
- 5
- 10 No se observó un efecto significativo del medio de cultivo empleado para el aislamiento sobre el porcentaje de cepas con actividad QQ (Tabla 2, test Chi cuadrado, $p > 0,05$). El 50% de las cepas activas fueron activadas a 22°C y por tanto el efecto de la temperatura de aislamiento no fue significativo (test de Fisher exacto, $p > 0,05$). Por el contrario, sí se observó un efecto importante del
- 15 origen de la muestra sobre el porcentaje de cepas con actividad QQ encontradas (Tabla 2, test Chi cuadrado, $p < 0,05$). Mientras que las cepas aisladas de los tanques presentaron un porcentaje de actividad QQ de entre el 6 y el 9% (Tabla 2), casi el 40% de las cepas aisladas de la muestra de *F. vesiculosus* resultaron activas contra C6-HSL (Tabla 2). Las 24 cepas que eran
- 20 aparentemente capaces de interceptar la actividad de C6-HSL se analizaron más a fondo, estudiando su capacidad de interceptar C10-HSL mediante el mismo ensayo en medio sólido pero empleando la cepa biosensora *C.*

violaceum VIR07. Entre éstas, sólo 15 fueron capaces de eliminar completamente la actividad tanto de C6-HSL como de C10-HSL, como fue detectado con el biosensor tras 24 horas (Figuras 1 y 3) y por tanto estas cepas fueron seleccionadas para la posterior caracterización de su actividad QQ e identificación. Estas cepas fueron aisladas de *F. vesiculosus*, de la muestra de sedimento y de la muestra de biopelícula del tanque de agua (Tabla 3). Además, estas cepas fueron analizadas para determinar su capacidad de degradar OC12-HSL mediante un bioensayo en placa con la cepa biosensora *E. coli* JM109 pSB1075. 10 de las 15 cepas fueron capaces de suprimir completamente la actividad de OC12 detectable por el biosensor (Tabla 3), indicando que un amplio rango de sustratos AHL pueden ser inactivados por estas cepas.

Origen	Cepa	Bacterias más cercanas cultivadas	% Id del locus 16S ADNr	Gram	TSA-1%	OC12-HSL	Secuencias putativas
<i>Fucus vesiculosus</i>	2	<i>Hyphomonas</i> sp. DG895	99	-	-	+++	acilasa/lactonasa
	5	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+	lactonasa
	168	<i>Alteromonas</i> sp. BCw156	99	-	-	+++	acilasa
	172	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
	173	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	100	+	+	+++	lactonasa
	176	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
	177	<i>Phaeobacter</i> sp. NH52F	96	-	-	+++	
Sedimento del tanque de peces	20J	<i>Tenacibaculum</i> sp. JAM-BA07	99	-	+	+++	

	24	<i>Bacillus circulans</i> strain X3	98	+	+	+++	lactonasa ⁽¹⁾
	30	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
	33	<i>Halomonas taeanensis</i> strain BH539	99	-	-	-	
	50	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MM30	99	+	+	+++	lactonasa
	97-1	<i>Stappia</i> sp.	98	-	-	+++	lactonasa
	97-2	<i>Oceanobacillus</i> sp. YIM DH3	99	+	+	-	acilasa
Biofilm del tanque de agua	61	<i>Roseovarius aestuarii</i> SMK-122	99	-	-	+++	

(1) Basado en la presencia común de lactonasa putativas en los genomas de especies del género *Bacillus*.

Tabla 3. Identificación de las 15 cepas con actividad Quorum Quenching en base a las secuencia de la subunidad 16S del ADNr. También se muestran el carácter Gram (protocolo estándar de tinción), la capacidad para crecer en medio carente de sales marinas (TSA con NaCl 1 g/l) y la capacidad para degradar OC12-HSL, así como la presencia de secuencias homólogas candidatas para acilasas y lactonasa en los genomas secuenciados disponibles.

Caracterización de la actividad QQ mediante análisis por HPLC-MS

Las 15 cepas capaces de eliminar la actividad de C6 y C10-HSL en el bioensayo en placa fueron capaces de reducir significativamente la concentración de C4 y de C12-HSL, como demostraron los análisis por HPLC-MS (Figura 3) lo que indica la presencia de actividad enzimática contra estas

AHLs. El pH final de los cultivos tras el ensayo de degradación de 24 horas fue menor de 7 en todos los casos y por tanto se puede descartar que los elevados valores de pH se deban a la lactonización espontánea de las AHLs. Este resultado confirma la presencia de actividad de degradación enzimática en todas las cepas, lo cual ya había sido indicado por el aspecto del halo de violaceína en el ensayo de *C. violaceum*, ya que con la concentración de AHLs empleada, la presencia de degradación enzimática de AHLs es demostrada por la ausencia o reducción del halo de violaceína alrededor del pocillo, mientras que la presencia de inhibidores/antagonistas de AHLs es generalmente demostrada por la presencia de un halo claro de inhibición de la producción de violaceína rodeado por un segundo halo de producción de violaceína.

La mayoría de cepas degradaron completamente tanto C4-HSL como C12-HSL a pesar de que los primeros bioensayos fueron llevados a cabo con C6-HSL y C10-HSL. La recuperación de la concentración de HSL derivada de la acidificación del sobrenadante (spent culture media) a pH 2, lo cual permite la recuperación del anillo de lactona causada por la actividad lactonasa, fue mayor para C4-HSL. Sólo la cepa 177, correspondiente a una especie nueva del grupo α -Proteobacteria relacionada con *Phaeobacter*, la cepa 2, identificada como *Hyphomonas* sp., la cepa 168, identificada como *Alteromonas* sp. y la cepa 24, identificada como *Bacillus circulans*, produjeron una degradación casi completa de las dos AHLs que no pudieron ser significativamente recuperadas mediante la acidificación, indicando una actividad enzimática distinta de lactonasa. Distintas cepas, como la 20J (*Tenacibaculum discolor* ID 99%), mostraron un perfil de degradación diferente para AHLs de cadena corta que para AHLs de cadena larga, indicando que existe más de un tipo de actividad enzimática, mientras que otros dentro del género *Stappia* (cepas 5, 176 y 97-1), *Oceanobacillus* (cepas 172, 30 y 97-2) y *Halomonas* (cepa 33) parecen presentar una actividad lactonasa de amplio espectro, ya que la cantidad de AHL es parcialmente recuperada tras la acidificación del sobrenadante (spent culture media) (Figura 3).

Identificación de las bacterias y búsquedas en bases de datos

Las secuencias del gen de la subunidad 16S del ARNr de los 15 aislados seleccionados fueron obtenidas y empleadas para hacer una búsqueda BLAST en la base de datos del GenBank para determinar su afiliación taxonómica. La identidad del aislado más próximo filogenéticamente se muestra en la Tabla 3. De los 15 aislados, dos pertenecen al grupo de γ -proteobacteria (33 y 168), seis al grupo de α -Proteobacteria (5, 97-1, 176, 2, 61 y 177), seis al grupo *Firmicutes* (24, 30, 97-2 y 172), dos a *Actinobacteria* (50 y 173) y uno a Bacteroidetes (20J). De los 15 aislados caracterizados, sólo tres de ellos: la cepa 24 (*Bacillus circulans* 98% de identidad) y las cepas 50 y 173 (*R. erythropolis*, 99% y 100% de identidad respectivamente) pertenecen a géneros en donde ya se han descrito aislados con actividad QQ (Dong *et al.*, 2002, *Microbiol* 68: 1754-1759; Uroz *et al.*, 2003, *Microbiol* 149: 1981–1989). Aunque la presencia de especies de *Bacillus* es común en muestras marinas (Ivanova *et al.*, 1999, *Int Microbiol* 2: 267-271) y *B. circulans* ha sido aislado con anterioridad del medio marino (Das *et al.*, 2008, *J Appl Microbiol* 104:1675-1684), la cepa 24 fue aislada de sedimento de un tanque de cultivo acuícola tierra adentro y por tanto puede considerarse como de origen terrestre. Dos aislados obtenidos de fuentes distintas, la cepa 24 del sedimento del tanque de cultivo acuícola y la cepa 173 de *F. vesiculosus*, fueron identificadas como *R. erythropolis* (Tabla 3), indicando que esta especie es también un representante común en las comunidades bacterianas marinas con actividad QQ. El género *Rhodococcus* es de amplia distribución tanto en ambientes acuáticos como en ambientes terrestres y es bien conocido por su habilidad excepcional para degradar distintos compuestos orgánicos complejos (Goodfellow and Maldonado, 2006, *New York: Springer*, pp. 843-888). Distintas especies dentro de este género son capaces de degradar AHLs, y todas ellas son de origen marino (Uroz *et al.*, 2008, *Appl Environ Microbiol* 74: 1357-1366). Todos los aislados nuevos que presentan actividad QQ pertenecen a géneros típicos de ambientes marinos a pesar de que muchos de ellos fueron capaces de crecer en ausencia de sales marinas (Tabla 3).

El género de α -proteobacteria *Stappia* (cepas 5, 176 y 97-1), que comprende distintas especies marinas anteriormente clasificadas como dentro del género *Agrobacterium*, y el género *Oceanobacillus* sp. (cepas 172, 30 y 97-2), que comprende varios alcalifílicos facultativos y especies marinas, parecen ser abundantes y ubicuos, ya que representantes de ambos géneros fueron aislados en repetidas ocasiones de muestras de diverso origen (*F. Vesiculosus* y muestra de sedimento). De entre las cepas aisladas de *F. vesiculosus*, *Hyphomonas* sp. (cepa 2) pertenece al grupo de bacterias marinas prostecadas que son típicos epibiontes de algas (Poindexter, 2006, *New York: Springer*, pp. 72-90), mientras que *Alteromonas* sp. (cepa 168) es un género de γ -proteobacterias marinas aislado con frecuencia de diversos ambientes marinos, incluyendo algas (Gauthier and Breittmayer, 1992, *New York: Springer-Verlag*, pp. 3046-3070). Finalmente, la cepa 177 o cepa de la invención representa un especie nueva dentro del grupo de las α -Proteobacteria que está relacionado (ID 96%) con *Phaeobacter* sp., un género de bacterias marinas próximo al clado de *Roseobacter* (Martens *et al.*, 2006, *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1293-1304), aunque otras bacterias relacionadas filogenéticamente con ésta han sido descritas como especies no cultivadas (Jones *et al.*, 2007, *Microb Ecol* 53:153-162).

La única cepa activa aislada de la muestra de biopelícula, la cepa 61, fue identificada como *Roseovarius aesturari* (ID 99%), un género de α -Proteobacteria estrictamente marino (Labrenz *et al.*, 1999, *Int J Syst Bacteriol* 49: 137-147). Esta especie pertenece al linaje de *Roseobacter*, que se ha estimado que puede comprender entre el 20 y el 30% de las secuencias de ARNr 16S presentes en la zona fótica de ambientes marinos (Wagner-Dobler and Biebl, 2006, *Annu Rev Microbiol* 60: 255-280).

Las relaciones entre las 15 cepas secuenciadas así como su relación con otras secuencias génicas de ARNr 16S de otros aislados con actividad QQ (Carlier *et al.*, 2003, *Appl Environ Microbiol* 69: 4989-4993; Kang *et al.*, 2004, *Can J Microbiol* 50: 935-941; Uroz *et al.*, 2007, *Arch Microbiol* 187: 249-256) o con

lactonasas o acilasas clonadas se muestran en el dendrograma de la Figura 4. Aunque *Deltia* sp. A317 y *Ochrobactrum* sp. A44 tienen actividad QQ, éstas no fueron incluidas en el análisis debido a la corta longitud de sus secuencias de ARNr 16S.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de células bacterianas de α -Proteobacteria depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de depósito CECT 7733.
5
2. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para provocar *quorum quenching*.
- 10 3. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento.
- 15 4. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.
- 20 5. Uso de la cepa según la reivindicación 4 donde la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.
- 25 6. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, para inhibir la formación de biofilms.
- 30 7. Uso de la cepa, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.
8. Uso de la cepa, del extracto celular crudo o del sobrenadante de sus cultivos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las

reivindicaciones 4 a 7, donde la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.

- 5 9. Composición que comprende un elemento seleccionado de la lista que comprende:
- a. la cepa según la reivindicación 1,
 - b. el extracto celular crudo de un cultivo bacteriano de la cepa según la reivindicación 1,
 - c. el sobrenadante del cultivo bacteriano de (b),
- 10 o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 10. Uso de la composición según la reivindicación 9 como agente antipatogénico.
- 20 11. Uso de la composición según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento.
- 25 12. Uso de la composición según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas.
- 30 13. Uso de la composición según la reivindicación 12 donde la enfermedad infecciosa bacteriana la padece un animal acuático.
14. Uso de la composición según la reivindicación 9 para inhibir la formación de biofilms.
15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 en combinación con antibióticos u otros agentes antibacterianos.

16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas bacterianas son provocadas por bacterias productoras de AHLs.

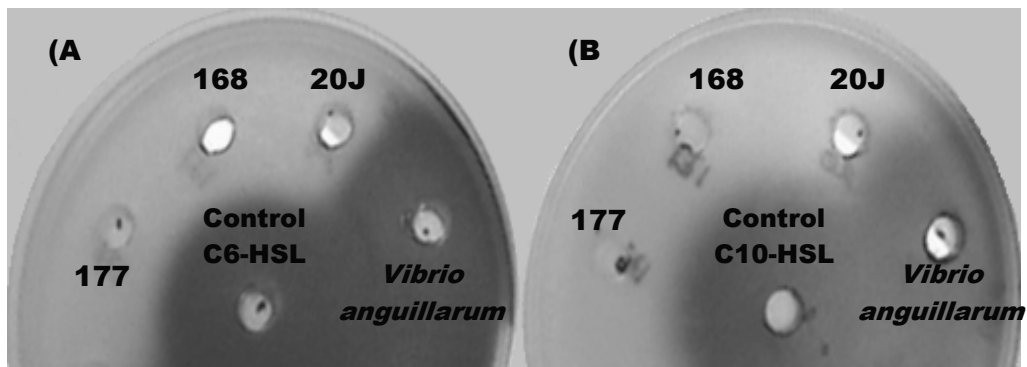


FIG. 1

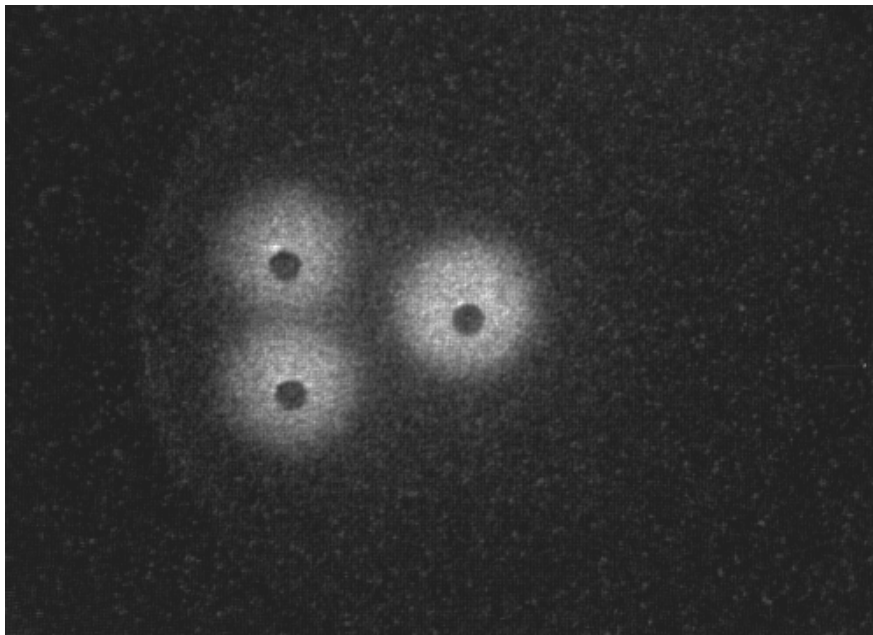


FIG. 2

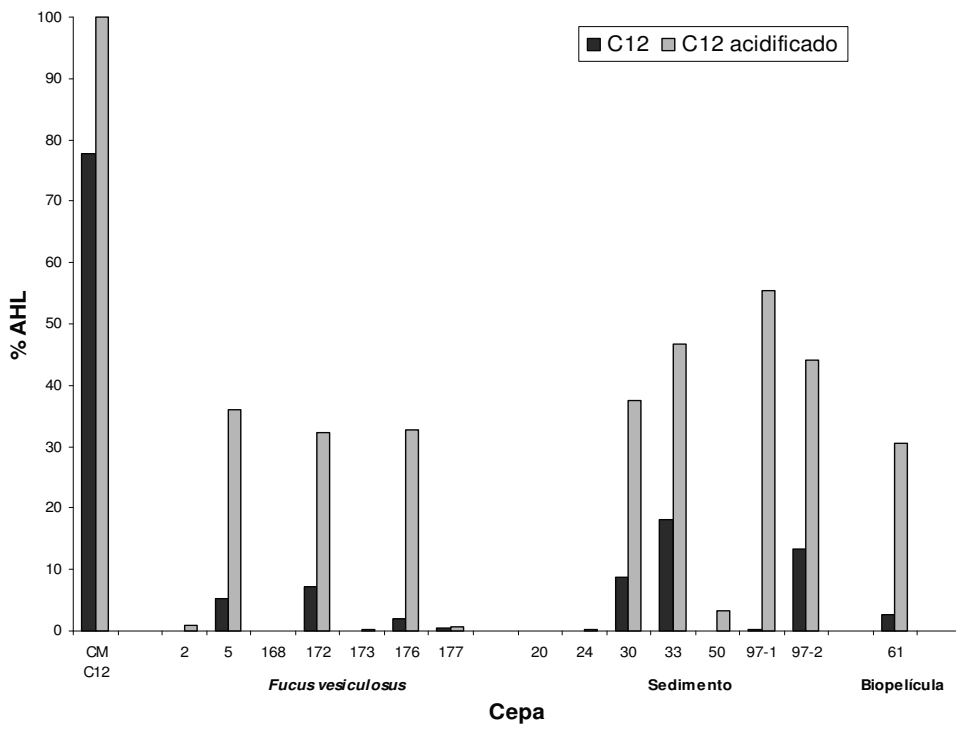
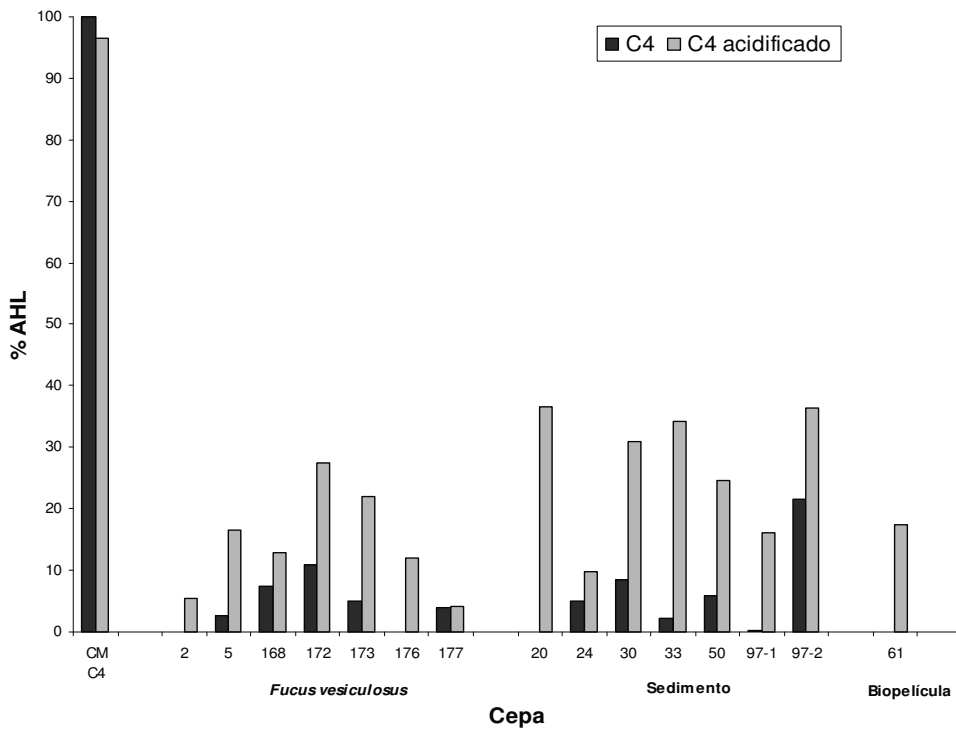


FIG. 3

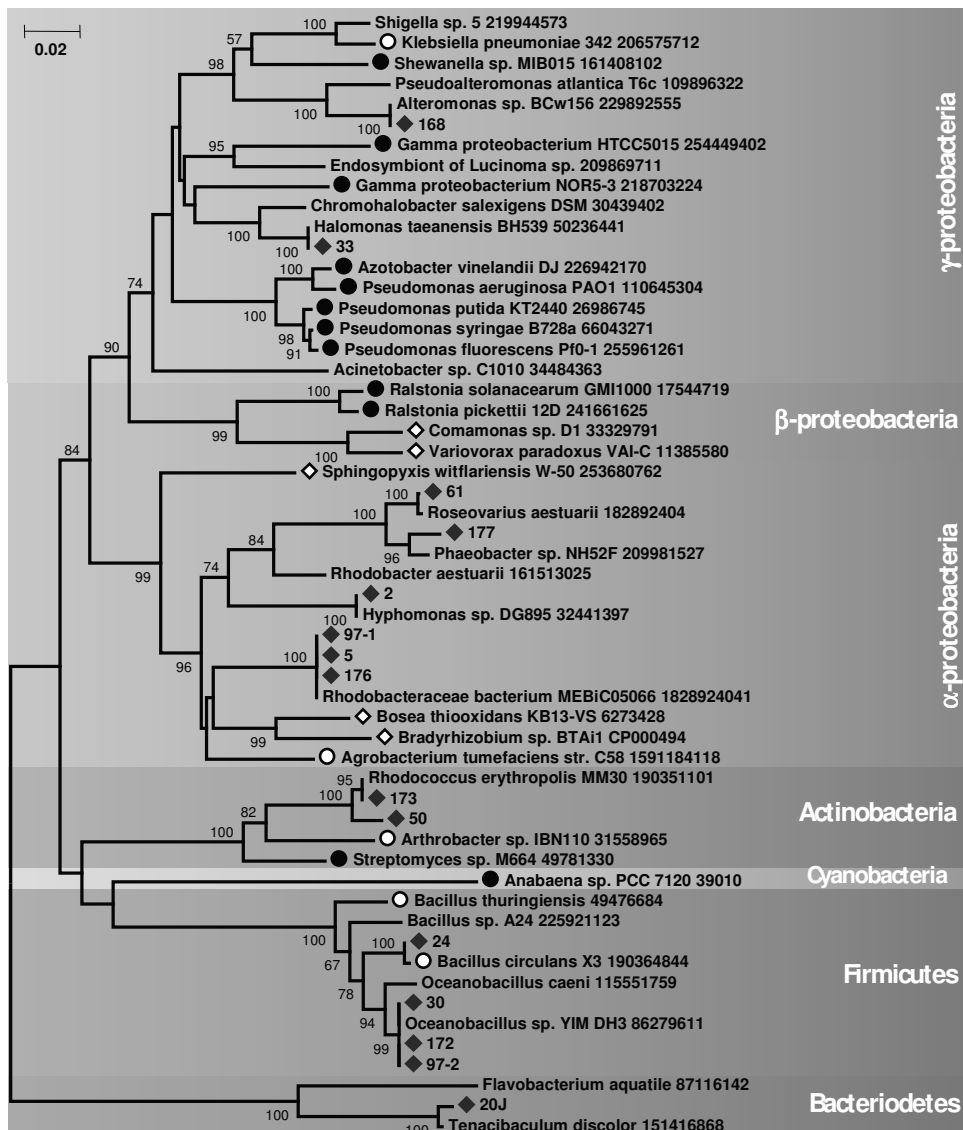


FIG. 4

RESUMEN

Uso de una nueva α -Proteobacteria para *Quorum Quenching*

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de una nueva especie de α -
Proteobacteria afín al género *Phaeobacter*, que es capaz de degradar las N-
Acil-homoserin lactonas (AHLs), las cuales no pueden ser recuperadas
significativamente por acidificación, indicando una actividad enzimática
diferente a la lactonasa. Por tanto, el empleo de esta bacteria es útil para
10 controlar las infecciones bacterianas, sin ejercer presión selectiva sobre las
poblaciones de las bacterias patógenas y evitando así la aparición de
resistencias. También permite la inhibición de otros procesos de colonización
bacteriana en los que están implicadas las señales de “*quorum sensing*” o QS
tipo AHL, como la formación de biofilms.

Untitled_ST25
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
 <120> "Uso de una nueva alfa-Proteobacteria para Quorum Quenching"
 <130> 1596.32
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 970
 <212> DNA
 <213> Cepa bacteriana con número de depósito CECT 7733
 <400> 1
 cacatgcaag tcgagcgctt cacttcggtg aggagcggcg gacgggtag taacgcgtgg 60
 gaacataccc ttttctaagg aatagccact ggaaacggtg agtaatacct tatacgcctt 120
 tcgggggaaa gatttatcgg agaaggattg gcccgcgtta gattagatag ttggtggggt 180
 aatggcctac caagtctacg atctatagct ggttttagag gatgatcagc aacactggga 240
 ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggcbc 300
 aagcctgatc tagcgatgcc gcgtgagtga tgaaggcctt agggtcgtaa agctctttcg 360
 ccaaggatga taatgacagt acttggtaaa gaagtcccgg ctaactccgt tccagcagcc 420
 gcgtaatac ggaggggact agcgttgttc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc 480
 ggatcagaaa gtatggggtg aaatcccagg gctcaaccct ggaactgcct cataaactcc 540
 tggctttgag ttcgagagag gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata 600
 ttcggaggaa caccagtggc gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgagggtcga 660
 aagtgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acaccgtaa cgatgaatgc 720
 cagtcgctcg atagcatgct attcgggtgac acacctaacg gattaagcat tccgcctggg 780
 gagtacggtc gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag 840
 catgtggttt aattcgaagc aacgcgcaga accttacc aa cccttgacat cctgtgctac 900
 atccagagat ggatggttcc cttcggggac gcagtgatca ggtgctgcat ggctgtcgtc 960
 agctcgtgtc 970

Anexo 3. Otras publicaciones relacionadas

3.1 Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Lett. 280: 73-80.



RESEARCH LETTER

Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase

Manuel Romero¹, Stephen P. Diggle², Stephan Heeb², Miguel Cámara² & Ana Otero¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago, Spain; and ²Centre for Biomolecular Sciences, Institute of Infection Immunity and Inflammation, School of Molecular Medical Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK

Correspondence: Ana Otero, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago, Spain. Tel.: +34 981563100 ext 14944; fax: +34 981592210; e-mail: mpaotero@usc.es

Received 5 October 2007; accepted 26 November 2007.
First published online 11 January 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x

Editor: Karl Forchhammer

Keywords

Cyanobacteria; *Anabaena*; quorum sensing; quorum quenching; AHL; acylase.

Abstract

Many bacteria use quorum sensing (QS) to coordinate responses to environmental changes. In Gram-negative bacteria, the most extensively studied QS systems rely on the use of *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) signal molecules. Some bacteria produce enzymes that are able to inactivate AHL signals produced by other bacteria and hence interfere with QS-mediated processes via a phenomenon known as quorum quenching. Acylase-type AHL degradation activity has been found in the biomass of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120, being absent from the culture media. The gene *all3924* has been identified and cloned whose product exhibits homology to the acylase QuiP of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, demonstrating that it is at least partially responsible for the AHL-acylase activity. The recombinant enzyme, which was named auto-inducer inhibitor from *Cyanobacteria* (AiiC), shows broad acyl-chain length specificity. Because the presence of AHLs in the biomass of nitrogen-fixing cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 has been described recently, AiiC could represent a self-modulatory system to control the response to its own QS signals but could also be involved in the interference of signalling within complex microbial communities in which *Cyanobacteria* are present.

Introduction

Many bacterial species coordinate responses to environmental changes using complex cell–cell communication mechanisms in a population density-dependent manner. This phenomenon has become known as quorum sensing (QS) and is based in the accumulation of signal molecules in the culture media that control the expression of multiple genes (Fuqua *et al.*, 1994). Using QS bacterial populations can coordinate important biological functions including motility, swarming, aggregation, plasmid conjugal transfer, luminescence, antibiotics biosynthesis, virulence, symbiosis or biofilm maintenance and differentiation (Swift *et al.*, 2001; Waters & Bassler, 2005; Williams *et al.*, 2007). In addition, many plant and animal pathogenic bacteria control virulence through QS (De Kievit & Iglewski, 2000; Swift *et al.*, 2001; Von Bodman *et al.*, 2003). While several chemically distinct families of QS signal molecules have now been described, the most-studied QS signalling system involves

N-acylhomoserine lactones (AHLs), used by diverse Gram-negative bacteria (Whitehead *et al.*, 2001; Fuqua & Greenberg, 2002; Williams *et al.*, 2007). AHLs differ in the acyl side chain, which is usually between four and 18 carbons in length, with or without saturation or C3 hydroxy- or oxo-substitutions (Whitehead *et al.*, 2001).

Because many bacterial pathogens use AHLs to control the production of virulence factors, the interference with this cell density-dependent communication mechanism constitutes a novel and promising strategy to control bacterial infectious diseases (Dong & Zhang, 2005; Dong *et al.*, 2007). Evidence is beginning to accumulate indicating that inhibition of QS, a mechanism known as quorum quenching (QQ), may be a strategy already adopted by many organisms to disarm potentially pathogenic or competitor bacteria. An example of QQ is the production of AHL agonists by the red alga *Delisea pulchra* to inhibit their surface colonization by AHL-based QS microorganisms (Givskov *et al.*, 1996). Another strategy to block the

AHL-based QS is the enzymatic inactivation of signals found in mammalian cells (Xu *et al.*, 2003; Chun *et al.*, 2004) and in different bacteria (reviewed by Dong & Zhang, 2005). Plants can also interfere with AHL signals, probably through an enzymatic mechanism, although no enzyme responsible for this activity has been identified (Delalande *et al.*, 2005). Two main types of enzymes have been described so far with AHL-degrading activity in both cases, making the signal molecule unable to activate its cognate sensor/response regulator: the lactonases, which hydrolyse the HSL ring of the AHL molecule to produce corresponding acyl homoserines and are highly specific against AHLs, and the acylases, which cleave the AHL amide bond, generating the corresponding fatty acid and homoserine lactone (HSL) (Dong *et al.*, 2007). Lactonases have been identified in several strains of the genus *Bacillus* and *Arthrobacter* sp. but are also present in some Gram-negative bacteria such as *Klebsiella* or *Agrobacterium* (Dong & Zhang, 2005). AHL-acylase activity has been identified in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp. and the Gram-positive *Rhodococcus erythropolis* (Lin *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Sio *et al.*, 2006). AHL-acylase activity was also detected in *Variovorax paradoxus* but the enzyme responsible remains undetermined (Leadbetter & Greenberg, 2000).

The presence of AHLs in the biomass of the nitrogen-fixing filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has been demonstrated recently (M. Romero *et al.*, unpublished results). The maximal concentration of AHLs was detected at the end of the exponential growth phase (48 h), disappearing abruptly 24 h later, which might indicate the possible presence of an AHL-degradation activity. Moreover, a sequence homologous to the QuiP acylase from *P. aeruginosa* PAO1 could be identified in the genome of *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001). Both facts led to the investigation of the presence of enzymatic QQ activity in pure cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Axenic cultures of *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120 were completely acclimatized to nitrogen-fixing conditions (diazotrophic cultures, BG11₀ medium, Rippka *et al.*, 1979) or to the presence of nitrate (nondiazotrophic cultures, BG11 medium). The axenicity of the cultures was checked daily (Rippka *et al.*, 1979). Cultures were grown in 300-mL tubes (diameter 4.5 cm) aerated with filter-sterilized air supplemented with CO₂ in order to maintain the pH at 7.0, and maintained at 30 °C with a circadian light cycle of 12 h light:12 h dark at a light intensity of

118 μmol photon m⁻² s⁻¹ provided by OSRAM Daylight L36W/10 lamps. Cultures were inoculated with 50 mL of late logarithmic-phase cultures and allowed to reach the stationary phase (4 days).

Three biosensors of *Escherichia coli* JM109 transformed with the *lux*-based reporter plasmids pSB536, pSB401 or pSB1075 that were used to quantify the different AHLs with short, middle and long acyl chains, respectively, were grown on Luria-Bertani (LB) medium supplemented with the suitable antibiotic at 37 °C (Throup *et al.*, 1995; Winson *et al.*, 1998).

Detection of AHL-degradation activity

Samples (4 mL) were obtained from 48-hour-old completely acclimatized diazotrophic and nondiazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120. The samples were centrifuged for 10 min at 2000 g in order to separate the biomass from the culture media. The pellets were washed with 4 mL of PBS pH 6.5, resuspended in another 2 mL of the same buffer, sonicated in ice for 5 min and centrifuged at 16 000 g for 90 min. The crude cell extracts (CCEs) obtained in this way were filtered through a 0.22 μm and stored at 4 °C (Uroz *et al.*, 2005). For the detection of AHL degradation activity, 500 μL of culture media or CCEs were mixed with 500 μL of Tris-HCl buffer 100 mM pH 7.0 and 6 μL of a 1 mg mL⁻¹ solution of *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C12-HSL). The mixture was incubated at 30 °C for 1 h and the reaction was stopped by heating at 95 °C for 5 min (Park *et al.*, 2005). Finally, 10 μL of the reaction mix was pipetted into a microtitre plate and the amount of remaining intact AHL was measured on addition of a 1/100 dilution of an overnight culture at 37 °C of the *lux*-based biosensor strain *E. coli* JM109 pSB1075 (Winson *et al.*, 1998) using a luminometer (Ultra Evolution Xfluor4beta E 4.51e). A positive control was set with 10 μL of Tris-HCl 100 mM pH 7.0/40 μM C12-HSL heated at 95 °C for 5 min. Negative controls were established with 10 μL of CCE and 10 μL Tris-HCl 100 mM pH 7.0. To monitor the evolution of AHL degradation activity along the growth curve 4 mL samples were taken at 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after inoculation of diazotrophic cultures (*n* = 4), centrifuged and processed to obtain the corresponding CCEs.

Specificity of the degradation activity

Samples (300 mL) were taken from diazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 72 and 96 h after inoculation and the CCEs were prepared in 30 mL of PBS (pH 6.5) as explained before, and were used to determine the specificity of the degradation. Acetonitrile stocks of AHLs were pipetted in triplicate in a 96-well microtitre plate in order to obtain a final concentration of 100, 10, 1 and 0.1 μg mL⁻¹ in the reaction mixture. The solvent was allowed to evaporate and AHLs were reconstituted in 100 μL CCE and

incubated at 30 °C. Controls were set for each AHL concentration in which 100 µL of PBS, pH 6.5, were added. After 4 h, 100 µL of a 1 : 100 dilution of a suitable *lux*-based sensor (*E. coli* pSB401, pSB536 or pSB1075) was added to each well and incubated for another 2 h at 37 °C. Plates were photographed by a light camera and the differences in bioluminescence were evaluated to determine the degree of degradation of each AHL in comparison with controls. The AHLs tested varied in their *N*-acyl side chains, which were as follows: *N*-butyryl-*L*-homoserine lactone (C4-HSL), *N*-(3-oxobutyryl)-*L*-homoserine lactone (OC4-HSL), *N*-(3-hydroxybutyryl)-*L*-homoserine lactone (OHC4-HSL), *N*-hexanoyl-*L*-homoserine lactone (C6-HSL), *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone (OC6-HSL), *N*-(3-hydroxyhexanoyl)-*L*-homoserine lactone (OHC6-HSL), *N*-octanoyl-*L*-homoserine lactone (C8-HSL), *N*-(3-oxooctanoyl)-*L*-homoserine lactone (OC8-HSL), *N*-(3-hydroxyoctanoyl)-*L*-homoserine lactone (OHC8-HSL), *N*-decanoyl-*L*-homoserine lactone (C10-HSL), *N*-(3-oxodecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OC10-HSL), *N*-(3-hydroxydecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OHC10-HSL), *N*-dodecanoyl-*L*-homoserine lactone (C12-HSL), *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OC12-HSL), *N*-(3-hydroxydodecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OHC12-HSL), *N*-tetradecanoyl-*L*-homoserine lactone (C14-HSL), *N*-(3-oxotetradecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OC14-HSL) and *N*-(3-hydroxytetradecanoyl)-*L*-homoserine lactone (OHC14-HSL).

Identification of the type of degradation activity

CCEs obtained from 4-day-old diazotrophic cultures using the procedure mentioned before were used for the identification of the type of AHL degradation activity. The assays were carried out using OC12-HSL as described previously (Uroz *et al.*, 2005). A sample of 50 µL of OC12-HSL (100 mM in acetonitrile) was evaporated to dryness under nitrogen flux and incubated with 5 mL of the CCE at 30 °C for 4 h. Every hour, 1 mL samples of the reaction mixtures were obtained and processed for the detection of acylase and lactonase activity. For the detection of acylase activity, the presence of free HSL was determined by 'chemically trapping' the free amine released by dansylation with dansyl chloride (Uroz *et al.*, 2005). The reaction was performed by adding 125 µL of 10 mM NaOH to a 250 µL CCE sample, followed by the addition of 125 µL of 5 mM dansyl chloride and incubation overnight at 37 °C. The presence of dansylated HSL was analysed by reverse-phase HPLC separation of 20 µL of the mixture. As a control, synthetic HSL (final concentration 1 mM) was dansylated in parallel with the same reagents.

For the detection of a possible lactonase activity, which enzymatically opens the lactone ring, 250 µL of the sample was extracted twice with ethyl acetate, evaporated to dryness

and resuspended in acetonitrile in order to quantify the remaining concentration of OC12-HSL present in the sample by reverse-phase HPLC as described before (Uroz *et al.*, 2005). In parallel, another 250 µL was treated with 10 mM HCl in order to adjust the pH of the sample to 2.0 and incubated overnight at room temperature to induce the recyclization of the lactone ring. Samples were extracted and analysed by reverse-phase HPLC in order to detect the increase in AHL concentration that would be produced in comparison with the nontreated sample, in case the degradation was caused by a lactonase (Uroz *et al.*, 2005).

DNA manipulation and cloning of the *all3924* gene

All DNA handling was performed following standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Chromosomal DNA was isolated from cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 following the protocol of Wu *et al.* (2000). The ORF encoding the putative acylase gene (bases 4733973 to 4731430, obtained from www.cyanobase.com; Kaneko *et al.*, 2001) was amplified from chromosomal DNA by PCR using the forward primer 5'-TATGAATTCATGGCACAGCACCCAAATATG-3' and the reverse primer 5'-TATATCGATTCAGTGATGGTGATGGTGGGCATTAAGTCAATTTT-3' which contain EcoRI and ClaI restriction sites, respectively (underlined; start and stop codons are indicated in italics). The PCR product was digested with both restriction enzymes and inserted into the isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible shuttle expression vector pME6032 cut with the same enzymes (Heeb *et al.*, 2002). The insert was sequenced with a CEQ8000 Genetic Analysis System using the primers P6032: 5'-CCCTCACTGATCCGCTAGTC-3' and PTAC: 5'-CGGCTCGTATAATGTGTGGA-3'. The sequence of the cloned gene product was compared with other bacterial acylase sequences available in the databases (QuiP and PvdQ of *P. aeruginosa* PAO1, AhIM of *Streptomyces* sp., AiiD of *Ralstonia* sp. and QsdA of *R. erythropolis* from the GenBank protein database) and with sequences of putative acylases from other *Cyanobacteria* (GLR1988 of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, NPR0954 *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and SLR0378 of *Synechocystis* sp. PCC 6803) that were identified using the Cyanobase BLAST tool (Kaneko *et al.*, 2001). The phylogenetic analysis of sequences was carried out using the MULTALIN (multiple sequence alignment with hierarchical clustering) software (Corpet, 1988; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

Expression of *all3924* in *E. coli* and detection of AHL-acylase activity

Escherichia coli DH5α transformed with plasmids pME6032 or pME6032::*all3924* was grown for 24 h at 37 °C or 48 h at

28 °C in 100 mL LB medium supplemented with 25 µg mL⁻¹ tetracycline and 1 mM IPTG. Cells were harvested by centrifugation, washed twice with 10 mL of PBS, pH 7.0, sonicated 5 min in ice and centrifuged 15 min at 16 000 g to obtain a CCE.

The acylase activity of the obtained CCEs towards C12-HSL was determined using a bioluminescence assay. Aliquots consisting of 100 µL of CCE containing 100 µg mL⁻¹ of synthetic AHLs were prepared. After 4 h of incubation at 30 °C, half of the reaction mixtures were acidified to pH 2.0 with HCl and incubated overnight at room temperature. Finally, all the reaction mixtures were extracted twice with ethyl acetate and the extracts obtained were evaporated to dryness. For the bioassay, the extracts were resuspended with a 1/100 dilution of an overnight culture of the *lux*-based sensor strain *E. coli* pSB1075, triplicate samples were deposited in 96-well microtitre plates at 37 °C and light emission was measured over time.

Results

AHL degradation activity

Acylase activity was found in the biomass of both diazotrophic and nondiazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120, but no degradation activity could be detected in the cell-free supernatants of any of them (data not shown). Because the concentration of AHL seemed to be strictly modulated in diazotrophic cultures (M. Romero *et al.*, unpublished results), while no AHLs could be found in any of the nondiazotrophic cultures analysed, further characterization of the AHL degradation activity was performed using only diazotrophic cultures. The degradation activity varied along the growth curve. The activity was low in early cultures (12 h after inoculation), increasing up to 36 h and declining abruptly at the early stationary phase, between 36 and 48 h, and recovering thereafter (Fig. 1).

To investigate the specificity of the AHL-degrading activity for AHLs with different acyl chain lengths and substitutions, a selection of AHLs with chains ranging from C4 to C14 were tested. Although the CCEs of diazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 were able to degrade a wide range of AHLs, they showed a preference for long-chain AHLs (Table 1).

Identification of the type of degradation activity

To investigate whether the AHL-degrading activity was caused by lactonolysis, 1 mM OC12-HSL treated with CCE of diazotrophic *Anabaena* sp. PCC 7120 during 4 h was acidified to enable the recyclization of any opened HSL rings. HPLC analysis of the acidified samples showed the inability to recover the original levels of intact AHLs (Fig. 2a), suggesting that the degrading activity observed is

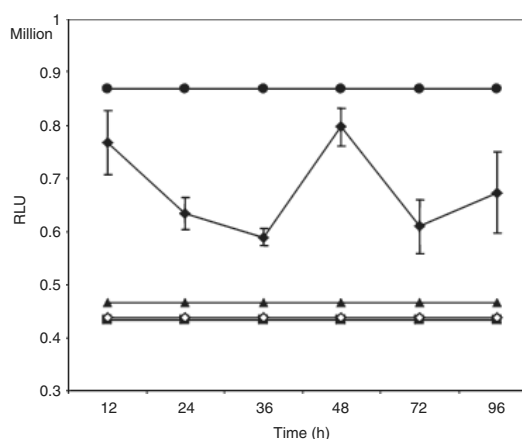


Fig. 1. Changes in the AHL degradation activity of CCEs obtained at different times of the growth curve of diazotrophic cultures ($n=4$, scale bars represent SD) of *Anabaena* sp. PCC 7120. Activity of CCE with 40 µM solution of C12-HSL (◆) as measured with the bioluminescent sensor strain *Escherichia coli* JM109 pSB1075. Controls: (■) no addition, (▲) TRIS, (●) TRIS+AHL, (◇) CCE without AHL. RLU: relative light units.

Table 1. Degradation of different AHLs (100 µg mL⁻¹) by CCEs of 4 days old diazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 and 2 days old culture of *Escherichia coli* DH5α transformed with pME6032 expressing the *aiiC* gene

AHL	CCE	
	<i>Anabaena</i> sp.	<i>E. coli</i>
Short length AHLs		
C4 HSL	+	+
OC4 HSL	+	ND
OHC4 HSL	+	ND
C6 HSL	+	+
OC6 HSL	+	ND
OHC6 HSL	+	ND
Middle length AHLs		
C8 HSL	+	++
OC8 HSL	+	ND
H8 HSL	+	ND
C10 HSL	+++	++
OC10 HSL	++	+++
OHC10 HSL	+++	+++
Long length AHLs		
C12 HSL	+++	+++
OC12 HSL	++	+++
OHC12 HSL	+++	+++
C14 HSL	+++	++
OC14 HSL	+++	ND
OHC14 HSL	+++	ND

The degradation was measured as a decrease of the AHL activity in a liquid media bioassay, with three biosensors for short, middle and long side chain AHLs. *Escherichia coli* cultures were carried out at 28 °C and degradation assays at 30 °C.

ND, not determined.

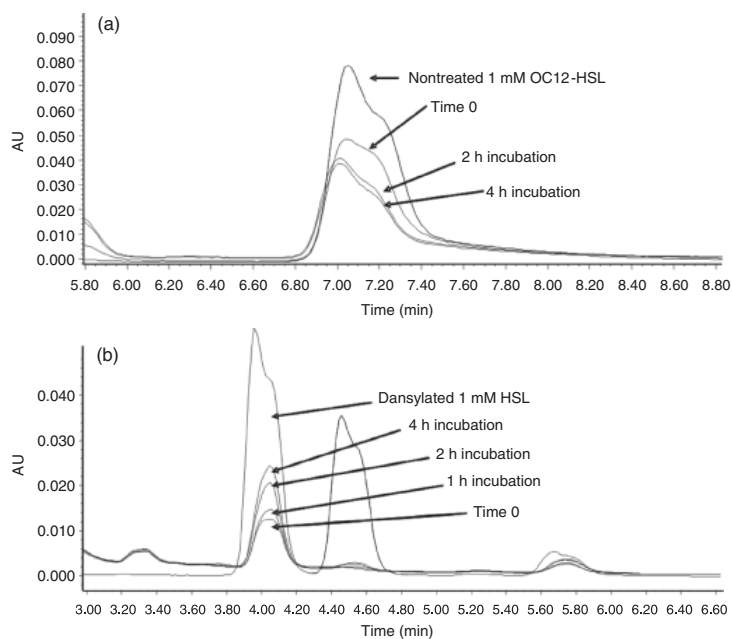


Fig. 2. Identification of the type of AHL degradation activity in CCEs of diazotrophic *Anabaena* sp. PCC 7120 by HPLC. (a) Degradation of OC12-HSL by CCE at different times of incubation as measured by HPLC after acidification to pH 2.0. No recovery of the AHL activity following acid treatment is observed, which dismisses the presence of lactonase activity. (b) Dansylation of OC12-HSL treated with CCE to reveal the presence of free HSL. The concentration of dansylated-HSL increases with the time of exposure of OC12-HSL to the CCE of *Anabaena* sp. PCC 7120, confirming the presence of an acylase that cleaves the amide bond linking the HSL ring and the acyl chain. AU, absorbance units.

not due to lactonolysis. This suggested that this degradation may be due to acylase activity instead. To test this possibility, dansylation experiments were performed and the dansylated products were analysed by HPLC. Figure 2b shows the presence of dansylated HSL, resulting from the cleavage of the amide bond between the HSL and the acyl chain. This dansylated product increased in concentration with time in samples obtained by exposing OC12-HSL for 4 h to the CCE (Fig. 2b). These results clearly indicate the presence of an AHL acylase in CCEs of *Anabaena* sp. PCC 7120 that specifically released the HSL from OC12-HSL. The difference between control (nontreated 1 mM OC12-HSL) and Time 0 sample in the acidification assay (Fig. 2a) is due to the partial recovery of AHL from the organic matrix during the extraction procedure because at least two sequential extractions are recommended for efficient recovery (Ortori *et al.*, 2007). In addition to this, a few minutes could be enough to obtain some degradation of the AHL, as shown by the presence of free HSL at Time 0 in the dansylation assay (Fig. 2b).

Cloning of the *aiiC* acylase gene

Using the *P. aeruginosa* PAO1 quorum signal utilization and inactivation acylase QuiP (PA1032) as a query, the product of *all3924* (GenBank protein accession No. BAB75623) was identified in a BLAST search at the Cyanobase web site as a gene encoding a potential acylase in *Anabaena* sp. PCC 7120.

QuiP and the product of *all3924* share 29% identity and 47% similarity between them. The *all3924* gene was cloned by PCR into the expression vector pM6032 in *E. coli* DH5 α . The sequence of the cloned insert was identical to the sequence available in the genome database. Incubation for 4 h of CCEs from the recombinant *E. coli* expressing *all3924* with a C12-HSL solution showed a decrease of 50% of AHL activity as monitored with the AHL biosensor pSB1075 (Fig. 3). Very little activity was recovered after acidification of the mixture to pH 2.0, which confirms that the reduction of AHL concentration is not due to a lactonase but instead due to the presence of acylase activity in the CCE of the transformed strain. The slight recovery of activity observed after acidification of the treated sample is due to the recovery of the portion of the AHL that is spontaneously degraded at a neutral pH after exposure to CCE, as indicated by the same trend being present in samples treated with the CCE of *E. coli* DH5 α transformed with the empty vector (Fig. 3). Interestingly, the acylase activity in the clone was dependent on the growth temperature, because no activity was found when grown at 37 °C (data not shown). The *all3924* gene has been named as *aiiC* for being the first autoinducer inhibitor identified in a cyanobacterium.

Discussion

AHLs accumulate in the biomass of *Anabaena* sp. PCC 7120 during exponential growth of completely acclimatized

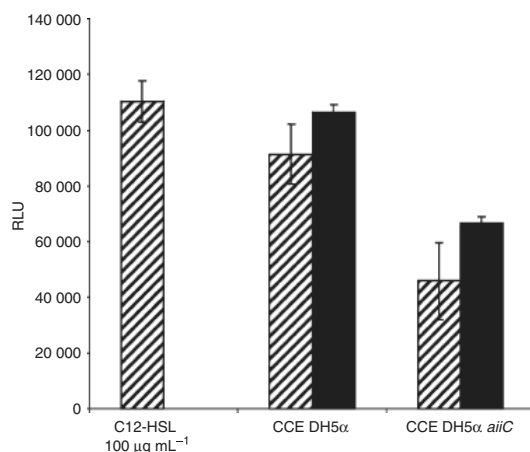


Fig. 3. C12-HSL degradation activity of CCE of *Escherichia coli* DH5 α transformed with pME6032 carrying (CCE DH5 α aiiC) or not (CCE DH5 α) the aiiC gene before (hatched bars) and after acidification to pH 2.0 (solid bars). Luminescence values of negative controls (nontreated biosensor or biosensor plus solvent) were subtracted in order to normalize the results. *E. coli* cultures were carried out at 28 °C and degradation assays were carried out at 30 °C.

diazotrophic cultures and disappear abruptly when the early stationary phase is achieved (M. Romero *et al.*, unpublished results), indicating that the level of the signals could be modulated through the presence of degradation mechanisms. This fact encouraged a search for enzymes able to degrade the AHLs in *Anabaena* sp. PCC 7120. The degradation activity found, demonstrated to be acylase-type by the dansylation assay, can be at least partially attributed to the aiiC acylase gene cloned in this paper. Even though the presence of additional acylases in *Anabaena* sp. PCC 7120 cannot be completely excluded, the similarity between the specificity of AHL degradation of the cyanobacterial CCE and the cloned enzyme (Table 1) seems to indicate that AiiC is the only enzyme responsible for the degradation of AHLs in *Anabaena* sp. PCC 7120.

The 2544 bp *all3924* gene, here named *aiiC*, encodes an 847 amino acid protein. As reported for the homologous quorum signal utilization and inactivation protein QuiP in *P. aeruginosa* PAO1, the presence of a signal sequence and a putative transmembrane domain located in the N-terminal region (residues 20–40) suggests that AiiC has a periplasmic localization. Acylase activity has been localized primarily in the cell debris after lysis in *Ralstonia* sp. (Lin *et al.*, 2003), while in *Streptomyces* sp. it has been found in the culture media (Park *et al.*, 2005). The predicted secondary structure of AiiC and the absence of acylase activity in the cell-free culture supernatants suggest that in the case of *Anabaena* sp. PCC 7120, the enzyme is cell-bound.

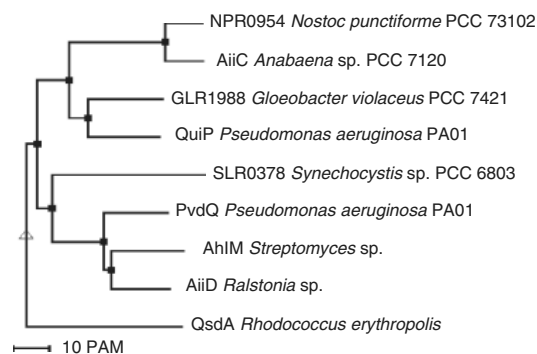


Fig. 4. Tree showing the phylogenetic relationship between the AiiC acylase of *Anabaena* sp. PCC 7120 and homologous sequences from known or putative acylases present in diverse bacteria and *Cyanobacteria*. PAM, percent accepted mutation.

Genomic searches with acylase sequences revealed the presence of genes homologous to the *Pseudomonas* acylases in the genomes of the filamentous cyanobacterium *N. punctiforme* and in the unicellular *G. violaceus* and *Synechocystis* sp., indicating that this activity could be widespread among the *Cyanobacteria*. The phylogenetic analysis shows that AiiC and most of the other cyanobacterial putative acylases are closely related to *P. aeruginosa* PAO1 QuiP (Fig. 4). Only the potential homologous acylase of the unicellular nondiazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is located in a different branch, closer to the PvdQ acylase of *P. aeruginosa*. Out of these two clusters is the *R. erythroplis* acylase QsdA, which shows no homology with the others. The QuiP cluster proteins share in average 30% identities between them, while the PvdQ cluster shares a more variable 23–40% identity in their peptide sequences. Despite their relatively low overall sequence homologies, conserved homologous domains of 11–12 residues can be observed in both the QuiP cluster (GYXHAQDRLWQM) and in the PvdQ cluster (GLLLXNPHXPN). The identity between the two AHL-acylases clusters is only 18%, without any noticeable conserved motif in their sequences. Despite showing a higher similarity to the *P. aeruginosa* PAO1 acylases, those are only able to degrade long-chain specifically AHLs (Huang *et al.*, 2006; Sio *et al.*, 2006), while AiiC can also degrade short-chain AHLs, (Table 1), as it has been described for QsdA of AiiD *R. erythroplis* and *Ralstonia* sp. or the activity found in *Variovorax paradoxus* (Leadbetter & Greenberg, 2000; Lin *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2005).

Because the lowest acylase activity in the biomass of diazotrophic cultures is observed at the early stationary phase, correlating with the highest AHL concentration in the biomass (M. Romero *et al.*, unpublished results), the possibility that this enzyme could be directly involved in the

intracellular inactivation of the signals should be investigated. The use of the QQ enzymes for the self-modulation of the level of the signals has already been found in *Agrobacterium tumefaciens*, for which the lactonase activity of AttM seems to be crucial for the inhibition of conjugation of the Ti plasmid (Zhang *et al.*, 2002). The hypothesis of a possible role of AiiC in the regulation of the AHLs intracellular level is further supported by the fact that the AHL acylase activity could be found only in the biomass. The continuous periplasm of filamentous *Cyanobacteria* is thought to be a channel for the transfer of signals and nutrients, which is essential for the multicellular nature of these organisms (Mariscal *et al.*, 2007). The transfer of the signals through the continuous periplasm would be consistent with the finding of AHLs in the biomass of *Anabaena* sp. PCC 7120 and a possible periplasmic location of the acylase.

Although the possible physiological role of AHLs in *Anabaena* sp. PCC 7120 is not yet completely defined, the presence of AHLs only in the biomass of diazotrophic cultures and a strong effect of the addition of exogenous AHLs on the nitrogenase activity indicate a possible role of AHLs in the control of heterocyst differentiation or any other process related to nitrogen fixation (M. Romero *et al.*, unpublished results). Another fact supporting the hypothesis of a role of AHLs and AHL-acylase in the complex network of genes controlling nitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7120 is the presence of a putative binding site for NtcA at position -48 in the *aiiC* promoter. NtcA is the global transcription regulator belonging to the cyclic AMP receptor protein family, which controls a number of genes involved in nitrogen and carbon metabolism and is responsible for the initiation of heterocyst differentiation (Herrero *et al.*, 2004).

On the other hand, and even though the hypothesis that AiiC could play a self-regulatory function cannot be completely excluded, the presence of acylase activity in diazotrophic cultures, in which no AHLs could be detected, suggests a more general physiological role of AiiC. The unicellular nondiazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 also possesses a putative acylase and this may indicate an alternative physiological role for this enzyme. Because the presence of AHLs has been demonstrated in the natural microbial communities in which the *Cyanobacteria* are present or even dominate, such as microbial mats or cyanobacterial blooms (Bachofen & Schenk, 1998; Braun & Bachofen, 2004), AiiC could also be involved in the interference of signalling in these complex bacterial systems.

Despite their ecological significance, the importance of QS systems have been questioned due to the relatively low number of *Proteobacteria* species in which the real physiological functions controlled by the AHL-mediated QS system has been identified (Manefield & Turner 2002). The increasing number of bacteria presenting AHL-degrading

mechanisms reinforces the view on the ecological significance of these signals. In the case of *Cyanobacteria*, the presence of AHL signals only in the biomass suggests a different usage of these molecules that may rather act as intracellular signals. Even though some results indicate that AiiC could be involved in the self-regulation of the AHL levels in the diazotrophic filaments, the cyanobacterium could also use the enzyme as a defence barrier in order to avoid the interference of external signals with its own signalling system. The presence of AHL-acylase sequences in diverse *Cyanobacteria* would support the latter hypothesis. Further studies are required in order to elucidate the possible physiological role of AiiC in *Anabaena* sp. PCC 7120.

Acknowledgements

This work was financed by a grant from Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia PGIDIT06P-XIB200045PR. Manuel Romero is supported by a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Science and Education. The authors would like to thank Alex Truman for his support on the HPLC analysis. The authors are grateful to Alicia Muro Pastor for critically reviewing the manuscript.

References

- Bachofen R & Schenk A (1998) Quorum sensing autoinducers – do they play a role in natural microbial habitats. *Microbiol Res* **153**: 61–63.
- Braun E & Bachofen R (2004) Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. *Hydrobiologia* **522**: 271–280.
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J & Greenberg EP (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3587–3590.
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881–10890.
- De Kievit TR & Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**: 4839–4849.
- Delalande L, Faure F, Raffoux A *et al.* (2005) *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 13–20.
- Dong YH & Zhang LH (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43**: 101–109.
- Dong YH, Wang LH & Zhang LH (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil Trans R Soc B* **362**: 1201–1211.
- Fuqua C & Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 685–695.

- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269–275.
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD & Kjelleberg S (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**: 6618–6622.
- Heeb S, Blumer C & Haas D (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **184**: 1046–1056.
- Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A & Flores E (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous *Cyanobacteria*. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 469–487.
- Huang JJ, Petersen A, Whiteley M & Leadbetter JR (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.
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP et al. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Res* **8**: 205–213.
- Leadbetter JR & Greenberg EP (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**: 6921–6926.
- Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR & Zhang LH (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**: 849–860.
- Manefield M & Turner SL (2002) Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* **148**: 3762–3764.
- Mariscal V, Herrero A & Flores E (2007) Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol Microbiol* **65**: 1139–1145.
- Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, Cámara M, Williams P & Barrett DA (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.
- Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT & Yum DY (2005) Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2632–2641.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M & Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria*. *J Gen Microbiol* **111**: 1–61.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sio CF, Otten LG, Cool RH, Diggle SP, Braun PG, Bos R, Daykin M, Cámara M, Williams P & Quax WJ (2006) Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* **74**: 1673–1682.
- Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC & Williams P (2001) Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol* **45**: 199–270.
- Throup JP, Cámara M, Briggs GS, Winson MK, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P & Stewart GSAB (1995) Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* **17**: 345–356.
- Uroz S, Chhabra SR, 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.
- Von Bodman SB, Bauer WD & Coplin DL (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455–482.
- Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL & Salmond GPC (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365–404.
- Williams P, Winzer K, Chan WC & Cámara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil Trans R Soc B* **362**: 1119–1134.
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P & Stewart GSAB (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185–192.
- Wu X, Zarka A & Boussiba S (2000) A simplified protocol for preparing DNA from filamentous *Cyanobacteria*. *Plant Mol Biol Rep* **18**: 385–392.
- Xu F, Byun T, Dussen HJ & Duke KR (2003) Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol* **101**: 89–96.
- Zhang HB, Wang LH & Zhang LH (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4638–4643.

3.2 Quorum sensing *N*-acylhomoserine lactone signals affect survival and nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 (Submitted in FEMS Microbiology Letters).



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

Quorum sensing N-acylhomoserine lactone signals affect survival and nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120

Journal:	<i>FEMS Microbiology Letters</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Romero, Manuel; Universidad de Santiago, Departamento de Microbiologia Muro-Pastor, Alicia; CSIC, Instituto Bioquimica Vegetal y Fotosintesis Otero, Ana; Universidad de Santiago, Spain, Departamento de Microbiologia
Keywords:	Cyanobacteria, <i>Anabaena</i> , quorum sensing, AHL, tetramic acid, nitrogen fixation



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Quorum sensing *N*-acylhomoserine lactone signals affect**
2 **survival and nitrogen fixation in the cyanobacterium**
3 ***Anabaena* sp. PCC7120**

4
5 Manuel Romero(1), Alicia M. Muro-Pastor(2) and Ana Otero(1)

6
7 (1) Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS,
8 Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, Spain.

9 (2) Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones
10 Científicas and Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain.

11
12 **Corresponding author:** Ana Otero, Dep. de Microbiología y Parasitología, Fac. de
13 Biología-CIBUS, Univ. de Santiago de Compostela, 15782 Santiago, Spain. Tel. +34
14 981563100 ext 16913, Fax: +34 981 528006. E-mail: anamaria.otero@usc.es

15
16 **Keywords**

17 Cyanobacteria, *Anabaena*, quorum sensing, AHL, tetramic acid, nitrogen fixation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

24 **Abstract**

25 Bacteria secrete small signal molecules into the environment that act inducing self and
26 neighbours gene expression. This phenomenon, termed Quorum Sensing (QS), allows
27 cooperative behaviours that increase the fitness of the group. The best studied signal
28 molecules are the *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), secreted by a growing number of
29 bacterial species including important pathogen species like *Pseudomonas aeruginosa*.
30 These molecules have recently been proposed to have more than signalling properties,
31 functioning as iron chelants or antibiotics. In this work we analyze the effects of
32 different AHLs varying in length and substitutions on the growth and nitrogen
33 metabolism of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *N*-(3-oxodecanoyl)-L-
34 homoserine lactone (OC10-HSL) was lethal for this diazotrophic cyanobacterium. All
35 other AHLs tested did not produce cell lyses but dramatically inhibited nitrogen
36 fixation. The strong inhibition of nitrogen fixation seems to take place at post-
37 transcriptional level, since no effect on heterocyst differentiation or in the expression of
38 nitrogenase was observed. The significance of these results is discussed in relation to
39 nitrogen metabolism and non-signal properties of AHLs.

40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

48 Introduction

49 The term “quorum sensing” (QS) (Fuqua et al., 1994), describes a phenomenon of
50 bacterial communication that confers these organisms the ability to perceive and
51 respond to the community density through coordinated regulation of gene expression,
52 thus being able to adopt an advantageous social behaviour. Bacteria communicate their
53 presence to others by secreting small chemical signals called autoinducers, allowing the
54 individuals to distinguish between high or low population densities.

55 By means of QS, bacterial populations can coordinate important biological functions
56 including motility, swarming, aggregation, plasmid conjugal transfer, luminescence,
57 antibiotic biosynthesis, virulence, symbiosis or biofilm maintenance and differentiation
58 (Williams et al., 2007). While several chemically distinct families of QS signal
59 molecules have now been described, the most studied QS signalling system involves *N*-
60 acylhomoserine lactones (AHLs) employed by diverse Gram-negative bacteria. AHLs
61 differ in the acyl side chain, which usually contains between 4 and 18 carbons in length,
62 with or without saturation or C3 hydroxy- or oxo- substitutions (Whitehead et al.,
63 2001). AHLs have been initially described as being exclusively produced by a relatively
64 small number of α and γ -proteobacteria (Williams et al., 2007), but recently the
65 production of these signals has also been reported for the colonial cyanobacterium
66 *Gloeotheca* (Sharif et al., 2008) and different marine Bacteroidetes (Huang et al., 2008;
67 Romero et al., 2010) which might point to a significant role of QS systems in natural
68 populations/environment.

69 Besides its function as quorum signals, some AHLs have been proposed to have other
70 possible biological functions such as iron quelants and antibiotics (Kaufmann et al.,
71 2005; Schertzer et al., 2009). In *Pseudomonas aeruginosa* a naturally occurring

1
2
3
4
5 72 degradation product of its *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OC12-HSL)
6
7 73 AHL signal, the tetramic acid 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-
8
9 74 2,4-dione, exhibits iron-binding ability. This AHL derivative is able to bind iron in a 3:1
10
11 75 complex with an affinity comparable to that exhibited by standard chelators and
12
13 76 siderophores (Schertzer et al., 2009). Also, antibiotic properties of the tetramic acid
14
15 77 derivative of OC12-HSL have been described, through the disruption of membrane
16
17 78 potential and proton gradient of bacteria, thus eliminating the proton motive force and
18
19 79 leading to bacterial death (Lowery et al., 2009).
20
21 80 The existence of QS blockage systems adopted by competitors to destroy or inhibit the
22
23 81 functions of AHLs also indicates the ecological importance of these molecules. The
24
25 82 different mechanisms of interference with QS communication systems have been
26
27 83 generally termed as “quorum quenching” (QQ) (Dong et al., 2001). An example of QQ
28
29 84 is the enzymatic inactivation of AHLs, with two groups of AHL-degrading enzymes
30
31 85 identified so far. The lactonases hydrolyse the homoserine lactone (HSL) ring of the
32
33 86 AHL molecule to produce acyl homoserines (Dong et al., 2007), whereas the acylases
34
35 87 cleave the AHL amide bond generating the corresponding fatty acid and HSL ring
36
37 88 (Dong et al., 2007). Enzymatic QQ activity has been described in Gram-positive and
38
39 89 negative bacteria and more recently in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120
40
41 90 (Romero et al., 2008).
42
43 91 *Anabaena* sp. PCC7120 is a filamentous cyanobacterium able to simultaneously
44
45 92 perform photosynthesis and dinitrogen fixation under aerobic conditions. In the
46
47 93 presence of a source of combined nitrogen, filaments grow as undifferentiated chains of
48
49 94 vegetative cells. In contrast, when *Anabaena* sp. PCC7120 is deprived of combined
50
51 95 nitrogen, approximately 10% of the cells differentiate into morphologically distinct
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 96 heterocysts that supply the rest of the filament with fixed nitrogen and in return receive
5
6 97 carbohydrate from vegetative cells (Wolk et al., 1994). In the absence of combined
7
8 98 nitrogen the heterocysts are spaced along the filament in a semiregular pattern that is
9
10 99 controlled by a regulatory loop established between two master regulators, NtcA and
11
12
13 100 HetR (Muro-Pastor et al., 2002).
14
15 101 Because AHLs have been described in natural environments where cyanobacteria are
16
17 102 prevalent, such as microbial mats and algal blooms (McLean et al., 1997; Bachofen &
18
19 103 Schenk, 1998), the acylase-type QQ activity found in *Anabaena* sp. PCC7120 (Romero
20
21 104 et al., 2008) could confer the cyanobacterium a competitive advantage, as well as serve
22
23 105 to mitigate possible cytotoxic effects of AHLs themselves and their tetramic acids
24
25 106 derivatives (Kaufmann et al., 2005; Schertzer et al., 2009).
26
27 107 In this work we study the effects of exogenous AHL addition to cultures of the
28
29 108 filamentous heterocyst forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120.
30
31
32 109
33
34
35
36
37 110 **Materials and methods**
38
39 111 **Growth conditions**
40
41 112 *Anabaena* sp. PCC7120 was grown photoautotrophically at 30°C with a continuous
42
43 113 irradiance of 75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Each culture unit was connected to an aeration system with a
44
45 114 continuous filtered (0.45 μm) air flow or CO₂-enriched air (1% vol/vol). Diazotrophic
46
47 115 cultures were carried out in BG11₀C medium (BG11 medium [Rippka et al., 1979]
48
49 116 without NaNO₃ and supplemented with 0.84 g L⁻¹ of NaHCO₃ [C]).
50
51 117 Non diazotrophic cultures of *Anabaena* sp. PCC7120 were established in BG11₀C
52
53 118 supplemented with 6 mM NH₄Cl and 12 mM of *N*-tris (hidroxymethyl) methyl-2-
54
55 119 aminoethanesulfonic acid (TES)-NaOH buffer pH 7,5 (BG11₀C+NH₄⁺). In order to
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

120 study the effect of AHL addition on the process of heterocyst differentiation, the
121 biomass of non diazotrophic cultures was collected by filtration (0.45 μm), washed and
122 resuspended in fresh BG11₀C (nitrogen step-down procedure).
123 Solid media plates were prepared mixing equal volumes of double concentrated
124 sterilized BG11₀C or BG11₀C+NH₄⁺ and agar 10 g L⁻¹. Plates inoculated with
125 *Anabaena* sp. PCC7120 were incubated at 30°C with light.
126
127 **Addition of synthetic AHLs to cultures**
128 *N*-acylhomoserine lactones were first assayed in solid media in order to check a possible
129 antibiotic effect (Lowery et al., 2009). Cells from a liquid culture of *Anabaena* sp.
130 PCC7120 in BG11₀C+NH₄⁺ (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chl) were harvested by filtration, washed and
131 resuspended in 3 mL of BG11₀C and 100 μL of the suspension were spread on top of
132 BG11₀C+NH₄⁺ or BG11₀C plates. Small holes were made in the center of each plate
133 and they were filled with 100 μL of AHLs 100 μM or acetonitrile (as control). Growth
134 was checked after 7 days of incubation at 30°C with light.
135 Synthetic AHLs were also added to liquid cultures of *Anabaena* sp. PCC7120 both
136 under diazotrophic conditions and during nitrogen step-down. *Anabaena* sp. PCC7120
137 was grown to exponential phase in BG11₀C+NH₄⁺ (cultures with about 5 μg of
138 chlorophyll *a* per mL; chlorophyll *a* [Chl] levels were determined in methanolic extracts
139 [Mackinney, 1941]). The cells were filtered, washed with BG11₀C, inoculated in fresh
140 BG11₀C+NH₄⁺ + AHL (100 μM) or BG11₀C + AHL (100 μM) and bubbled with air or
141 CO₂-enriched air. The AHL used were: *N*-butyryl-homoserine lactone (C4-HSL), OC4-
142 HSL, OHC4-HSL, C10-HSL, OC10-HSL, OHC10-HSL, C12-HSL, OC12-HSL and
143 OHC12-HSL. Parallel control assays were carried out using equal amount of acetonitrile

1
2
3
4 144 (AHL solvent). In nitrogen step-down cultures, the differentiation of heterocysts was
5
6 145 monitored by Alcian blue staining of polysaccharides in the heterocyst envelope
7
8 146 (Olmedo-Verd et al., 2006).
9
10
11 147 In order to evaluate their lethal effect on non diazotrophic cultures of *Anabaena* sp.
12
13 148 PCC7120, OC12-tetramic acid (100 μM) and OC10-HSL (0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50, 75
14
15 149 and 100 μM) were also assayed. Optical density (600 nm) of the cultures was measured
16
17 150 at different time-points after treatment.
18
19
20
21 151
22
23 152 **Nitrogenase activity measurement**
24
25 153 Biomass (200 mL, 2-3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chl) from BG11₀C+NH₄⁺ aerated cultures of *Anabaena*
26
27 154 sp. PCC7120 was harvested, washed and resuspended in fresh BG11₀C at a Chl
28
29 155 concentration of 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to induce the differentiation of heterocysts. Twenty millilitre
30
31 156 cultures were established in flasks supplemented with AHLs 100 μM or acetonitrile as
32
33 157 control. After 20 h of incubation at 30°C, 120 rpm and light, the nitrogenase activity
34
35 158 was measured as follows. Cells were concentrated to 4 mL by removing part of the
36
37 159 supernatant after centrifugation, and they were then divided in two 10 mL flasks sealed
38
39 160 with silicon caps (2 mL each, 10 μg of Chl). For each AHL, one flask was incubated
40
41 161 under an anaerobic atmosphere by injecting Argon for 3 min and adding 10 μM 3-(3,4
42
43 162 dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) to inhibit photosynthesis and therefore O₂
44
45 163 production.
46
47 164 After 1 h incubation at 30°C, 2 mL of acetylene were injected. One mL samples from
48
49 165 the air in the sealed flask were taken at different times during 20 h starting from 15 min
50
51 166 after acetylene injection to determine the concentration of the ethylene produced using a
52
53 167 GS-MS (HP 5890 series II) equipped with injector, column (Porapak Q) and flame
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

168 ionization detector (kept at 100, 80 and 150°C respectively). The detected signals were
169 processed with the computing integrator PYE Unicam DP88. The equipment was
170 calibrated with known concentrations of ethylene.

171 To determine the nitrogenase activity of the cultures the following formula was used:

172 Nitrogenase activity = nmol ethylene in sample x (14 mL* / 2 mL x µg Chl mL⁻¹)

173 (*14 mL = Atmosphere volume in 10 mL flasks).

174

175 C10-HSL was also added to BG11₀C cultures of *Anabaena* sp. PCC7120 with mature

176 heterocysts (24 h after nitrogen step-down) and then the nitrogenase activity was

177 measured as described before.

178

179 **RNA isolation and analysis**

180 Fifty millilitre samples were taken at 0, 3, 6, 20 and 24 h after nitrogen step-down.

181 Samples were filtered, washed and cells resuspended in 1 mL of TRIS 50 mM / EDTA

182 100 mM, centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the pellet was frozen in liquid

183 nitrogen before RNA extraction. RNA from whole filaments was isolated in the

184 presence of ribonucleoside-vanadyl complex as previously described (Muro-Pastor et

185 al., 2002).

186 For Northern analysis, 30 µg of RNA was loaded per lane and electrophoresed in 1%

187 agarose denaturing formaldehyde gels. Transfer and fixation to Hybond-N⁺ membranes

188 (Amersham Biosciences) were carried out using 0.1 M NaOH. Hybridization was

189 performed at 65°C according to the recommendations of the manufacturers of the

190 membranes. The *nifH* and *fdxH* probes were fragments of these genes amplified by

191 PCR. The *nifH* probe was amplified using plasmid pCSAV60 (containing the *nifH* gene

1
2
3
4 192 cloned in pGEM-T vector) as a template and oligonucleotides NH-1 (corresponding to
5
6 193 positions -334 to -314 with respect to the translation start of *nifH*) and NH-4
7
8 194 (complementary to nucleotides +884 to +863 with respect to the translation start of
9
10 195 *nifH*) (Valladares et al., 2007). The *fdxH* probe was amplified using plasmid pCSAV164
11
12 196 (containing the *fdxH* gene cloned in pGEM-T vector) as a template and oligonucleotides
13
14 197 FH-1 (corresponding to nucleotides +3 to +20 with respect to the translation start of
15
16 198 *fdxH*) and FH-2 (complementary to nucleotides +297 to +269 with respect to the
17
18 199 translation start of *fdxH*) (Valladares et al., 2007). All probes were ³²P labeled with a
19
20 200 Ready-to-Go DNA labeling kit (Amersham Biosciences) using [α -³²P]dCTP. Images of
21
22 201 radioactive filters and gels were obtained and quantified with a Cyclone storage
23
24 202 phosphor system and OptiQuant image analysis software (Packard).
25
26 203
27
28 204 **Results and discussion**
29
30
31
32 205 **Effect of synthetic AHLs addition**
33
34
35 206 *N*-acylhomoserine lactones were added to *Anabaena* sp. PCC7120 cultures in order to
36
37 207 evaluate possible effects on growth and nitrogen metabolism of the cyanobacterial
38
39 208 filaments both in solid and liquid media. We selected saturated and substituted
40
41 209 representatives of short (C4, OC4 and OHC4-HSL), middle (C10, OC10 and OHC10-
42
43 210 HSL) and long chain AHLs (C12, OC12 and OHC12-HSL). A first experiment was
44
45 211 carried out in solid media, as described in the materials and methods section. Growth
46
47 212 inhibition halos surrounding the wells were observed for OC10-HSL in both
48
49 213 BG11₀C+NH₄⁺ and BG11₀C and also for OC12-HSL in BG11₀C (data not shown).
50
51 214 AHLs were also added to liquid cultures under non diazotrophic conditions
52
53 215 (BG11₀C+NH₄⁺) and to cultures subjected to nitrogen step-down (transferred to
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 216 nitrogen-free medium BG11₀C) to study the effect on growth and heterocyst
5
6
7 217 differentiation. Cultures were carried out in the presence of air + CO₂ or just with air in
8
9
10 218 order to test whether the slower growth rate derived from carbon limitation would
11
12 219 enhance the AHL effect.
13
14 220 In liquid media, no antibiotic effect was observed after 20 h for any of the AHLs tested
15
16 221 except for OC10-HSL (100 μM) that proved to be cytotoxic for *Anabaena* sp. PCC7120
17
18 222 in BG11₀C+NH₄⁺. No cytotoxic effect was observed for the same AHL at microscope
19
20
21 223 level under diazotrophic conditions. To determine the minimal lethal concentration, the
22
23 224 assay was repeated using: 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50, 75 and 100 μM of OC10-HSL.
24
25
26 225 Concentrations higher than 25 μM were lethal (Figure 1) and the filaments appeared
27
28 226 completely lysed under the microscope after 5 h of culture. The observation of cells
29
30
31 227 incubated in the presence of 25 μM of OC10-HSL showed black dots, resembling
32
33 228 cyanophycin granules, in the inner side of the cell walls (data not shown). No lethal
34
35
36 229 effect on *Anabaena* sp. PCC7120 was recorded in cultures supplemented with 100 μM
37
38 230 OC12-tetramic acid (data not shown).
39
40
41 231 The growth inhibition effect of the two long chain, Oxo- substituted AHLs in the solid
42
43 232 medium assay could be related to iron quelanting properties of these molecules, since it
44
45 233 has been described that the degradation product of OC12-HSL is a tetramic acid with
46
47
48 234 high affinity for iron, comparable to standard quelants and siderophores (Kaufmann et
49
50 235 al., 2005; Schertzer et al., 2009). OC10 and OC12-HSL subproducts could sequester the
51
52 236 iron from the medium thus preventing growth of the cyanobacterium. Nevertheless this
53
54
55 237 could not explain the dramatic lethal effect of OC10-HSL, with total lysis of the
56
57 238 filaments already after 5 h of the addition in liquid BG11₀C+NH₄⁺ cultures. One
58
59 239 hypothesis to explain the toxicity of OC10-HSL in the presence of NH₄⁺ would be a

1
2
3
4 240 synergic effect of both compounds on the disruption of membrane potential, since high
5
6 241 levels of HN_4^+ have been described to have such effect in cyanobacteria (Drath et al.,
7
8 242 2008), but if that was the case, a similar effect would be expected for OC12-HSL
9
10 243 (Schertzer et al., 2009). Therefore, the fact that OC10-HSL signal is lethal only in the
11
12 244 presence of combined nitrogen in liquid media should be the result of a specific
13
14 245 inhibitory effect at some point of the assimilation of combined nitrogen. This effect
15
16 246 should be highly specific and different from the antibiotic effect described so far for
17
18 247 tetramic acids, since no cytotoxic effect could be observed when *Anabaena* sp.
19
20 248 PCC7120 was cultivated in liquid BG11₀C+ NH_4^+ supplemented with OC12-HSL or its
21
22 249 tetramic acid derivative. The half maximal effective concentration (EC₅₀) is between 8
23
24 250 and 55 μM for the OC12-HSL-derived tetramic acid and between 22.1 and 100 μM for
25
26 251 OC12-HSL itself depending on the bacterial strain (Kaufmann et al., 2005). These
27
28 252 ranges match the lethal concentration observed for OC10-HSL in BG11₀C+ NH_4^+
29
30 253 cultures of *Anabaena* sp. PCC7120, but this activity was mainly described for Gram-
31
32 254 positive bacteria, in which there is no outer membrane providing a permeability barrier
33
34 255 like in Gram-negative bacteria. Moreover, Lowery et al. (2009) reported data on the
35
36 256 anti-bacterial activities of OC12-tetramic acid and C14-tetramic acid, with the latter
37
38 257 being much more potent, likely due to the increased hydrophobicity of the longer acyl
39
40 258 chain, allowing better membrane partitioning or cell penetration. Thus, if the cytotoxic
41
42 259 effect observed in *Anabaena* sp. PCC7120 was caused by an OC10-tetramic acid
43
44 260 derivative, a stronger effect would be expected with the longer OC12-tetramic acid,
45
46 261 which in turn is not inactive in this case. All these evidences point to the mode of action
47
48 262 of OC10-HSL in *Anabaena* PCC7120 being different from that observed for Gram-
49
50 263 positive bacteria.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 264 The observation that antibiotics cannot easily reach the lethal concentrations in natural
6
7 265 environments has led to questioning whether these molecules could act, in subinhibitory
8
9 266 concentrations, as signal molecules (Davies, 2006; Linares et al., 2006). Low
10
11 267 concentrations of several antibiotics can alter expression patterns of bacteria without
12
13 268 any effect on growth rate (Davies et al., 2006), which resembles the mode of action of
14
15 269 QS signals. Thus one possibility is that the AHL signals have antibiotic effects when
16
17 270 added at higher concentrations than those found in natural environments. In fact, the
18
19 271 concentrations reported in the literature for AHLs in the culture media of the model
20
21 272 microorganism *Vibrio fischeri* usually range between 0.4 and 400 nM (Kaplan &
22
23 273 Greenberg, 1985; Schaefer et al., 2002; Burton et al., 2005), significantly lower than the
24
25 274 concentrations exhibiting cytotoxic activity.
26
27
28
29
30 275
31
32 276 Possible effects of AHLs on heterocyst differentiation was also tested with *Anabaena*
33
34 277 sp. PCC7120 strain CSEL4a (Olmedo-Verd et al., 2006). This strain expresses *gfp* gene
35
36 278 under the control of *ntcA* promoter, that is the master regulator of nitrogen assimilation,
37
38 279 controlling also the early phases of heterocyst differentiation (Herrero et al., 2004).
39
40 280 Cells grown in the presence of BG11₀C+NH₄⁺ were transferred to BG11₀C + AHL 100
41
42 281 μM. No changes in the activity of the *ntcA* promoter could be observed in the presence
43
44 282 of AHLs by means of changes in GFP fluorescence, indicating that the AHLs were not
45
46 283 affecting the process of heterocyst differentiation (data not shown).
47
48
49
50
51 284
52
53 285 **Nitrogenase activity**
54
55 286 The effect of the signals on the nitrogenase activity was evaluated in BG11₀C+NH₄⁺
56
57 287 cultures transferred to BG11₀C for the induction of heterocyst formation and nitrogen
58
59
60

1
2
3
4 288 fixation in the presence of the AHLs. Nitrogenase measurements were carried out 20
5
6 289 hours after the nitrogen step-down treatment in order to allow the formation of mature
7
8 290 heterocysts. A strong inhibition of the nitrogenase activity was recorded for all AHLs
9
10 291 tested. The lower ethylene production in AHL-treated cultures was evident after 15
11
12 292 minutes from acetylene addition. The inhibition was specially marked in cultures treated
13
14 293 with OC10 and OC12-HSL, in which none or residual nitrogenase activity could be
15
16 294 detected (Figure 2). This result is consistent with the inhibition of growth observed in
17
18 295 the cyanobacterium with these two AHLs in solid BG11₀C media.
19
20 296 In order to evaluate whether the nitrogenase activity inhibition was due to defects in
21
22 297 heterocyst wall formation, thus preventing the formation of O₂ impermeable layers and
23
24 298 a microoxygenic environment inside the heterocysts, nitrogenase activity was also
25
26 299 measured under anaerobic atmosphere. Air inside the flasks was substituted by Argon
27
28 300 and DCMU was added to the cultures to inhibit PSII-dependent O₂ production. Higher
29
30 301 nitrogenase activity was observed in anaerobic conditions when compared to aerobic
31
32 302 ones, but the effect of AHL addition was still observed (Figure 2). This result indicates
33
34 303 that the lower nitrogenase activity observed in the presence of AHLs was not due to
35
36 304 alterations of the heterocyst envelope and confirm that they have no effect on heterocyst
37
38 305 differentiation as observed in AHL supplemented cultures described before. As in
39
40 306 aerobic conditions, OC10 and OC12-HSL were the signals with the strongest inhibitory
41
42 307 effect on nitrogenase activity (Figure 2). 20 hours after the addition of acetylene still no
43
44 308 recovery of normal levels of nitrogenase activity of the cultures was observed either in
45
46 309 aerobic or anaerobic conditions (data not shown).
47
48 310
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

311 To determine whether the inhibitory effect of the AHLs on nitrogen fixation took place
312 only in developing heterocysts, nitrogenase activity was also measured in diazotrophic
313 cultures in which C10-HSL (100 μ M) was added 24 h after nitrogen step-down, when
314 mature heterocysts are already present. The amount of ethylene produced in early
315 samples was similar in cultures with or without C10-HSL but, interestingly, a
316 progressive lower ethylene production was observed in C10-HSL treated culture,
317 resulting in a 30 % decrease of nitrogenase activity (data not shown). The lower AHL
318 inhibitory effect in mature heterocysts, could be related to the impermeability of the
319 mature heterocysts wall. The inhibition of the nitrogenase activity in acclimated cultures
320 would be then related to the entrance of the AHLs in the new generations of heterocysts.
321 Nonetheless it cannot be excluded that AHLs enter through vegetative walls and spread
322 along the filaments by the periplasmic space, acting at molecular level only in newly
323 formed heterocysts. It has been described that *Anabaena* sp. PCC7120 cells are
324 surrounded by the plasmatic membrane and a peptidoglycan layer but the outer
325 membrane of the wall does not enter the septum between cells, implying the existence
326 of a continuous periplasmic space (Flores et al., 2006; Mariscal et al., 2007). In that case
327 the results observed would suggest a non reversible inhibition of nitrogenase in very
328 early stages either at the level of gene expression or on its enzymatic activity.

329

330 **Expression of nitrogen fixation genes**

331 Because all tested AHLs showed some inhibitory activity on nitrogen fixation only in
332 newly formed heterocysts, in order to study possible effects at the level of expression of
333 nitrogen metabolism genes, northern blots were carried out to detect changes in
334 expression of the dinitrogenase reductase subunit gene (*nifH*) and ferredoxin (*fdxH*,

1
2
3
4 335 encoding for dinitrogenase reductase electron donor [Razquin et al., 1995]). Expression
5
6 336 of both genes is heterocyst specific and their products are involved in nitrogen fixation.
7
8 337 No significant differences in the expression of both genes could be detected at 20 and
9
10 338 24 h after nitrogen step-down (no expression of *nifH* and *fdxH* was detected at 0, 3 and
11
12 339 6 h) in total RNA extracted from C10-HSL treated cultures when compared to control
13
14 340 samples (Figure 3). This result indicates that AHL inhibition could be affecting either
15
16 341 the expression of other genes related to nitrogen fixation or act on nitrogenase-related
17
18 342 genes at a post-transcriptional level.
19
20 343
21
22 344 The AHL signal produced by the colony and biofilm forming unicellular
23
24 345 cyanobacterium *Gloeothece* PCC6909 induces an increase in the expression of
25
26 346 aminoacid synthetases (Sharif et al., 2008), particularly the glutamate synthase.
27
28 347 Glutamate, together with glutamine, plays a central role in ammonium assimilation that
29
30 348 can be directly incorporated into these molecules either after nitrate or atmospheric
31
32 349 nitrogen assimilation, acting as nitrogen carrying biomolecules. Moreover it has been
33
34 350 observed that the exogenous addition of the AHL signal to *Gloeothece* PCC6909
35
36 351 cultures increases the expression of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase
37
38 352 (RuBisCo) (Sharif et al., 2008). Evidences exist that *Gloeothece* secretes aminoacids
39
40 353 when the nitrogen fixation rate exceeds the growth capability of the cyanobacterium
41
42 354 (Flynn & Gallon, 1990). It is therefore possible that *Gloeothece* regulates its nitrogen
43
44 355 and carbon balance depending on the population density (Sharif et al., 2008). Perhaps
45
46 356 the effects observed when exogenous AHLs are added to *Anabaena* sp. PCC7120 are
47
48 357 related to a C/N imbalance. When enough concentration of AHL is introduced in liquid
49
50 358 cultures, it could unbalance the available levels of nitrogen and carbon in the cells,
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 359 which would explain the lethal effect of OC10-HSL in non diazotrophic medium and
5
6 360 the total nitrogenase activity inhibition in the absence of combined nitrogen.
7
8
9 361 The presence of acylase activity against AHLs described in the biomass of *Anabaena*
10
11 362 sp. PCC7120 (Romero et al., 2008) could be related to the negative effects of AHLs in
12
13 363 this cyanobacterium. This AHL-degradation mechanism would protect the filaments, at
14
15 364 normal environmental concentrations, from exogenous signals with potential cytotoxic
16
17 365 and inhibitory activities on the cyanobacterium.
18
19
20 366
21
22
23 367 In conclusion, *N*-acylhomoserine lactones do not seem to affect the process of
24
25 368 heterocyst differentiation because no changes were observed in the frequency, pattern of
26
27 369 differentiation, permeability of the heterocyst cell wall, or expression of regulatory
28
29 370 genes whose products are involved in differentiation (*mtcA*). The strong inhibition of
30
31 371 nitrogenase activity observed could be related to nitrogen fixation blockage at a post-
32
33 372 transcriptional level, mainly on new forming heterocysts, or/and to an C/N unbalance
34
35 373 affecting energetic equilibrium of the cells. A possible new activity of AHL signals was
36
37 374 found for OC10-HSL, differing from those already described for Oxo- substituted and
38
39 375 AHL tetramic acid derivatives.
40
41
42 376
43
44
45 377 **Acknowledgements**
46
47
48 378 This work was financed by a grant from Consellería de Innovación e Industria, Xunta de
49
50 379 Galicia PGIDIT06PXIB200045PR. Manuel Romero was supported by a FPU
51
52 380 fellowship from the Spanish Ministry of Science and Education and a predoctoral
53
54 381 fellowship from Diputación de A Coruña. We would like to thank Professor Kim D.
55
56 382 Janda and Dr. Gunnar F. Kaufmann for kindly providing us with OC12-Tetramic acid.
57
58
59
60

- 1
2
3
4 383
5
6
7 384 **References**
8
9 385 Bachofen R & Schenk A (1998) Quorum sensing autoinducers - do they play a role in
10
11 386 natural microbial habitats. *Microbiol Res* **153**: 61-63.
12
13
14 387 Burton EO, Read HW, Pellitteri MC & Hickey WJ (2005) Identification of acyl-
15
16 388 homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain
17
18 389 Schmidt. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4906-4909.
19
20
21 390 Davies J (2006) Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**:
22
23 391 496-499.
24
25
26 392 Davies J, Spiegelman GB & Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic
27
28 393 concentrations. *Curr Opin Microbiol* **9**: 445-453.
29
30
31 394 Dong YH, Wang LH & Zhang LH (2007) Quorum-quenching microbial infections:
32
33 395 mechanisms and implications. *Phil Trans R Soc B* **362**: 1201-1211.
34
35 396 Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF & Zhang LH (2001) Quenching
36
37 397 quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase.
38
39 398 *Nature* **411**: 813-817.
40
41
42 399 Drath M, Kloft N, Batschauer A, Marin K, Novak J & Forchhammer K (2008)
43
44 400 Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium
45
46 401 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* **147**: 206-215.
47
48
49 402 Flores E, Herrero A, Wolk PC & Maldener I (2006) Is the periplasm continuous in
50
51 403 filamentous multicellular cyanobacteria?. *Trends Microbiol* **14**: 439-443.
52
53
54 404 Flynn KL & Gallon JR (1990) Changes in intracellular and extracellular α -amino acids in
55
56 405 *Gloeotheca* during N₂-fixation and following addition of ammonium. *Arch*
57
58 406 *Microbiol* **153**: 574-579.
59
60

- 1
2
3
4 407 Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-
5
6 408 LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:
7
8 409 269-275.
9
10
11 410 Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A & Flores E (2004) Cellular differentiation
12
13 411 and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol*
14
15 412 *Rev* **28**: 469-87.
16
17
18 413 Huang YL, Ki JS, Case RJ & Quian PY (2008) Diversity and acyl-homoserine lactone
19
20 414 production among subtidal biofilm-forming bacteria. *Aquat Microb Ecol* **52**: 185-
21
22 415 193.
23
24
25 416 Kaplan HB & Greenberg EP (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation
26
27 417 of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210-1214.
28
29
30 418 Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Rogers CJ, Meijler MM, Moss JA, Clapham B,
31
32 419 Brogan AP, Dickerson TJ & Janda KD (2005) Revisiting quorum sensing: discovery
33
34 420 of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acyl-homoserine
35
36 421 lactones. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 309-314.
37
38
39 422 Linares JF, Gustafsson I, Baquero F & Martinez JL (2006) Antibiotics as intermicrobial
40
41 423 signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 19484-19489.
42
43
44 424 Lowery CA, Park J, Gloeckner C, et al. (2009) Defining the mode of action of tetramic
45
46 425 acid antibacterials derived from *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signals. *J*
47
48 426 *Am Chem Soc* **131**: 14473 -14479.
49
50
51 427 Mackinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**:
52
53 428 315-322.
54
55
56 429 Mariscal V, Herrero A & Flores E (2007) Continuous periplasm in a filamentous,
57
58 430 heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol Microbiol* **65**:1139-1145.
59
60

- 1
2
3
4 431 McLean RJC, Whiteley M, Stickler DJ & Fuqua WC (1997) Evidence of autoinducer
5
6 432 activity in naturally-occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 259-263.
7
8
9 433 Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E & Herrero A (2002) Mutual dependence of
10
11 434 the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global
12
13
14 435 nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol Microbiol* **44**: 1377-
15
16 436 1385.
17
18 437 Olmedo-Verd E, Muro-Pastor AM, Flores E & Herrero A (2006) Localized induction of
19
20 438 the ntcA regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. Strain PCC
21
22 439 7120. *J Bacteriol* **188**: 6694-6699.
23
24
25 440 Razquin P, Schmitz S, Peleato ML, Fillat MF, Gómez-Moreno C & Böhme H (1995)
26
27 441 Differential activities of heterocyst ferredoxin, vegetative cell ferredoxin, and
28
29 442 flavodoxin as electron carriers in nitrogen fixation and photosynthesis in *Anabaena*
30
31 443 sp. *Photosynthesis Res* **43**: 35-40.
32
33
34 444 Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M & Stanier RY (1979) Generic
35
36 445 assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen*
37
38 446 *Microbiol* **111**: 1-61.
39
40
41 447 Romero M, Diggle SP, Heeb S, Camara M & Otero A (2008) Quorum quenching
42
43 448 activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase.
44
45 449 *FEMS Microbiol Lett* **280**: 73-80.
46
47
48 450 Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, Camara M & Otero A (2010) Acyl
49
50 451 homoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum*
51
52 452 *maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)
53
54 453 division. *FEMS Microbiol lett* **304**: 131-139.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 454 Schaefer AL, Taylor TA, Beatty JT & Greenberg EP (2002) Long-chain acyl-
5
6 455 homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene
7
8 456 transfer agent production. *J Bacteriol* **184**: 6515-6521.
9
10
11 457 Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M (2009) More than a signal: non-signaling
12
13 458 properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* **17**: 189-195.
14
15 459 Sharif DI, Gallon J, Smith CJ, Dudley E (2008) Quorum sensing in Cyanobacteria: N-
16
17 460 octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial
18
19 461 cyanobacterium *Gloeothoece* PCC6909. *ISME J* 2008: 1-12.
20
21 462 Valladares A, Maldener I, Muro-Pastor AM, Flores E & Herrero A (2007) Heterocyst
22
23 463 development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants
24
25 464 of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J Bacteriol* **189**: 4425-4430.
26
27 465 Vioque A (1997) The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated
28
29 466 repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in
30
31 467 heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* **25**: 3471-3477.
32
33 468 Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP (2001) Quorum-
34
35 469 sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
36
37 470 Williams P, Winzer K, Chan WC & Cámara M (2007) Look who's talking:
38
39 471 communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil Trans R Soc B* **362**:
40
41 472 1119-1134.
42
43 473 Wolk CP, Ernst A & Elhai J (1994) Heterocyst metabolism and development. *The*
44
45 474 *molecular biology of cyanobacteria*, Vol. 1 (Bryant DA, ed), pp. 769-823. Kluwer
46
47 475 Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

478 **Figure legends**

479 Figure 1. Optical density (600 nm) of *Anabaena* sp. PCC7120 cultures in
480 BG11₀C+NH₄⁺ with different concentrations of OC10-HSL (25 -□-, 50 -▲-, 75 -○- y
481 100 μM -◆-) and acetonitrile -◇- control.

482

483 Figure 2. *Anabaena* sp. PCC7120 nitrogenase activities in aerobic (Black bars) and
484 anaerobic (grey bars) conditions in BG11₀C supplemented with the AHLs: C4, OC4,
485 OHC4, C10, OC10, OHC10, C12, OC12 and OHC12-HSL 100 μM. Control culture
486 was set with acetonitrile (Ac). Nitrogenase activities are expressed as percentages of the
487 value for control culture, which corresponds to 2.04 (aerobic) and 6.5 nmol ethylene μg
488 Chl⁻¹ h⁻¹ (anaerobic).

489

490 Figure 3. Northern blot analysis of the expression of *fdxH* and *nifH* genes. RNAs (30
491 μg) were isolated from samples took at 0 (NH₄⁺), 3, 6, 20 and 24 h in the presence or
492 absence of C10-HSL. Cultures contained 100 μM C10-HSL or acetonitrile as control.
493 Hybridizations were carried out with a probe for the *nifH* or *fdxH* gene or for the *rnpB*
494 gene (Vioque, 1997), which was used as a loading and transfer control.

495

496

497

498

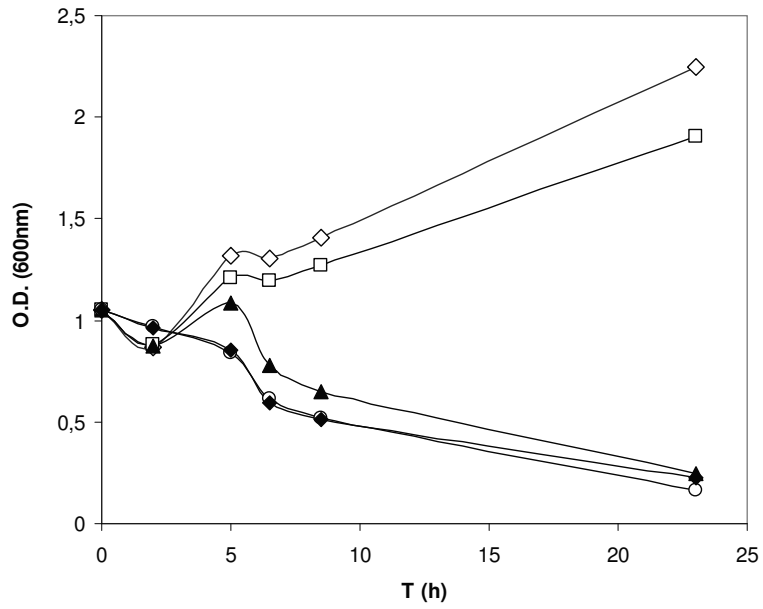
499

500

501

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

502 **Figure 1**

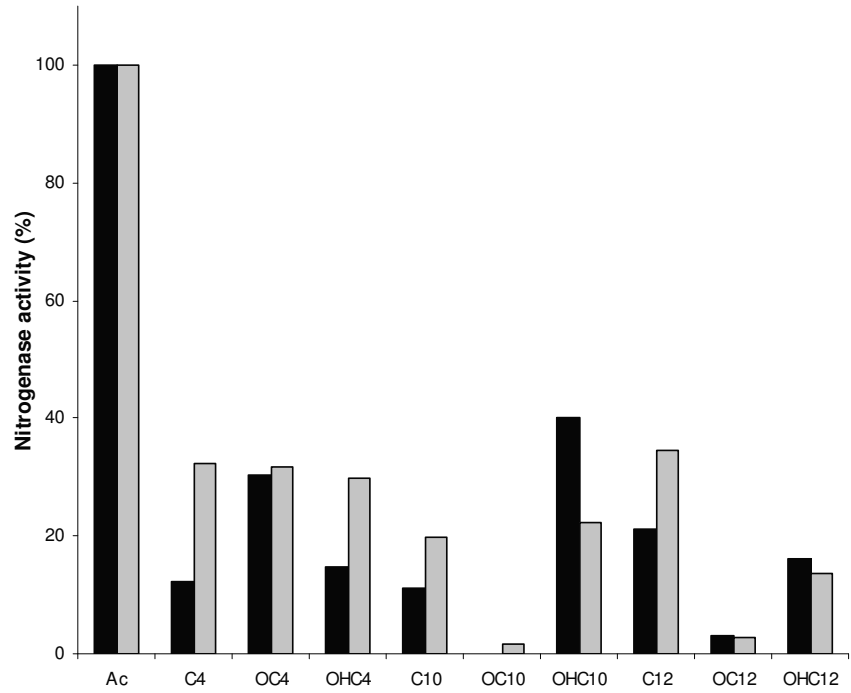


503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513

Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

514 **Figure 2**

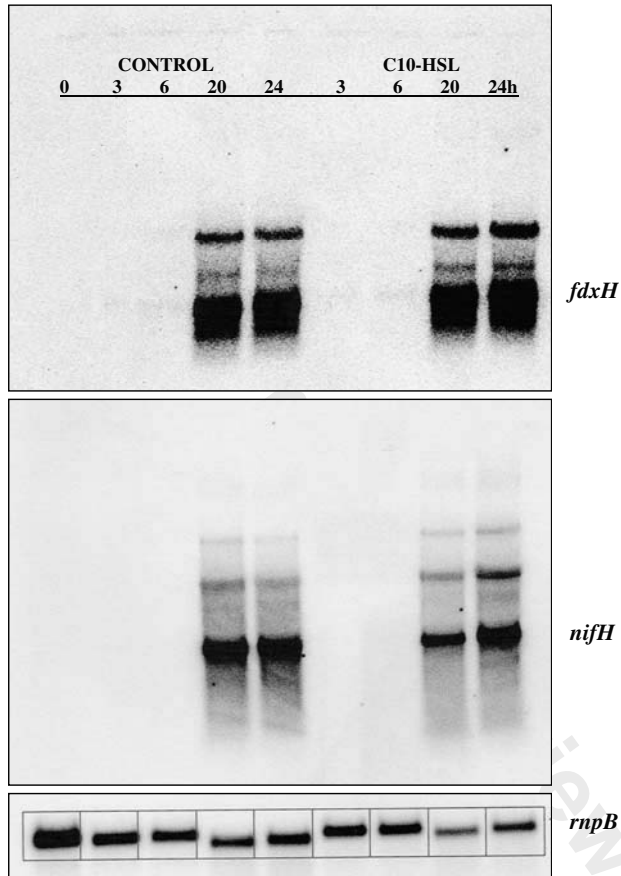


515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525

review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

526 **Figure 3**



527